

С.П.Ярков¹, С.И.Третьяков¹, Л.А.Башарова¹, А.Н.Бровкина¹, В.Н.Злобин¹,
И.С.Тартаковский²

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЕЙ С ВИЗУАЛЬНОЙ И ВИДЕОЦИФРОВОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

¹ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения»,
²ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Разработаны индикаторные иммунохроматографические элементы для выявления возбудителя легионеллеза в водных средах. Индикаторные элементы позволяют выявлять не менее $1 \cdot 10^5 - 2,5 \cdot 10^5$ м.к./мл возбудителей легионеллеза первой серогруппы, что может иметь прикладное значение при идентификации выделенных культур легионелл и мониторинге объектов окружающей среды на наличие *Legionella pneumophila*.

Ключевые слова: иммунохроматография, индикация, *Legionella pneumophila*.

Legionella pneumophila – грамотрицательная бактерия, возбудитель острых тяжелых пневмоний с высоким процентом летальных исходов (5–10 %) и респираторных заболеваний. В природных условиях легионеллы являются естественными обитателями пресноводных водоемов. Присутствие *L. pneumophila* в воде различных объектов окружающей среды (бассейнов, аквапарков, градирен электростанций, системах кондиционирования воздуха и коммунального водоснабжения в период сезонных профилактических работ) в концентрации $1 \cdot 10^4$ м.к./л и выше является колонизацией данного объекта легионеллами и представляет эпидемическую опасность, требующую дезинфекционных и профилактических мероприятий. Проведение мониторинга объектов окружающей среды на наличие *L. pneumophila* позволит определить степень их контаминации возбудителем и дать оценку эффективности принимаемых мер в целях профилактики болезни легионеров и обеспечения безопасности здоровья населения [2].

L. pneumophila занимает особую нишу среди возбудителей атипичных пневмоний как «агент техногенной инфекции», в настоящее время увеличивается число выявляемых случаев и эпидемических вспышек, что определяет актуальность совершенствования методов диагностики и индикации этого возбудителя [3]. Известно около 50 видов легионелл, из которых собственно болезнь легионеров вызывает вид *L. pneumophila*, насчитывающий 16 серогрупп. Причем более 80 % случаев заболевания вызывают штаммы 1 серогруппы. Существующие микробиологические методы диагностики обладают высокой стоимостью и длительны в исполнении (7–10 сут). Для быстрой идентификации бактерий используют латекс-агглютинацию, реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), метод флуоресцирующих антител (МФА), либо полимеразную цепную реакцию (ПЦР). В настоящее время все большее внимание уделяется иммунохроматографическим методам, которые отве-

чают критериям экспресс-анализа и получили широкое распространение в мире [1, 4, 6]. В нашей стране иммунохроматографические средства выявления возбудителей болезни легионеров до недавнего времени отсутствовали. Ранее нами были опубликованы предварительные данные по разработке колориметрического иммунохроматографического анализа для выявления возбудителя легионеллеза с помощью индикаторных иммунохроматографических элементов (ИИХЭ) на основе коллоидного золота [5].

Целью настоящей работы явилось исследование возможности использования иммунохроматографического анализа с визуальной и видеоцифровой детекцией для выявления возбудителя легионеллеза в водных средах.

Материалы и методы

Использовали ИИХЭ для выявления возбудителя болезни легионеров первой серогруппы, разработанные авторами во ФГУП «ГосНИИ БП» Федерального медико-биологического агентства. Общий принцип построения индикаторных иммунохроматографических элементов описан в [1]. В ИИХЭ для выявления легионелл использовал принцип «сэндвич-анализа». Для формирования аналитической зоны иммунохроматографической мембраны и получения конъюгатов с коллоидным золотом применяли моноклональные мышинные антитела 2F10, 5F4 к полисахаридным (липополисахаридным антигенам) легионелл первой серогруппы, производства ООО «Импакт» (Москва). В контрольной зоне аналитической мембраны ИИХЭ использовали кроличьи антимышинные иммуноглобулины (Sigma). Полученную аналитическую мембрану компоновали в мультимембранный композит, содержащий подложки для впитывания образца, для нанесения образца, для нанесения конъюгата коллоидного золота с моноклональными антителами. Затем, мультимембранный композит резали на по-

лоски размером 5×60 мм и помещали в пластиковые оправы, снабженные отверстиями для нанесения образца и для наблюдения окрашенных зон на нироцеллюлозной мембране.

В качестве модельных систем в работе использовали легионеллы из коллекции микробных культур национальной референс-лаборатории по легионеллезу ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи РАМН: *L. pneumophila* Sg1-Philadelphia-1, *L. pneumophila* Sg1-Pyshma-1, *L. pneumophila* Sg1-Bellingham-1, *L. pneumophila* Sg1-Flint-1, *L. pneumophila* Sg1-Pyshma-2, *L. pneumophila* Sg6-Chicago-2, *L. pneumophila* Sg8-Concord-3, *L. anisa* WA-316-C3, *L. longbeachae* Sg1-Long Beach-4, *L. gratiana* Pyshma-7.

Готовили бактериальную суспензию клеток легионелл в концентрации, соответствующей 10 единицам стандартного образца мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича (ОСО 42-28-59-86П), что эквивалентно $1,0 \cdot 10^9$ м.к./мл рода *Legionella*. Приготовленную микробную взвесь инактивировали прогреванием на водяной бане при 80°C в течение 30 мин.

Для определения специфической активности (чувствительности) ИИХЭ готовили разведения соответствующих клеток в буфере анализа (БА) в диапазоне концентраций $2,5 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^7$ м.к./мл. В ИИХЭ пластиковой пипеткой вносили по каплям приготовленные суспензии легионелл, всего четыре капли (около 120 мкл) с интервалами 30–45 с. В качестве отрицательного контроля использовали БА без добавления биологического материала. Результаты регистрировали спустя 25 мин после внесения первой капли.

Для изучения специфичности ИИХЭ использовали образцы, содержащие культуры клеток легионелл *L. pneumophila* других серогрупп *L. pneumophila* Sg6-Chicago-2, *L. pneumophila* Sg8-Concord-3, другие виды легионелл *L. anisa* WA-316-C3, *L. longbeachae* Sg1-Long Beach-4, *L. gratiana* Pyshma-7, а также псевдомонады, стафилококки и клебсиеллы, входящие в состав биопленок, в которых живут *Legionella*. Культуры клеток использовали в концентрации

$1 \cdot 10^7$ м.к./мл. Исследование проводили таким же образом, как и при изучении чувствительности.

Регистрацию аналитического эффекта ИИХЭ проводили как визуально, так и с помощью компьютерной программы «Видеотест» и отечественного видеоцифрового регистратора иммунохроматограмм «Рефлеком», внесенного в государственный реестр средств измерений России [4]. Прибор регистрировал величину окрашивания конъюгатом аналитической и контрольной зон ИИХЭ в относительных единицах и позволял документировать результаты анализа в виде электронных файлов или бумажных распечаток.

Положительным результатом, после нанесения образца, считали появление в аналитической зоне ИИХЭ различимой глазом окрашенной полосы красного цвета, что соответствовало показаниям прибора «Рефлеком» не менее $(0,9 \pm 0,2)$ отн.ед. и появление окрашенной полосы в контрольной зоне. При нанесении отрицательного контроля, или гетерологичных микроорганизмов, на поверхности аналитической мембраны ИИХЭ появлялась одна окрашенная полоса в контрольной зоне. При этом интенсивность окрашивания, измеренная прибором, контрольной зоны была $2,0 - 3,6$ отн. ед., а интенсивность окрашивания аналитической зоны не превышала $0,1 \pm 0,1$ отн. ед. Измерения для каждой концентрации микробных клеток и отрицательных контролей проводили пятикратно, вычисляли среднее арифметическое показаний прибора. Среднеквадратическое отклонение при 95 % доверительной вероятности не превышало 0,2 отн. ед.

Результаты и обсуждение

Специфическая активность (чувствительность) и специфичность по отношению к легионеллам других серогрупп, для разработанных ИИХЭ, приведены в табл. 1 и 2. Для удобства нами была предложена шкала оценки интенсивности окраски аналитической и контрольной зон ИИХЭ при визуальном наблюдении оператором:

отрицательный результат анализа (-), в образ-

Таблица 1

Чувствительность ИИХЭ для выявления возбудителя болезни легионеров 1-й серогруппы на легионеллах первой серогруппы

Наименование культуры легионелл	Концентрация клеток, м.к./мл							
	0	$2,5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^7$
<i>L. pneumophila</i> Sg1-Philadelphia-1	- (0/2,5)	- (0,3/2,1)	- (0,4/2,4)	+	++	+++	+++	+++
<i>L. pneumophila</i> Sg1-Pyshma-1	- (0/2,0)	- (0,4/2,5)	- (0,6/2,5)	+	++	++	+++	+++
<i>L. pneumophila</i> Sg1-Bellingham-1	- (0/2,3)	- (0,3/2,5)	- (0,6/2,3)	+	+	++	+++	+++
<i>L. pneumophila</i> Sg1-Flint-1	- (0/2,5)	- (0,4/2,3)	- (0,5/2,1)	-	+	++	+++	+++
<i>L. pneumophila</i> Sg1-Pyshma-2	- (0/3,0)	- (0/1,9)	- (0/2,3)	-	+	++	+++	+++

Здесь и в табл. 2. В верхней строке ячеек таблицы приведены данные визуальной оценки концентрации оператором, в скобках дана интенсивность окрашивания «аналитической зона/контрольная зона», измеренная прибором «Рефлеком», в отн. ед.; «н.д.» – нет данных.

Таблица 2

Перекрестные реакции ИИХЭ для выявления возбудителя болезни легионеров 1-й серогруппы с разными видами легионелл

Наименование культуры легионелл	Концентрация клеток, м.к./мл.							
	0	2,5·10 ⁴	5·10 ⁴	1·10 ⁵	2,5·10 ⁵	5·10 ⁵	1·10 ⁶	1·10 ⁷
<i>L. pneumophila</i> , другие серогруппы								
<i>L. pneumophila</i> Sg6-Chicago-2	- (0/3,0)	н.д.	н.д.	- (0/2,4)	- (0/2,5)	- (0/1,8)	- (0/3,6)	- (0/2,4)
<i>L. pneumophila</i> Sg8-Concord-3	- (0/2,0)	н.д.	н.д.	- (0/2,6)	- (0,1/2,1)	- (0/2,2)	- (0/3,5)	- (0,1/2,1)
Легионеллы других видов, псевдомонады, стафилококки и клебсиеллы								
<i>L. anisa</i> WA-316-C3	- (0/2,4)	н.д.	н.д.	- (0/1,8)	- (0/2,4)	- (0/2,2)	- (0/2,6)	- (0/2,4)
<i>L. longbeachae</i> Sg1-Long Beach-4	- (0/2,7)	н.д.	н.д.	- (0/2,3)	- (0/2,2)	- (0/2,4)	- (0/3,0)	- (0/2,6)
<i>L. gratiana</i> Pyshma-7	- (0/3,1)	н.д.	н.д.	- (0/2,5)	- (0/2,0)	- (0/2,7)	- (0/2,0)	- (0/3,1)
<i>Klebsiella</i> spp.	- (0/1,9)	н.д.	н.д.	- (0/1,9)	- (0/2,3)	- (0/2,0)	- (0/2,5)	- (0/2,3)
<i>St. aureus</i>	- (0/2,2)	н.д.	н.д.	- (0/2,3)	- (0/2,2)	- (0/2,3)	- (0/3,1)	- (0/2,5)
<i>Ps. aeruginosa</i>	- (0/2,0)	н.д.	н.д.	- (0/2,5)	- (0/2,0)	- (0/2,8)	- (0/2,1)	- (0/3,0)

це отсутствуют или находятся в концентрации ниже порога чувствительности клетки *L. pneumophila* Sg1 – отсутствие окрашенной линии в аналитической зоне;

положительный результат анализа (+), в образце присутствуют клетки *L. pneumophila* Sg1 – слегка заметная окрашенная линия в аналитической зоне, (++) – хорошо заметная окрашенная линия в аналитической зоне, (+++) – интенсивная окрашенная линия в аналитической зоне. Визуальная оценка результатов иммунохроматографического анализа, в целом, коррелировала с показаниями прибора «Рефлеком», и как видно из табл. 1, градация визуальной шкалы (+) соответствовала 1·10⁵ м.к./мл и 2,5·10⁵ м.к./мл для различных штаммов *L. pneumophila* первой серогруппы. Применение видеоцифрового метода анализа не увеличило в данном случае чувствительности обнаружения легионелл, по сравнению с визуальным наблюдением результата оператором. Однако, по нашему мнению, видеоцифровой метод позволяет уменьшить такие факторы субъективности при оценке результата человеком, как освещенность рабочего места, усталость оператора или индивидуальные особенности восприятия цветов и насыщенности линий иммунохроматограммы

По чувствительности иммунохроматографический метод анализа не уступает иммуносуспензионным методам и МФА, но значительно выигрывает по времени анализа (в несколько раз быстрее), простоте и технологичности постановки анализа. Индикационный эффект наблюдался для легионелл первой серогруппы при наличии в пробе объемом 120 мкл, наносимой на индикаторный элемент, 12–30 тыс. м.к.

Помимо высокой чувствительности, сравнимой с чувствительностью РНГА и МФА, ИИХЭ для вы-

явления возбудителей болезни легионеров первой серогруппы обладали высокой специфичностью по отношению к легионеллам других серогрупп, а также по отношению к гетерологичным микроорганизмам (*Klebsiella* spp., *St. aureus*, *Ps. aeruginosa*), взятым в концентрации 1·10⁷ м.к./мл (табл. 2), т.е. в стократном избытке по сравнению с минимально выявляемой концентрацией легионелл первой серогруппы.

При анализе водных проб, взятых из водоемов, необходимо предварительное физическое концентрирование и микробиологическое культивирование [2], т.к. исходная концентрация легионелл находится ниже предела чувствительности иммунохимических методов при проведении анализа без пробоподготовок. Однако высокая специфичность, простота процедуры и малое время (20–25 мин) собственно иммунохроматографического анализа являются определенным преимуществом при санитарно-гигиенических анализах воды.

Короткое время анализа, отсутствие дополнительных технологических операций (промывка, инкубация, дозированное внесение реагентов) визуальная и приборная регистрация позволяют рассматривать иммунохроматографический анализ возбудителя легионеллеза как перспективный метод для внелабораторной индикации и идентификации этого патогена, при мониторинге объектов окружающей среды на наличие патогенных штаммов *L. pneumophila*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бызова Н.А., Ярков С.П., Злобин В.Н. и др. Разработка иммунохроматографического экспресс-теста для выявления микробиоциноза. Физиология и патология иммунной системы. 2005; 8:41–5.
2. Опищенко Г.Г. Методические указания по выявлению бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды. МУК 4.2. 2217-07. М.; 2007.

3. Тартаковский И.С. Возбудители атипичных пневмоний: роль в этиологической структуре пневмоний и особенности лабораторной диагностики. Клини. микробиол. и антимикробная химиотерапия. 2003; 5:9–17.

4. Яков С.П., Третьяков С.И., Башарова Л.А., Злобин В.Н. Индикация возбудителей особо опасных заболеваний с помощью иммунохроматографии и видеоцифрового анализа. Вестник РАМН. 2007; 12:22–6.

5. Яков С.П., Третьяков С.И., Башарова Л.А., Тартаковский И.С., Карпова Т.И., Дронина Ю.Е. Разработка технических средств иммунохроматографического анализа для выявления возбудителя легионеллеза. Матер. IX Межгос. науч.-практ. конф. Волгоград; 2008. С. 160–1.

6. King D.V., Luna V., Cannons A., Cattani J., Amoso P. Performance assessment of three commercial assays for direct detection of *Bacillus anthracis* spores. J. Clin. Microbiol. 2003; 41: 3454–5.

Об авторах:

Яков С.П., Третьяков С.И., Башарова Л.А., Бровкина А.Н., Злобин В.Н. Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения. 125424, Москва, Волоколамское шоссе, 75, к. 1. Тел./факс: 491-73-72. E-mail: niibp@dol.ru

Тартаковский И.С. Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи. 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18. E-mail: info@riem.ru

S.P.Yakov, S.I.Tret'yakov, L.A.Basharova, A.N.Brovkina, V.N.Zlobin, I.S.Tartakovskiy

Legionellosis Agent Indication Using Immunochromatography with Visual and Digital Video Detection

State Research Institute of Biological Instrumentation, Moscow;
N.F.Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology,
Moscow

Proposed was the immunochromatographic express-test for legionellosis agent detection in water environment. The method is high-sensitive and specific allowing to detect only first serogroup of legionellosis agent. That is of high importance for identification of isolated cultures of legionella and monitoring of *Legionella pneumophila* presence in environment objects.

Key words: immunochromatography, indication, *Legionella pneumophila*.

Authors:

Yakov S.P., Tret'yakov S.I., Basharova L.A., Brovkina A.N., Zlobin V.N. State Research Institute of Biological Instrumentation. 125424, Moscow, Volokolamskoe Shosse, 75, B. 1. E-mail: niibp@dol.ru

Tartakovskiy I.S. N.F.Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology. 123098, Moscow, Gamaleya St., 18. E-mail: info@riem.ru

Поступила 24.04.09.