

УДК [579.842:616.24-002](571.63)

## ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ РОДА *LEGIONELLA*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

© 2015 г. <sup>1,2</sup>А. В. Мартынова, <sup>3</sup>Л. А. Балабанова, <sup>2</sup>Е. А. Богатыренко, <sup>2</sup>Л. С. Бузолева<sup>1</sup>Тихоокеанский государственный медицинский университет,<sup>2</sup>Школа естественных наук Дальневосточного федерального университета,<sup>3</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН,  
г. Владивосток

Распространение микроорганизмов рода *Legionella* является значимой проблемой экологии микроорганизмов, так как эти микроорганизмы, являясь широко распространенными, остаются одними из самых сложно культивируемых. В настоящее время известно около 27 видов легионелл, однако практический и значимый для здоровья человека интерес представляют данные о распространенности такого возбудителя, как *Legionella pneumophila*, способного вызвать у человека целый ряд заболеваний, наиболее опасным из которых является легионеллезная пневмония.

С целью мониторинга распространения штаммов рода *Legionella* в природных и антропогенных экосистемах для выявления роли штаммов *Legionella pneumophila* было исследовано 150 проб, полученных из природных (75 проб) и антропогенных (75 проб) экосистем с выделением штаммов рода *Legionella* на селективной среде. Штаммы *Legionella pneumophila* идентифицировались ПЦР реакцией. В результате штаммы рода *Legionella* были выявлены в 37,7 % (28 проб из 75) всех проб, полученных из природных экологических ниш, и в 33,3 % (25 проб из 75) проб, полученных из антропогенных экологических ниш. Значимых различий в распространении штаммов с учетом сезонности выявлено не было. Изучение микробиоценоза природных и антропогенных экосистем позволяет считать, что штаммы рода *Legionella* играют в ассоциации микроорганизмов водных экосистем значительную роль.

**Ключевые слова:** микроорганизмы рода *Legionella*, легионеллезная инфекция, внебольничная пневмония, сапронозы

## ECOLOGICAL CHARACTERISTIC OF *LEGIONELLA* GENUS STRAINS ISOLATED IN TERRITORY OF PRIMORSKY AREA

<sup>1,2</sup>A. V. Martynova, <sup>3</sup>L.A. Balabanova, <sup>2</sup>E. A. Bogatyrenko, <sup>2</sup>L. S. Buzoleva<sup>1</sup>Pacific State Medical University,<sup>2</sup>School of Natural Sciences of Far Eastern Federal University<sup>3</sup>G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences,  
Vladivostok, Russia

The spread of microorganisms of *Legionella* genus is a significant problem of ecology of microorganisms. Being widely spread, these microorganisms remain uncultivated. The aim of our research was to reveal spread of microbes of *Legionella* genus in natural and anthropogenic ecosystems in order to define the role of *Legionella pneumophila*. Methods: we studied 150 samples received from the natural (75 samples) and anthropogenic (75 samples) ecosystems. The strains of *Legionella pneumophila* were identified with PCR. Results: the strains of *Legionella* genus were identified in 37.7 % (28/75) of all samples obtained from the natural ecological niches and in 33.3 % (25/75) of the samples obtained from the anthropogenic ecological niches. Discussion of the results: the *Legionella* strains play a significant role in the association of water microorganisms.

**Keywords:** microorganisms of genus *Legionella*, *Legionella* infection, community-acquired pneumonia, sapronoses

### Библиографическая ссылка:

Мартынова А. В., Балабанова Л. А., Богатыренко Е. А., Бузолева Л. С. Экологическая характеристика штаммов рода *Legionella*, выделенных на территории Приморского края // Экология человека. 2015. № 10. С. 14–17.

Martynova A. V., Balabanova L. A., Bogatyrenko E. A., Buzoleva L. S. Ecological Characteristic of *Legionella* Genus Strains Isolated in Territory of Primorsky Area. *Ekologiya cheloveka* [Human Ecology]. 2015, 10, pp. 14-17.

Несмотря на внимание микробиологов к изучению микробиологических особенностей микроорганизмов-возбудителей инфекций дыхательных путей, микробиологические особенности таких микроорганизмов, как легионеллы, до сих пор остаются недооцененными. Одним из аспектов, определяющих некоторые «пробелы» в представлениях об их микробиологии, являются данные об экологической характеристике распространения этих микроорганизмов на территории Российской Федерации, в том числе и с учетом регионального компонента. Это связано как с объектив-

ными сложностями микробиологической диагностики легионелл, поскольку культивирование их требует специальных сред и условий, не всегда доступных в рутинной практике, так и с недостатком информации о возможности идентификации этих микроорганизмов в различных экологических нишах вообще [1–3].

Таким образом, проблемой общеприкладного направления является прежде всего отсутствие данных о распространенности микроорганизмов рода *Legionella* в различных экологических нишах как природного, так и антропогенного характера. Учитывая

тот факт, что в настоящее время выделяют около 27 видов легионелл, каждый из которых обладает своими видовыми экологическими особенностями, значимость идентификации среди всех легионелл такого вида, как *Legionella pneumophila*, является неоспоримой, так как именно этот возбудитель вызывает такие заболевания, как пневмония, понтиакская лихорадка и т. п. Распространение данного микроорганизма в составе ассоциаций других микроорганизмов в различных экологических нишах в условиях Российской Федерации остается малоизученным [4, 5].

Классическим представлением является тот факт, что легионеллы широко распространены в природных водоёмах, где они паразитируют в организме водных амёб и не представляют существенной опасности для человека. В инженерно-технических сооружениях, связанных с циркуляцией воды (поверхности труб и оборудования систем водоснабжения, градирен, систем кондиционирования и увлажнения воздуха), концентрация легионелл резко возрастает за счёт образования биоплёнок, что является ключевым фактором накопления потенциально опасных концентраций возбудителя. В сочетании с возможностью аэрогенного распространения или аспирации возбудителя возникает угроза возникновения эпидемии легионеллёза (обычно возникают в местах массового скопления людей). Сочетание высокой концентрации легионелл в водной среде с источниками мелкодисперсного аэрозоля позволяет возбудителю инфекции проникать в нижнюю часть респираторного тракта и легкие человека, где происходит контакт с альвеолярными макрофагами, в которых легионеллы активно размножаются [6–8].

Сложность количественной оценки легионелл в сочетании с высокой устойчивостью к дезинфектантам в перечисленных водных объектах создает существенные трудности в оценке потенциальной опасности данных систем и проведении профилактических мероприятий.

Цель исследования — провести мониторинг распространения штаммов рода *Legionella* в природных и антропогенных экосистемах для выявления роли штаммов *Legionella pneumophila* в структуре штаммов семейства Legionellaceae, выделенных в природных и техногенных (антропогенных) экосистемах.

#### Методы

Нами было исследовано 150 проб воды (собранных в период с октября 2011 по сентябрь 2012 года) на территории Приморского края в природных (75 проб, ключ, ручей, родник) и антропогенных (75 проб, водопровод горячего и холодного водоснабжения на территории г. Владивостока) экологических нишах. Образцы объемом 1 000 мл предварительно фильтровали на стеклянной воронке через стерильный ватно-марлевый фильтр. При проведении микробиологического анализа по 0,1 мл концентрированного, обработанного кислотным буфером и прогретого при 50 °С образца высевают на чашки со средой БУДРАГ

(ВСУЕ, Национальный научно-производственный центр генно-инженерных препаратов, Россия) с ростовой и селективной добавкой. Образец распределялся по поверхности питательной среды шпателем или стеклянной палочкой. Чашки инкубируют при 37 °С до 10 дней во влажной атмосфере и в присутствии 2,5 % CO<sub>2</sub>. Подозрительные на легионеллы колонии выявляют при стереомикроскопическом просмотре чашек или под лупой. На селективной среде колонии легионелл обычно имеют вросший центр, гранулярную или блестящую поверхность, серовато-голубоватую, иногда зеленоватую окраску. Колонии легионелл на 3–5-е сутки небольшие, диаметром 1–2 мм, плосковыпуклые, гладкие с острым краем. Для идентификации бактерий рода *Legionella* spp. использовали окраску мазков по Граму и посев на среду БУДРАГ без селективной и ростовой добавок, на которой колонии легионелл не вырастают. Идентифицированные подобным образом колонии относят к роду *Legionella*. Типичные для *Legionella* spp. колонии подсчитывают количественно для последующего определения количества легионелл в 1 л воды. Для биопленок, в которых возбудитель присутствует, как правило, в высоких концентрациях, проводят только качественную оценку обсемененности. Для быстрой идентификации бактерии *Legionella pneumophila* используют латекс-агглютинацию с моновалентными и групповыми сыворотками и метод флуоресцирующих антител. В случае необходимости принадлежность выделенной культуры к виду *Legionella pneumophila* определяют с помощью полимеразной цепной реакции с видоспецифичными праймерами: F: 5'GTATCCGATTTTCCGGGTTT3'; R: 5'TTTGATGGCAAAGCGTACTG3', P: JOE\_CAACGCCTGGCTTGTTTTGG-BHQ1 [4, 8].

В работе были применены критерии параметрической статистики (критерий Стьюдента) после проведения нормальности распределения (критерий Колмогорова — Смирнова). Для оценки качественных данных нами использованы частотные характеристики с расчетом доверительного 95 % интервала (95 % ДИ) по методу Вальда (применялся он-лайн калькулятор, разработанный Jeff Sauro <http://www.measuringusability.com/wald.htm>), также указывались верхние и нижние границы доверительного интервала. При проверке статистических гипотез нами был выбран критический уровень значимости  $\alpha = 0,05$  ( $p < 0,05$ ) [1].

#### Результаты

Нами были исследованы образцы воды, взятые из водных экосистем, связанных с водопрооявлениями различного характера: природными — 75 проб (ключ, ручей, родник) и антропогенными — 75 проб (водосброс ТЭЦ, трубы холодного и горячего водоснабжения, шланги душа и т. п.).

Исследуемые пробы сгруппированы в группы природных и техногенных водопрооявлений. Из каждого источника было взято по 3 пробы начиная с октября

с интервалом в 3 месяца – октябрь, февраль, июнь, всего было обследовано 25 точек забора в природных и 25 точек забора в антропогенных экосистемах.

При проведении исследования штаммы рода *Legionella* были выявлены в 28 из 75 проб, что составило 37,7 (95 % ДИ: 28–48) % всех проб, полученных из природных экологических ниш, и в 33,3 (95 % ДИ: 23–44) % (25 из 75) проб, полученных из антропогенных экологических ниш. Значимых различий в распространении штаммов с учетом сезонности выявлено не было: в октябре в природных эконишах позитивными были 10,6 (95 % ДИ: 5–19) % (8 из 75) проб, в антропогенных – 12,0 (95 % ДИ: 6–21) % (9 из 75); в февральских пробах в природных эконишах – 12,0 % (9 из 75) и в антропогенных также 12,0 % (9 из 75), в июньских пробах в природных источниках – 10,6 (95 % ДИ: 5–19) % (8 из 75) и в антропогенных 13,3 (95 % ДИ: 7–23) % (10 из 75).

При анализе структуры микробиоценоза природных водных экосистем мы обнаружили образующиеся при культивировании классические голубовато-серые колонии, принадлежащие к роду *Legionella*. Кроме того, заметен сливной рост колоний, скорее всего принадлежащих к роду *Acinetobacter* или *Pseudomonas* как микроорганизмам единственных родов, которые могут расти на данной селективной среде (таблица).

Результаты бактериоскопии образцов воды, выделенных в различных водопроводах

Источник (место отбора проб)	<i>Legionella spp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Cyanobacteria</i>	Артефакт
Ключ Широкий (Партизанский р-н)	$2 \times 10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-1} - 10^{-6}$	+
Родник в п. Лазовый (Партизанский р-н)	$1 \times 10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-1} - 10^{-6}$	+
Ручей Лазовик (Партизанский р-н)	$1 \times 10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-1} - 10^{-6}$	+
Кран холодной воды (Партизанский р-н)	$5 \times 10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-1} - 10^{-6}$	+
Водосброс с партизанской ГРЭС	$1 \times 10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-1} - 10^{-6}$	+
Родник (г. Владивосток, пр. Красного знамени, 96)	$16 \times 10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-1} - 10^{-6}$	+
Конденсат (подземный переход в центре Владивостока)	$10 \times 10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-1} - 10^{-6}$	+
Русло р. Объяснений (Владивосток, стоки ТЭЦ-2)	$5 \times 10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-1} - 10^{-6}$	+
Стоки в озеро в р-не бух. Патрокл)	$3 \times 10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-1} - 10^{-6}$	+
Родник (Владивосток, р-н Снеговая падь)	$4 \times 10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-1} - 10^{-6}$	+
Кран холодной воды (Владивосток)	$9 \times 10^{-6}$		$10^{-1} - 10^{-6}$	–

Из представленных данных очевидно, что штаммы рода *Legionella* присутствуют практически во всех изучаемых образцах, что подтверждает актуальность исследуемого нами вопроса и дает возможность пред-

полагать особую экологическую роль этих микроорганизмов.

При анализе распространения штаммов *Legionella pneumophila* среди всех штаммов легионелл, выделенных нами, мы выяснили, что среди штаммов, выделенных в природных экологических нишах, этот возбудитель составляет 14,28 (95 % ДИ: 5–35) % (4 штамма из 28) и среди выделенных в антропогенных источниках – 16,0 (95 % ДИ: 5–35) % (4 штамма из 25).

#### Обсуждение результатов

Изучение микробиоценоза природных и антропогенных экосистем позволяет считать, что штаммы рода *Legionella* занимают в ассоциации микроорганизмов водных экосистем значительное место. Учитывая высокий удельный вес этих микроорганизмов в условиях как природного, так и антропогенного водного микробиоценоза, можно предполагать, что штаммы этих микроорганизмов играют значимую эпидемическую роль и требуют профилактических мероприятий в случае использования воды природных и техногенных экосистем для бытовых нужд.

При этом штаммы вида *Legionella pneumophilla* представляют особую эпидемическую опасность, так как присутствуют относительно постоянно во всех образцах изученных водопроводов, что требует дополнительных эпидемиологических мероприятий.

#### Список литературы

1. Гржибовский А. М. Доверительные интервалы для частот и долей // Экология человека. 2008. № 5. С. 57–60.
2. Тартаковский И. С. Болезнь легионеров: итоги 25-летнего изучения инфекции, проблемы и перспективы исследования // Вестник РАМН. 2001. № 11. С. 11–14.
3. Унгурия Т. Н., Гржибовский А. М. Внутригодовая динамика загрязнения воздуха и обращаемости за медицинской помощью по поводу болезней органов дыхания // Экология человека. 2011. № 6. С. 37–42.
4. Abraham W. R. Controlling biofilms of gram-positive pathogenic bacteria // Curr. Med. Chem. 2006. Vol. 13. P. 1509–1524.
5. Atlas R. M. Legionella: from environmental habitats to disease pathology, detection and control // Environ. Microbiol. 1999. Vol. 4. P. 283–293.
6. Barbeau J., Gauthier C., Payment P. Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: a review // Can. J. Microbiol. 1998. Vol. 11. P. 1019–1028.
7. Benson R. F., Fields B. S. Classification of the genus *Legionella* // Semin. Respir. Infect. 1998. Vol. 2. P. 90–99.
8. Bernander S., Jacobson K., Helbig J. H., et al. A hospital-associated outbreak of Legionnaires disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 1 is characterized by stable genetic fingerprinting but variable monoclonal antibody patterns // J. Clin. Microbiol. 2003. Vol. 6. P. 2503–2508.
9. Berry D., Xi C., Raskin L. Microbial ecology of drinking water distribution systems // Curr. Opin. Biotechnol. 2006. Vol. 3. P. 297–302.

#### References

1. Grjibovski A. M. Confidence intervals for proportions. *Ekologiya cheloveka* [Human Ecology]. 2008, 5, pp. 57-60. [in Russian]

2. Tartakovskii I. S. Legionellosis: results of 25-years study of infection. The problems and study perspective. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk* [Newsletter of Russian Academy of Medical Sciences]. 2001, 11, pp. 11-14. [in Russian]

3. Unguryanu T. N., Grijbovski A. M. Seasonal Variation in Air Pollution and Its Association with Hospital Admissions for Respiratory Diseases. *Ekologiya cheloveka* [Human Ecology]. 2011, 6, pp. 37-42. [in Russian]

4. Abraham W. R. Controlling biofilms of gram-positive pathogenic bacteria. *Curr. Med. Chem.* 2006, 13, pp. 1509-1524.

5. Atlas R. M. Legionella: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ. Microbiol.* 1999, 4, pp. 283-293.

6. Barbeau J., Gauthier C., Payment P. Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: a review. *Can. J. Microbiol.* 1998, 11, pp. 1019-1028.

7. Benson R. F., Fields B. S. Classification of the genus Legionella. *Semin. Respir. Infect.* 1998, 2, pp. 90-99.

8. Bernander S., Jacobson K., Helbig J. H., et al. A hospital-associated outbreak of Legionnaires disease caused by Legionella pneumophila serogroup 1 is characterized by stable genetic fingerprinting but variable monoclonal antibody patterns. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 6, pp. 2503-2508.

9. Berry D., Xi C., Raskin L. Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2006, 3, pp. 297-302.

#### **Контактная информация:**

*Мартынова Алина Викторовна* – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры эпидемиологии и военной эпидемиологии ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет»; профессор кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии Дальневосточного федерального университета

Адрес: 590002, г. Владивосток, пр. Острякова, д. 2

E-mail: clinmicro@yandex.ru