24 ноября 2006 г.

ПОСТАНОВЛЕНИЕ № 176

Об утверждении Инструкции по

эпидемиологии, клинике, лечению,

лабораторной диагностике и

профилактике легионеллеза

В соответствии со статьей 37 Закона Республики Беларусь от 23 ноября 1993г. «О санитарно-эпидемическом благополучии населения» в редакции от 16 мая 2006г. №109-3 и в целях своевременной диагностики случаев заболеваний людей легионеллезом, организации и проведения мероприятий по профилактике этой инфекции ПОСТАНОВЛЯЮ:

1. Утвердить прилагаемую инструкцию по эпидемиологии, клинике, лечению, лабораторной диагностике и профилактике легионеллеза и ввести ее в действие на территории Республики Беларусь с 01 февраля 2007 г.

2. С момента введения в действие Инструкции по эпидемиологии, клинике, лечению, лабораторной диагностике и профилактике легионеллеза не применять на территории Республики Беларусь Методические рекомендации по эпидемиологии, клинике, лечению и профилактике легионеллеза, утвержденные заместителем министра здравоохранения СССР 08.02.1988г.

3. Главным государственным санитарным врачам данное постановление довести до сведения всех заинтересованных.

М.И.Римжа

УТВЕРЖДЕНО

Постановление

Главного государственного

санитарного врача

Республики Беларусь

 24.11.2006 № 176

ИНСТРУКЦИЯ

по эпидемиологии, клинике, лечению, лабораторной диагностике и профилактике легионеллеза.

## ГЛАВА I

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Инструкция предназначена для специалистов органов и учреждений государственного санитарного надзора, организаций здравоохранения, осуществляющих диагностические, противоэпидемические и профилактические мероприятия в отношении легионеллезной инфекции.

## ГЛАВА II

## ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

2. Эпидемиологический надзор за легионеллезной инфекцией направлен на:

обеспечение своевременной диагностики и выявление вспышечных и спорадических случаев заболевания;

своевременное проведение противоэпидемических мероприятий;

разработку и внедрение эффективных методов профилактики легионеллезной инфекции.

3. Организационно-методическое руководство работой по эпидемиологическому надзору за легионеллезной инфекцией осуществляют ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», областные центры гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья и Минский городской центр гигиены и эпидемиологии, научное сопровождение - ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии».

Организационно - методическое руководство по вопросам клинической диагностики и лечения легионеллеза осуществляет кафедра инфекционных болезней ГВУУ «Белорусский государственный медицинский университет».

## ГЛАВА III

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕГИОННЕЛЕЗА

4. Легионеллез - острая инфекционная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, выраженной общей интоксикацией, тяжелым течением, поражением легких, ЦНС, органов пищеварения.

Вспышки и спорадические случаи легионеллезной инфекции зарегистрированы в большинстве стран Европы, Южной и Северной Америки, в Африке, Азии, Австралии, что свидетельствует о достаточно широком и практически повсеместном ее распространении.

Известны 3 основные клинические формы легионеллеза:

Болезнь легионеров - тяжелая, острая пневмония; описаны спорадические случаи и вспышки заболевания, в том числе внутрибольничные. При этиотропном лечении летальность достигает 10-12%, при внутрибольничных вспышках - до 30-40%.

Респираторная лихорадка (лихорадка Понтиак) - более редкая форма с различной тяжестью проявления, без летальных исходов, наносит значительный социально-экономический ущерб, так как все известные вспышки имели место на промышленных предприятиях или в учреждениях.

Лихорадка Форт-Брагг - характеризуется лихорадкой, кожным зудом, сменяющимся полиморфной сыпью (на животе, бедрах, предплечьях). Заболевание обычно через 3-7 дней завершается выздоровлением.

5. Возбудитель легионеллеза относят к роду Legionella, семейству Legionellaceae.

Известны более 40 видов легионелл (приложение 1), для 22 из которых доказана их роль в инфекционной патологии человека. Более 90% случаев болезни ассоциированы с видом L.pneumophila. Среди других видов легионелл чаще всего заболевание вызывают, как правило, при нарушениях клеточного иммунитета и/или на коморбидном фоне виды L.micdadei*,* L.longbeuchae, L.dumoffii и L.bozemanii.

Легионеллы представляют собой грамотрицательную палочку диаметром 0,5–0,7 мкм и длиной 2–5 мкм. В ряде случаев встречаются нитевидные формы длиной до 20–25 мкм. Они не образуют эндоспор, микроцист и капсул, растут в аэробных условиях.

Микроорганизм подвижен за счет одного, двух или большего числа жгутиков. Легионеллы не ферментируют углеводы, разжижают желатин, не образуют уреазу, не восстанавливают нитраты. Результаты теста на каталазу положительны, на оксидазу – вариабельны.

 Легионеллы не растут на обычных питательных средах (кровяном агаре, агаре MacConkey и др.), что связано с потребностью возбудителя в L-цистеине и в растворимом пирофосфате железа (Fe++). Для выделения используют модификации буферного угольно-дрожжевого агара, содержащего L-цистеин, растворимый пирофосфат железа и кетоглутаровую кислоту (среда ВСYЕ). Все виды легионелл растут во влажной атмосфере при температуре 35oС. Рост некоторых видов стимулирует присутствие 2,5–3% СО2. Колонии легионелл вырастают при первичном выделении в течение 3–5 сут. Молодые колонии обычно имеют вросший центр, гранулярную или блестящую поверхность

Легионеллы – факультативные внутриклеточные паразиты. В организме человека они размножаются преимущественно в альвеолярных макрофагах, полиморфно-ядерных нейтрофилах и моноцитах крови. Вследствие ингаляции микробного аэрозоля или аспирации легионеллы попадают в легкие, где и происходит их контакт с альвеолярными макрофагами, что приводит к разрушению последних и выходу большого количества бактерий в легочную ткань. Многократно повторяемый цикл взаимодействия легионелл с макрофагами легких обусловливает накопление возбудителя в высокой концентрации и развитие острого воспалительного процесса, характерного для классической болезни легионеров.

6. В качестве факторов патогенности легионелл, играющих роль на различных этапах взаимодействия с эукариотической клеткой, описан широкий спектр ферментов, цитотоксинов, поверхностных белков: mip белок, главный белок внешней мембраны, цитолизин (главный секреторный белок), липиполисахарид, низкомолекулярные токсины, фосфолипаза С, протеинкиназа и кислая фосфатаза.

7. В природных условиях легионеллы обитают в пресноводных водоемах, где они являются симбионтами сине-зеленых водорослей, паразитируют в водных и почвенных амебах, инфузориях и других простейших. Размножение легионелл активно идет в теплой воде, хотя их выделяют и из холодной воды. Высокие адаптивные способности легионелл позволяют им успешно колонизировать искусственные водоемы – системы охлаждения, градирни, компрессорные устройства, душевые установки, оборудование для респираторной терапии и другие. Условия для выживания легионелл в искусственных сооружениях более благоприятны, чем в естественных, что приводит к накоплению в них возбудителя в высокой концентрации. Легионеллы активно колонизируют синтетические и резиновые поверхности водопроводного, промышленного, медицинского оборудования, с образованием так называемых "биопленок", в которых легионеллы значительно более устойчивы к действию дезинфицирующих веществ.

Легионеллы устойчивы в окружающей среде: в жидкой среде при температуре 25º С может сохраняться 112 дней, при 4º С - 150 дней. Под воздействием 1 % раствора формалина, 70 % этилового спирта, 0,2 % раствора фенола возбудитель гибнет в течение 1 мин, а в 3 % растворе хлорамина - за 10 мин. Для дезинфекции воды используют гипохлорит кальция в концентрации 3,3 мг свободного хлора на 1 л.

8. Легионеллез является типичным примером техногенных инфекций, обусловленных активным использованием в промышленности циркулирующих замкнутых водных систем, источников бактериального аэрозоля. Эпидемиологический анализ вспышек легионеллеза свидетельствует, что к резервуарам инфекции могут быть отнесены воды замкнутых систем охлаждения, термальных водоемов, промышленных и энергетических объектов. Легионеллы выделяют из объектов с широким диапазоном температуры - от 4°С до 63°С, однако, наиболее высокая концентрация легионелл и частота выделения возбудителя характерна для вод с температурой от 30°С до 50°С. Сочетание высокой концентрации легионелл в водной среде с источником мелкодисперсного аэрозоля позволяет возбудителю попасть в респираторные отделы легких, где происходит контакт с альвеолярными макрофагами, в которых вирулентные штаммы активно размножаются. Отсутствие рецепторов, позволяющих легионеллам "закрепиться" в клетках мерцательного эпителия слизистой оболочки дыхательных путей, объясняет отсутствие контагиозности при легионеллезе.

9. Путь передачи легионеллезной инфекции – воздушно-капельный, а основной фактор передачи – мелкодисперсный аэрозоль. Практически все крупные эпидемические вспышки и многие спорадические случаи легионеллеза связаны с распространением мелкодисперсного аэрозоля, содержащего легионеллы и генерируемого бытовыми, медицинскими или промышленными водными системами. Зону распространения аэрозоля, содержащего легионеллы, можно считать очагом инфекции. Среди лиц со сниженной иммунологической реактивностью на фоне сопутствующих заболеваний, иммуносупрессивной терапии, возможны случаи спорадических заболеваний или отдельные нозокомиальные вспышки не только от водных аэрозолей, но и при заглатывании воды, контаминированной легионеллами.

Имеются косвенные подтверждения, что пыль, образующаяся при проведении строительных и земляных работ и содержащая легионеллы, может переноситься на значительные расстояния и являться факторами передачи инфекции.

При анализе эпидемической заболеваемости показано, что болезнь легионеров (легионеллезная пневмония) развивается у 5–10% лиц, находившихся в зоне действия контаминированного легионеллами аэрозоля. Лихорадка Понтиак (острое респираторное заболевание легионеллезной природы) поражает 80–100% таких лиц, а 0,5–4% всех случаев пневмонии, требующей госпитализации, представлены болезнью легионеров.

Спорадический легионеллез выявляют, как правило, у лиц среднего и пожилого возраста на фоне действия факторов риска. Легионеллезные пневмонии составляют 2–6% от общего числа пневмоний и 10–15% от, так называемых, атипичных пневмоний, вызываемых микоплазмами, хламидиями, легионеллами и коксиеллами. У детей легионеллез выявляют редко, обычно на фоне сопутствующих заболеваний.

Факторами риска развития легионеллезной инфекции являются курение, наличие хронического бронхита курильщиков, злоупотребление алкоголем, хронические заболевания респираторного тракта, тяжелые соматические болезни (лейкозы, злокачественные опухоли, сахарный диабет, патология почек и другие, иммунодепрессивная терапия и иммунодефицитные состояния, пожилой возраст (55-60 лет), частые путешествия и проживания в гостиницах, участие в земляных и строительных работах, тесный контакт с системами кондиционирования и охлаждения воздуха. Для контингентов групп риска показана возможность передачи инфекции при респираторной терапии или алиментарным путем (через питьевую воду).

При вспышках на промышленных предприятиях необходимо учитывать профессиональную вредность, поскольку длительное воздействие химических веществ может повлиять на общую резистентность организма и вызвать более тяжелый клинический вариант легионеллезной инфекции.

10. Легионеллезная инфекция регистрируется круглогодично, но пик заболеваемости приходится на летние и весенние месяцы года. Возраст больных легионеллезом колеблется от 2-х до 78 лет, при этом 50% случаев приходится на возраст от 36 до 60 лет.

Эпидемические вспышки и спорадические случаи легионеллеза преимущественно возникают среди посетителей и персонала гостиниц, больниц, учреждений, промышленных предприятий.

В последние годы особое значение придается проблеме легионеллеза, возникающего во время путешествий и диагностируемого, как правило, по возвращению из них. Более 30% случаев спорадического легионеллеза, многочисленные эпидемические вспышки в гостиницах, нередко с летальным исходом, послужили основой создания единой международной системы эпидемиологического надзора за случаями легионеллеза, связанного с поездками.

Риск возникновения нозокомиального легионеллеза определяется не только возможностью контаминации легионеллами систем водоснабжения, кондиционирования, медицинского оборудования, но и наличием чувствительных к инфекции лиц с нарушениями клеточного иммунитета. В отделениях онкологии или трансплантации органов при контаминации легионеллами водных систем частота легионеллеза в этиологической структуре нозокомиальных пневмоний составляет 15–20%, а летальность – 30–40%. Помимо L.pneumophila внутрибольничную инфекцию нижних дыхательных путей часто вызывает вид L.micdadei.

## ГЛАВА IV

## КЛИНИКА ЛЕГИОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

11. Основной клинический синдром легионеллезной инфекции обусловлен поражением респираторного тракта и представлен тремя клиническими формами заболевания: острая пневмония, острый альвеолит и острый бронхит. Инкубационный период длится в среднем от 2 до 10 дней. В это время больные отмечают повышенную утомляемость, анорексию, умеренную головную боль, диарею, не связанную с погрешностями в питании. Признаки наличия респираторной инфекции, как правило, отсутствуют. Температура часто в этот период остается нормальной или субфебрильной (до 37,5° С). Болезнь начинается остро, резкое ухудшение общего состояния сопровождается недомоганием, ознобом, головной болью, интенсивными болями в мышцах, повышением температуры до 39-40° С.

При тяжелом клиническом течении и неадекватной терапии лихорадка может иметь затяжной характер и сохраняться до 2-х и более недель. В первые дни болезни в большинстве случаев появляются боли в груди, усиливающиеся при кашле и глубоком дыхании, которые наблюдаются у 50-60% больных легионеллезом. Кашель является наиболее частым симптомом легионеллезной инфекции, появляется в первые 2-3 дня болезни у 80-90% больных. Кашель в начале сухой, но у половины больных он становится продуктивным, мокрота скудная, вязкая, имеет слизисто-гнойный характер. Одышка регистрируется практически во всех случаях среднетяжелого и тяжелого течения болезни. Число дыханий достигает 25-50 в минуту. Легионеллез нередко осложняется развитием острой дыхательной недостаточности, почти всегда требующей оксигенотерапии. У 20% больных возникает необходимость искусственной вентиляции легких. Такие случаи часто заканчиваются летально.

Кровохарканье нетипично для легионеллезной инфекции и отмечается менее чем у 30% больных.

12. При объективном обследований больных определяется притупление перкуторного звука над пораженной зоной легкого, что указывает на преимущественную локализацию воспалительных очагов в базальных сегментах на глубине 4-5 см. Над пораженной областью легкого выслушивается бронхиальное дыхание. При аускулътации в легких выявляются участки ослабленного дыхания, влажные мелкопузырчатые хрипы. Сопутствующие сухие хрипы отмечаются примерно у 50% больных легионеллезной пневмонией.

13. Рентгенологическая картина поражения легких при легионеллезе характеризуется двумя формами: односторонняя плевропневмония и двусторонняя очагово-интерстициальная пневмония. Односторонние инфильтраты встречаются в 50% случаев, причем чаще справа.

Абсцедирование, каверны, другие виды легочной деструкции нетипичны для легионеллеза.

Дифференциальным рентгенологическим признаком легионеллезной пневмонии является длительное сохранение воспалительной инфильтрации и плевральных изменений, которые даже на фоне этиотропной терапии могут сохраняться в течение 3-х месяцев. Примерно у трети больных пневмония завершается переходом в очаговый пневмосклероз.

В начале болезни в большинстве случаев отмечается гипотония и относительная брадикардия (ЧСС =100 при Т° - 39,4° С). Однако для легионеллеза, как и для других бактериальных инфекций, более характерна тенденция к тахикардии. Тоны сердца всегда приглушены.

Проявлением тяжелой интоксикации организма при легионеллезной инфекции могут быть нарушения со стороны мышц, костно-суставного аппарата, поражения почек в виде острого очагового нефрита, острого канальцевого некроза, приводящего к прогрессирующей точечной недостаточности, нередко заканчивающейся летальностью.

С достаточной частотой у больных легионеллезом отмечаются расстройства желудочно-кишечного тракта. Наиболее типичными проявлениями таких расстройств являются рвота (до 23%). Весьма редко могут наблюдаться желудочно-кишечные кровотечения, развитие острого панкреатита, острого аппендицита, острой кишечной непроходимости, желтухи.

Почти все больные легионеллезом жалуются на нарушение со стороны центральной нервной системы. Наиболее частыми симптомами являются головокружение и бессонница. Нередко развивается диффузная токсическая энцефалопатия, сопровождающаяся явлениями психоза с нарушением сознания, бредом, галлюцинациями. Главными мишенями легионеллезного токсина являются стволовая часть головного мозга и мозжечок, при этом может нарушаться координация движений, появляться дизартрия и атаксия, нистагм. Среди наиболее тяжелых неврологических расстройств отмечают мозговую кому и эпистатус.

14. Лабораторные показатели при легионеллезе и морфологическая оценка инфекции.

Анализ крови. Лейкоцитоз характерен для 50-75% больных легионеллезом в начале заболевания. Содержание лейкоцитов выше 10.000/мл выявляется у 25%больных; 15-20000/мл - у половины больных. Нейтрофилез с характерным сдвигом формулы влево встречается более чем у 80% больных легионеллезом.

Достаточно типичным для легионеллеза считается относительная лимфопения **(**1000/мл), которая отмечается у 2/3 больных, и значительное ускорение СОЭ (до 100 мм/ч).

Биохимические параметры.

Гипонатриемия (130 мм/л) наблюдается в начале заболевания у 50-60% больных. Титры ферментов печени (АЛТ, ACT) повышены у 50-75%, гипоальбуминемия и гипофосфатемия регистрируются, соответственно, у 65% и 50%больных.

Анализ мочи. Развитие протеинурии, чаще следовой, выявляется в 50%случаев, что обусловлено лихорадкой и очаговым нефритом. Микрогематурия встречается у 30 – 50% больных.

Анализ мокроты и плевральной жидкости.

В скудной мокроте, характер которой определяется как слизистный или слизисто-гнойный, обнаруживается большое количество нейтрофилов и альвеолярных макрофагов. Обычная окраска мокроты по Граму не позволяет обнаружить или хотя бы заподозрить легионеллу.

Цитограмма плевральной жидкости носит черты воспалительного экссудата с большим содержанием полиморфно-ядерных лейкоцитов. В отдельных случаях возможно выделение возбудителя из плеврального экссудата или его обнаружение методом прямой иммунофлюоресценции, что помогает верифицировать диагноз легионеллеза.

15. При патологоанатомическом исследовании выявляется различная степень консолидации легочной ткани на стадии красного или серого опеченения. Деструкция легких в целом нетипична для легионеллеза. Выпот в плевральную полость, серозного или серозно-геморрагического характера обнаруживается почти при всех летальных случаях легионеллеза, тогда как эмпиема плевры встречается крайне редко.

Наиболее типичными микроскопическими признаками легионеллеза является макрофагальная и нейтрофильная инфильтрация альвеол, которая сопровождается образованием фибрина и экстравазацией эритроцитов.

16. Дифференциально-диагностическим морфологическим признаком легионеллезной пневмонии служит коагуляционный некроз и септальный отек альвеол без выраженного гнойно-деструктивного процесса в ткани легких. Дифференциальным патоцитологическим признаком легионеллеза является персистенция возбудителя в макрофагах, что, по мнению многих исследователей, объясняет случаи рецидивов инфекции.

## 17. Особенности различных форм легионеллеза.

Ведущей клинической формой легионеллезной инфекции является легочная (собственно болезнь легионеров).

Легионеллезная пневмония характеризуется следующими клиническими особенностями: высокая лихорадка, тяжелое течение, отсутствие поражения верхних дыхательных путей в начале и продроме заболевания, разнообразие локализаций легочного поражения, частое развитие тотальных и субтотальных поражений легкого, плеврита и внелегочных проявлений инфекции (токсическая диффузная энцефалопатия, миалгия и полиартралгия, диарея, поражение почек, сердца), наличие нейрофилеза, лимфопении, гипоальбуминемии, гипонатриемии, повышения титров АЛТ, ACT, КФК, микрогематурии, протеинурии.

В дополнение к указанным клинико-лабораторным и рентгенологическим особенностям для дифференциации легионеллеза от других заболеваний необходимо учитывать эпидемиологический анамнез и наличие факторов риска: средний и пожилой возраст, весенне-летний период развития болезни, факт путешествий, проживание в гостиницах, контакты с землей, пресными водоемами, системами принудительной вентиляции и водяного отопления, участие в строительных работах, наличие в анамнезе различных соматических заболеваний (хронические неспецифические заболевания легких, сахарный диабет, коллагенозы, лимфо-пролиферативные заболевания), употребление алкоголя, курение и пр.

Дифференциальный диагноз проводится с микоплазма-пневмонией, пситтакозом, Ку-лихорадкой, туляремией, цитомегаловирусной и пневмококковой пневмонией.

Острый альвеолит.

Легионеллез относится к первично-альвеолярным инфекциям, и развитие альвеолита является отражением особенностей аэродинамики возбудителя, диффузно поражающего альвеолы. Микробный аэрозоль диаметром 0,5-2 мкм способен достигать терминальных бронхиол и альвеол, откуда его клиренс невозможен из-за отсутствия цилиарного аппарата. Основным патогенетическим механизмом, определяющим картину болезни при легионеллезном альвеолите, является отек и уплотнение межальвеолярных перегородок и окружающего интерстиция, а также клеточная экссудация в альвеолы.

Общим для клинического течения легионеллезного альвеолита и пневмонии является острое начало заболевания с высокой лихорадкой и астеническим синдромом. Для всех больных альвеолитом типичны жалобы на прогрессирующую одышку смешанного типа, давящие боли за грудиной, имитирующие стенокардию, сухой, реже малопродуктивный кашель. При аускультации легких выявляется патогномоничный для альвеолита аукустический признак - распространенная двусторонняя крепитация, лучше выслушиваемая в симметричных базальных отделах легких. Альвеолярная крепитация, иногда называемая "целлофановой", по своим акустическим характеристикам легко отличима от влажных хрипов при пневмонии. Крепитация обусловлена преимущественным распределением пораженных альвеол в основаниях легких под влиянием генерализованного повышения проницаемости капилляров при легионеллезном альвеолите.

В отличие от пневмонии при легионеллезных альвеолитах неотмечено очагово-инфильтративных и плевральных изменений. Двустороннее ограничение стояния куполов диафрагмы является характерным рентгенологическим признаком алъвеолитов.

Другим дифференциально-диагностическим критерием альвеолита считают нарушение вентиляционной функции легких преимущественно по рестриктивному типу. Снижение жизненной и общей емкости легких при легионеллезном альвеолите связано с изменением эластичности легких и частичным коллапсом базальных сегментов.

Отличий в лабораторных показателях при острой легионеллезной пневмонии и альвеолите не обнаружено.

Легионеллезный альвеолит манифестирует, как правило, тяжелый вариант легионеллезной инфекции, и регистрируется в виде спорадических случаев или ограниченных вспышек. При изучении рентгенограммы больных с легионеллезнымальвеолитом выявляются признаки легочного васкулита, нередко и сопутствующая реакция плевры.

Лихорадка Понтиак.

Непневмоническая форма легионеллеза - лихорадка Понтиак. Ретроспективный анализ сывороток от заболевших в эту эпидемию позволил установить легионеллезную этиологию заболевания. Клиническая картина болезни представлена гриппоподобным симптомокомплексом: 1-2-дневная лихорадка (до 40° С) с ознобом, сухим кашлем, катаральными явлениями в носоглотке (30% больных). Инкубационный период болезни составляет 36-48 часов. Несмотря на развивающуюся при понтиакской лихорадке респираторную и нереспираторную симптоматику (головная боль и головокружение - 50-60%;миалгия - до 30%; диарея- 25%); заболевание протекает в легкой форме и заканчивается в короткие сроки (2-7 дней). Летальные исходы при понтиакской лихорадке не зарегистрированы. Эта форма легионеллеза выявляется исключительно в эпидемическом варианте. Эпидемические вспышки понтиакской лихорадки нередко несут за собой так называемый пневмонический шлейф (обусловленный суперинфекцией распространенными бактериальными возбудителями, колонизирующими верхние дыхательные пути) – до 10% случаев.

Аналогом понтиакской лихорадки является острый бронхит, который имеет сходные клинические признаки.

Носительство и персистенция легионелл в организме человека не отмечены.

18. Диагноз легионеллеза в настоящее время устанавливается с учетом данных эпидемиологического и клинического обследования на основе результатов лабораторных исследований, окончательно определяющих этиологию заболевания.

Лабораторная диагностика легионеллеза основана на трех методах:

серологический - использование реакций непрямой имму-нофлюореоценции, пассивной гемагглютинации, иммуноферментного анализа для выявления 4-х и более кратной сероконверсии;

выявление возбудителя в клиническом материале с помощью экспресс-методов;

выделение культуры возбудителя.

Выделение культур легионелл сопряжено со значительными трудностями, требует специальных условий работы и продолжительно по времени, поэтому при диагностике легионеллеза предпочтение отдается экспресс-методам обнаружения возбудителя и серологическим тестам.

19. При подозрении на легионеллез проводят эпидемиологическое обследование очага. Для сбора эпиданамнеза у больных рекомендуется использовать вопросник (приложение 2). Для выявления резервуара и возможных путей передачи инфекции проводится исследование образцов воды и смывов с поверхности предполагаемых мест размножения возбудителя: кондиционеров, увлажнителей, охлаждающих башен-градирен, компрессорных устройств, термальных водоемов промышленных и энергетических объектов, водопроводного и лабораторного оборудования.

## ГЛАВА V

## ЭТИОТРОПНАЯ И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Антимикробная терапия легионеллезной инфекции должна проводится с учетом следующих особенностей инфекции:

внутриклеточное размножение бактерий и их локализация в «непереваривающей» фагосоме. Данное свойство предохраняет легионеллы от воздействия антибиотиков, накапливающихся экстрацеллюлярно;

эрадикация легионелл не может быть достигнута одними лишь клетками неспецифической противоинфекционной защиты (полиморфно-ядерные лейкоциты, макрофаги), независимо от того активны они или нет. Это свойство объясняет тот факт, что у части больных с иммунологическими нарушениями отмечается рецидив легионеллезной инфекции тотчас после прекращения антибактериальной терапии.

20. Эффективность антибактериальной терапии следует оценивать по традиционным критериям: нормализация или значительное снижение температуры в первые 48 часов от начала лечения, улучшение клинического состояния больного, положительная аускультативная динамика в виде уменьшения количества, распространенности и звучности хрипов и крепитации.

Антибиотиком, используемым при лечении легионеллеза, является эритромицин. Суточная доза при легком течении заболевания составляет 2,0 г. (0,5 х 4) препарата для перорального приема. Терапия должна быть начата при наличии подозрения на легионеллез и, при получении клинического эффекта, продолжена в зависимости от результата лабораторного исследования.

Длительность курса антибактериальной терапии при ее эффективности составляет в среднем 10-12 дней. При средне-тяжелом и тяжелом течении заболевания, как правило, требуется введение эритромицина в больших дозах: 4,0 г/сутки (1,0 х 4) внутривенно. При недостаточном клиническом эффекте рационально сочетание эритромицина с рифампицином (суточная доза 1,2 г /0,6 х 2/). При стойкой нормализации температуры, ослаблении других клинических симптомов пневмонии целесообразно с 4-5 дня от начала лечения перейти с внутривенного на пероральный прием эритромицина с уменьшением дозировки (4,0-2,0 г/сутки). Продолжительность терапии определяется динамикой процесса и при средне-тяжелом и тяжелом вариантах течения колеблется в пределах от 2-х до 3-х недель. Однако, при необходимости (медленно развивающийся процесс в легких, стойкий субфебрилитет) курс лечения может продолжаться 1,5 – 2 месяца. Антибактериальная терапия эритромицином при его доказанной клинической эффективности и установленном лабораторном диагнозе легионеллеза при рецидиве инфекции может быть возобновлена. Там, где лечение эритромицином по разным причинам невозможно, рекомендуется применять доксициклин по следующей схеме: первое введение – 200 мг; чрез 12 часов – 100мг, далее ежедневно. Продолжительность курса – 10-14 дней. При среднетяжелом и тяжелом течении легионеллеза эффективно сочетание доксициклина и рифампицина. Считается неэффективной монотерапия рифампицином из-за быстроразвивающейся резистентности к препарату.

Отсутствие эффекта от лечения пенициллином и его полусинтетическими дериватами, а также цефалоспоринами может служить косвенным диагностическим признаком легионеллеза.

Возможно также интраплевральное применение препарата, которое показано при упорном фибринозно-гнойном плеврите или вторичной эмпиеме плевры. Однократное введение эритромицина в плевральную полость в дозе 250-500 мг поддерживает активную концентрацию препарата в течение 3-х дней.

Как для внутривенного, так и для интраплеврального введения применяется препарат - эритромицин фосфат, хорошо растворимый в воде и выпускаемый во флаконах по 100 мг. Для приема внутрь используется эритромицин в таблетках.

Следует подчеркнуть, что побочные явления при лечении эритромицином: тошнота, рвота, диарея – наблюдаются крайне редко. Частота аллергических реакций при лечении препаратом не превышает 0,5%.

Таким образом, ведущим препаратом для этиотропной терапии при всех клинических формах легионеллеза является эритромицин, суточная доза которого составляет 2,0-4,0 г, продолжительность приема – 14 дней.

Перспективным для антимикробной терапии легионеллеза считают новые синтетические препараты группы макролидов и производных оксихинолиновой кислоты (ревамицин).

Кортикостероиды показаны при развернутой клинической картине легионеллезного альвеолита, осложненного острой дыхательной недостаточностью. Минимальная начальная доза стероидов при лечении легионеллезного альвеолита составляет 30-40 мг/сутки в преднизолоновом эквиваленте.

Длительность стероидной терапии по снижающей схеме с отменой не превышает, как правило, 3-х недель, ввиду реального риска рецидива болезни легионеров при менее продолжительном лечении. В случаях, где легионеллез протекает в виде тяжелой острой пневмонии, с симптомами выраженной интоксикации, плевральным синдромом, артериальной гипотензией или коллапсом, стероидная терапия также необходима: преднизолон внутривенно до 240 мг/сутки 2 - 5 дней. Кортикостероиды рекомендуется применять короткими 5-10 дневными курсами в суточной дозе преднизолона 20 мг с отменой при легионеллезной пневмонии, осложненной парапневмоническим плевритом. Заслуживает внимание препарат презоцил, нашедший широкое применение в практике лечения острых пневмоний. Препарат представляет собой комбинацию преднизолона (0,75 мг), делагила (0,25 г) и аспирина (0,2 г.). Презоцил применяется по 2 табл. х 3-4/день в течение 12 – 14 дней с последующей отменой.

Обструктивные нарушения легочной вентиляции выявляются в 95% случаев пневмонии, особенно в острый период болезни. Поэтому целесообразно применение бронхолитиков при легионелла-пневмониях: теофедрин ½ таб. х 3/день в течение 12-14 дней.

При лечении легионеллеза нашел широкое применение специфический иммунокорректор метилурацил, который назначается вне острой фазы, как правило, со второй недели от начала лечения.

Из препаратов интерферона при лечении легионеллеза наибольшей эффективностью отличается лейкинферон. Применение лейкинферона 10000 ед. х 2/день первые 2-3 дня лечения; 10000 ед./день последующие 5-6 дней приводят к быстрому регрессу клинических проявлений болезни, сокращению сроков стационарного лечения.

При всех формах легионеллеза рекомендуется применение водорастворимой камфоры – сульфокамфокаин 20% 2,0-4,0 х 3/день, в/м, так как препарат способствует снижению легочной гипертензии.

Посиндромная терапия легионеллеза должна включать дезинтокскационные средства (гемодез, реополиглюкин), оксигенотерапию, трансфузии нативной плазмы и др. заменителей протеинов.

С дезагрегатной целью при тяжелом и средне-тяжелом течении инфекции показано применение гепарина и аспирина. При некротических процессах в легочной ткани целесообразно использование ингибиторов протеаз (контрикал, гордокс).

В каждом случае характер терапии определяется конкретной клинической ситуацией.

## ГЛАВА VI

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕГИОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

21. Диагностические исследования на легионеллез в регламентированном объеме проводятся лабораториями индикации возбудителей особо опасных инфекций ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» и областных центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья.

22. Организация и выполнение диагностических исследований на легионеллез в лабораториях должны осуществляться в соответствии с требованиями, регламентирующими:

безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности, вся работа по выделению и дифференциации легионелл из любого исследуемого материала должна проводиться в условиях, предупреждающих возможность инфицирования персонала и обсеменения возбудителем объектов внешней среды;

учет, хранение, передача и транспортировка микроорганизмов I-IV групп патогенности проводится согласно Руководству № 11-7-13-2002 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортировки микроорганизмов I-IV групп патогенности», утвержденному Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 30 декабря 2002 г.

Забор материала от больных с подозрением на легионеллез проводится медицинскими работниками инфекционного стационара.

23. Для лабораторной диагностики используют три основные группы методов:

серологические методы – реакция непрямой иммунофлюоресценции (далее РИФ), реакция иммуноферментного анализа (далее – ИФА). К недостаткам данного метода относится ретроспективный характер диагностики в связи с необходимостью отбора 2-й сыворотки на 2—3-ю неделю заболевания.

бактериологические методы - являются главными для окончательного ответа на вопрос о наличии вспышки легионеллезной инфекции.

экспресс - методы обнаружения возбудителя и его антигенов - получили наибольшее распространение для диагностики легионеллеза в связи с простотой их выполнения и доступностью для практических лабораторий.

### 24. Сбор и транспортировка материала от больных легионеллезом.

Сбор сывороток:

для получения сыворотки у больных берут в стерильные пробирки кровь из вены в количестве 3—5 мл в первые дни и на 14— 21-й день болезни (не ранее 10-го дня). После свертывания крови сгусток отслаивают от стекла стерильной пастеровской пипеткой и помещают на 12—16 часов при температуре +4°С или комнатной температуре. Отделившуюся сыворотку отсасывают в стерильную пробирку или запаивают в ампулы и хранят при температуре +4°С.

Мочу больных на 3—7-й день болезни собирают в стерильную емкость, а затем в количестве 3—5 мл помещают в стерильную пробирку, плотно закрытую резиновой пробкой для кратковременного хранения при температуре +4°С. Для длительного хранения материал замораживают.

Плевральный экссудат, материал бронхоскопии, полученный стерильно до 10-го дня болезни в количестве от 0,5 до 5 мл, помещают в стерильную пробирку, плотно закрытую резиновой пробкой, и хранят при температуре +4°С.

При сборе секционного материала образцы пораженных участков легочной ткани, печени и селезенки (по 2—3 кусочка размером 1x1 см) вырезают обработанными 70% спиртом и прожженными в пламени спиртовки инструментами, помещают в стерильные пробирки или флаконы, плотно закрывают резиновыми пробками.

Поверхность пробирок и флаконов обрабатывают дезинфицирующим раствором (70% спирт, 1% формалин, 2% хлорамин). Транспортировку материалов осуществляют в жестяных коробках с крышками или в металлических биксах в возможно короткие сроки. Для кратковременного хранения материал помещают при температуре +4°С. Длительное хранение материала (до 1 года) возможно лишь при температуре —70°С.

25. Отбор, транспортировка и подготовка к исследованию образцов внешней среды.

Отбор проб:

для исследования пробы воды берут из разнообразных естественных и искусственных водоемов: рек, ручьев, озер, прудов, мелиоративных каналов, сточных вод, термальных источников, а также из систем водоснабжения горячей и холодной водой, водных систем охлаждения, технологических циклов, емкостей для хранения воды, бассейнов и др.

Из одной точки необходимо брать по 2 и более пробы. Воду в количестве 1000 мл отбирают в стерильные бутыли, закрывают пробкой с бумажной прокладкой или резиновой пробкой, закрывают бумажным колпачком и обвязывают шпагатом. При большом количестве образцов во избежание трудностей, связанных с транспортировкой, объем образцов воды монет быть уменьшен до 100 мл. Бутыли с водой помещают в клеенчатые или полиэтиленовые мешки и упаковывают в ящик для доставки в лабораторию.

Отбор проб из крана. Перед тем, как приступить к спуску воды и отбору проб, следует снять с крана все дополнительные устройства, например, фильтры, вкладыши, предохраняющие от разбрызгивания, удлинители и т.п. Краны и наконечники труб, из которых отбираются пробы для микробиологических исследований, должны быть дезинфицированы, лучше всего путем обжигания огнем при использовании пропитанного спиртом ватного тампона. Если это невозможно, например, в случае отбора проб воды из труб, сделанных из синтетических материалов, наконечник трубы следует погрузить в 5 % (м/м) до 10 % раствор активного хлора либо другого дезинфицирующего средства. Краны для отбора проб должны содержаться в хорошем техническом состоянии, не пропускать воду возле дросселя, что могло бы вызвать проникновение в резервуар воды, текущей по наружной поверхности крана. Время спускания воды перед отбором пробы зависит от места и цели отбора пробы. Если целью отбора пробы является исследование влияния конструкционных материалов на качество воды, проба должна браться сразу же после открытия крана. Для большинства других целей условия стабилизируются лишь по истечении двух, трех минут спускания воды. При исследовании качества воды, поступающей из эксплуатационных, регулирующих резервуаров, водонагревателей и других устройств, пробы должны отбираться из подводящей и отводящей трубы, как можно ближе к резервуару либо устройству. Перед отбором такого рода пробы следует удалить воду, залегающую в трубах, позволив ей спокойно вытекать в течение двух-трех минут. Если этого времени будет недостаточно, следует рассчитать объем воды, который нужно вывести из трубопровода, и на этом основании рассчитать необходимое время промывки при соответствующей интенсивности течения. Примененное время промывки трубопровода должно быть в пять раз больше рассчитанного.

Объем отбираемых образцов зависит от типа водопроводной системы и цели выполняемых исследований, обычно он составляет от 250 мл до 1000 мл. Резервуар с пробой не следует заполнять полностью, после закрытия пробкой над поверхностью воды должно оставаться пространство с воздухом, которое позволит смешать образец перед выполнением исследования, а также предотвратит случайное уничтожение образца.

Для исследования также берут конденсат и смывы с внутренней поверхности кондиционеров, санитарно-технического и больничного оборудования, водопроводных кранов, головок душа, шлангов замкнутых водных систем охлаждения, емкостей для хранения воды, медицинских и бытовых приборов, связанных с распылением или разбрызгиванием, а также с открытых поверхностей в зданиях или в других местах предполагаемых вспышек или спорадических случаев легионеллеза.

Отбор проб производят с помощью стерильных ватных тампонов. Тампоны, увлаженные стерильным физиологическим раствором, проводят по поверхности и помещают в стерильную пробирку, содержащую 5 мл физиологического раствора. Помимо физиологического раствора для смывов можно использовать воду из анализируемой системы водоснабжения, предварительно профильтрованной через фильтры с диаметром пор 0,45 мм.

Условия хранения и транспортировки:

возбудитель хорошо сохраняется в водяной среде. Образцы воды, содержащие возбудитель в концентрации 103 клеток на литр, могут храниться в течение 3 месяцев при температуре 20 - 25° С. Смывы с поверхности могут храниться при тех же условиях в течение 30 дней. Рекомендуется, чтобы образцы перевозились при температуре менее 18°С, но не менее 6°С, чтобы они были защищены от тепла и солнечного света. Образцы должны доставляться в лабораторию как можно быстрее, желательно в течение 24 часов, но не позднее, чем в течение 72 часов. Кратковременные температурные изменения при транспортировке образцов в диапазоне от +4 до + 30° С не влияют на сохранность образцов.

Для последующих исследований образцы концентрируют. Образец может быть сконцентрирован непосредственно после отбора проб или после доставки в лабораторию на исследование. Предварительная концентрация упрощает доставку образцов для лабораторных исследований. Концентрированные образцы также можно хранить в течение 30 дней при +4° С.

Концентрация образцов:

для концентрации образцов применяют центрифугирование или фильтрацию: образцы предварительно фильтруют через 2-слойную марлю для освобождения от крупных частиц, после чего воду центрифугируют 20 минут при 7000-8000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 5 мл стерильного физиологического раствора или в том же объеме анализируемой воды, предварительно профильтрованной через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Для концентрации смывов и образцов воды объемом менее 20-30 мл может быть использована фильтрация через фильтры диаметром пор 0,22-0,3 мкм. Фильтры, хранятся в пробирках с 2-3 мл воды исследуемого образца.

Подготовка образцов к исследованию:

для инактивации посторонней микрофлоры концентрированный образец прогревают 30 мин при +50° С (или проводят обработку образца 0,1N раствором KCI-HCI /рН - 2,2/). После этого исследуемый материал высевают на угольно-дрожжевой агар с антибиотиками.

Инактивация проб.

По завершении исследований использованное оснащение, оставшиеся пробы воды, а также субстрата с изолированными микроорганизмами следует подвергнуть стерилизации в автоклаве при температуре 134°С в течение 20 минут.

26. Определение наличия бактерий рода легионелла в образцах из внешней среды.

Определение числа бактерий из рода легионелла в пробах воды можно выполнить методом поверхностного посева и/либо методом мембранной фильтрации (FM). Сокращение роста нежелательных бактерий в исследуемом образце достигается путем воздействия на исследуемый образец кислым буферным раствором. Аналитические пробы, подвергнутые и не подвергнутые предварительной обработке, высеваются на селективный субстрат агар-агара для легионелл и инкубируются. После инкубации характерные в морфологическом отношении колонии, выросшие на селективном субстрате, следует определять как предположительные легионеллы. Предполагаемые колонии подтверждаются путем определения ростовых требований в отношении L-цистеина и железа. При идентификации по виду необходимы дополнительные серологические тесты.

26.1. Метод поверхностного посева

Метод поверхностного посева применяется, прежде всего, в том случае, если ожидаемое число легионелл превышает 10 в литре. Этот тип проб может требовать разведения сцелью сокращения числа организмов, не являющихся легионеллами, и тем самым ограничения возможности их чрезмерного роста относительно более медленно растущих легионелл. Пробы могут разводиться жидкостью Рингера. Приготовленные растворы следует тщательно размешать, встряхнув их либо воспользовавшись микро встряхивающей машиной в течение не менее 2 минут. Привить как минимум по 3 пластинки с субстратом GVPC пробой объемом от 0,1 мл до 0,3 мл, не подвергавшейся обработке. Распределить жидкий инокулюм по всей поверхности пластинки, используя шпатель или петлю. Записать объем высеиваемого образца.

26.2. Метод мембранной фильтрации

Метод мембранной фильтрации применяется в случае исследований образцов неизвестного происхождения, а также в случае образцов с предполагаемым малым количеством бактерий легионелл. Чаще всего высеваются исследуемые образцы объемом 10, 100 и 500 мл. в случае многочисленной сопутствующей микрофлоры, существующей, например, в циклах охлаждающей воды, рекомендуется параллельное фильтрование меньших объемов воды, например, 1,0 мл либо 0,1 мл., если объем фильтрованного образца меньше 20 мл, в воронку аппарата, при закрытом кранике, следует влить около 20 мл жидкости Рингера, затем следует ввести исследуемый образец воды требуемого объема. Эта процедура позволит равномерно рассеять микроорганизмы в фильтруемом образце и сделает возможным равномерный рост колонии на мембранном фильтре. При фильтровании различных объемов проб воды всегда следует помнить о последовательности фильтрования от наименьшего до наибольшего объема пробы, тогда не возникает необходимость обжигания воронки фильтрационного аппарата во время очередного фильтрования того же самого образца. Воронку фильтрационного аппарата следует всегда обжигать перед фильтрованием новой пробы воды. После фильтрования определенного объема пробы воды через мембранный фильтр для сокращения сопутствующей микрофлоры при закрытом фильтрационном аппарате следует залить фильтр кислым буферным раствором с уровнем рН 2, 2 (10 мл). Через 10 минут инкубации следует открыть краник фильтрационного аппарата и промыть мембранный фильтр жидкостью Рингера, затем перенести его на чашку Петри с субстратом BCYE-a с селективной добавкой GVPC

26.3. Инкубация

Пластинки с посевами инкубировать при температуре 36 ± 1°С до 7 дней. Обеспечить соответствующую влажность в инкубаторе, поместив на дне термостата контейнер с водой.

Инкубация в атмосфере, содержащей 2, 5 % (объемная доля) двуокиси углерода может быть выгодна для роста некоторых видов легионелл, но это не обязательно.

26.4. Просмотр чашек

Чашки с посевами следует осматривать ежедневно. На дне чашек следует отметить цветным маркером все колонии. Которые выросли в течение 2 первых дней инкубации, это колонии сопутствующих микроорганизмов, бактерии рода легионелла растут медленно, и их рост в виде колонии может наблюдаться на применяемом субстрате чаще всего на третий день инкубации. Колонии бактерий, которые выросли в промежутке между 3 и 7 днем инкубации, после тщательного осмотра при использовании лупы и описании формы и цвета, следует пересадить для подтверждающих исследований. Колонии Legionella sp. как правило, белого, серого либо голубого цвета. Все колонии гладкие с острыми краями, имеют характерный стеклянистый блеск. Колонии некоторых видов легионелл в свете UV 366 нм проявляют автофлуоресценцию.

Рост колоний на мембранных фильтрах является более медленным, а колонии преимущественно меньше растущих непосредственно на поверхности субстрата.

26.5. Подтверждение колонии предполагаемых легионелл

Выбрать из каждой чашки с субстратом GVPC как минимум по три колонии из каждого типа, характерные для легионелл, и пересадить их на пластинки с субстратом BCYE-a (без селективных добавок) и BCYE-Cys (без цистеина). Каждую колонию следует пересадить на оба субстрата. Инкубировать при температуре 36 ± 1°С как минимум в течение 3 дней. Наблюдать, какие из колоний легионелл растут на субстрате BCYE-a и в то же время не растут на субстрате BCYE-Cys. Записать полученные результаты по каждой пластинке.

Для подтверждения in vitro требований легионелла в отношении цистеина можно в качестве альтернативы применять пищевой агар-агар, агар-агар с кровью либо субстрат Мае Conkey.

Для серологических обозначений следует выбрать те колонии, которые выросли на субстрате BCYE-a, и не выросли на субстрате BCYE-Cys (без цистеина). Для оценки количества единиц, способных к образованию колонии (КОЕ) легионелла следует выбрать чашку с ростом на субстрате GVPC, из которой наибольшее число колонии получила подтверждение и серологическое обозначение вида. Число подтвержденных колоний бактерий, изолированных из определенного, профильтрованного объема пробы воды либо ее раствора следует пересчитать на требуемый объем.

27. Методы экспресс-диагностики

27.1. Реакция прямой иммунофлюоресценции

Метод прямой флюоресценции — наиболее распространенный метод для быстрого определения легионеллезного антигена. Этот метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью. Прямой иммунофлюоресцентный метод позволяет обнаружить возбудитель L. pneumophila в отпечатках из свежих и замороженных кусочков легких, в гистологических срезах, плевральном экссудате, мокроте, материале бронхоскопии, а также при идентификации выделенных культур.

### Техника приготовления препаратов

На предметное стекло наносят каплю исследуемого материала (или делают отпечаток органов) и делают тонкий мазок, так как в слишком густом мазке не удается отметить свечение отдельных клеток. Препарат подсушивают на воздухе при комнатной температуре и фиксируют в ацетоне в течение 15 минут. Границу исследуемого материала, нанесенного на предметное стекло, отмечают стеклографом с обратной стороны препарата. Препараты хранят при температуре +4°С до обработки люминесцирующей сывороткой.

### Техника постановки реакции

На поверхность фиксированного и высушенного мазка, помещенного во влажную камеру (чашка Петри с кусочком смоченной в воде фильтровальной бумаги), наносят каплю «рабочего разведения» легионеллезной люминесцирующей сыворотки. Окраску препарата производят 20 минут при температуре 37°С. Затем мазки промывают 10 -15 минут в фосфатном буфере рН 7,2, дистиллированной водой, высушивают на воздухе, наносят глицериновую среду, покрывают покровным стеклом и просматривают в люминесцентном микроскопе.

«Рабочее разведение» люминесцирующей сыворотки рекомендуется готовить по мере надобности.

### Учет и оценка результатов

Мазки микроскопируют в падающем свете люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ. Для микроскопа используют иммерсионный объектив 90Х (1,25) и окуляры 5х7х и нефлюоресцирующее иммерсионное масло. Для получения яркого свечения бактерий необходимо тщательно центрировать осветительную систему микроскопа и подбирать соответствующие светофильтры. Наличие в препарате клеток бактерий следует контролировать с помощью фазово-контрастного устройства.

В положительных случаях после обработки данного препарата специфической легионеллезной люминесцирующей сывороткой в люминесцентном микроскопе обнаруживается специфическое изумрудно-зеленое свечение легионеллезных бактерий.

Степень яркости люминесценции бактерий, «окрашенных» люминесцирующими антителами, принято обозначать в крестах. Специфическим считается свечение с яркостью + + + + и + + +, свечение с яркостью ++ и + принято считать неспецифическим. Обнаружение светящегося ореола хотя бы у 3—5 клеток в каждом поле зрения свидетельствует о наличии в исследуемом материале бактерий.

Отрицательный результат свидетельствует об отсутствии микроорганизма или о содержании в исследуемом материале в низкой концентрации, не выявляемой иммунофлюоресцентным методом при прямом исследовании без подращивания или обогащения.

При исследовании различных препаратов необходимо иметь в качестве контроля мазок, приготовленный из 500 млн взвеси легионеллезных бактерий, обработанный люминесцирующей сывороткой.

Несмотря на то, что «рабочее разведение» сыворотки указано на этикетке ампулы, для каждой сыворотки его следует устанавливать опытным путем, так как оно может меняться в зависимости от конкретных условий микроскопирования препаратов.

С этой целью в ряде пробирок делают кратные (1: 2, 1: 4, 1: 8 и т. д.) разведения люминесцирующей сыворотки, используя при этом физиологический раствор рН 7,2. Каждым разведением сыворотки обрабатывают заранее приготовленный, фиксированный и подсушенный препарат с мазком из 500 млн. взвеси легионеллезных бактерий. Дальнейшая обработка препаратов идет по ранее описанной (для прямого варианта РИФ) методике. «Рабочим разведением» сыворотки считается то наибольшее разведение, при котором выявляется специфическое сверкающее зелено-желтое свечение бактериальной клетки на темном фоне препарата.

27.2. Реакция иммуноферментного анализа для определения легионеллезного антигена.

Реакция иммуноферментного анализа (далее - ИФА) позволяет определить легионеллезный антиген в клиническом материале (моча, мокрота, бронхиальные смывы) при экспериментальных и клинических исследованиях. Иммуноферментный метод дает возможность обнаружить легионеллезный антиген в моче больных уже на 3—5-й день болезни.

#### Техника приготовления препаратов

В лунки полистироловых планшетов вносят по 100 мкл легионеллезных иммуноглобулинов в концентрации 20—30 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере (КББ) рН 9,5. Планшеты инкубируют при температуре 37°С в течение 2 часов или в течение 18 часов при температуре 4°С. Затем планшеты трижды отмывают ФСБ с 0,05% твина-20, просушивают. В лунки сенсибилизированных планшетов вносят разведения исследуемого материала (антигена) в объеме 100 мкл. Разведения антигена делают на ФСБ с 0,05% твина-20. Инкубация 1 час при температуре 37°С. Затем планшеты трижды отмывают по 5 минут ФСБ с 0,05% твина-20. В лунки отмытого планшета вносят конъюгат (легионеллезные иммуноглобулины с ферментом пероксидазы хрена). Конъюгат разводят тем же буфером с твином-20 (рабочее разведение конъюгата указано на этикетке). После 1-часовой инкубации при температуре 37°С лунки планшета тщательно отмывают от непрореагировавшего конъюгата. Затем в лунки планшета вносят по 100 мкл свежеприготовленного субстрат-индикаторного раствора, содержащего 0,04% О-фенилендиамина в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере рН 6,0, в присутствии 0,006% Н2О2. Инкубируют 30 минут в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливают равным объемом 1н раствора серной кислоты.

Учет результатов

Реакцию учитывают визуально или фотометрически по изменению окраски субстрата в опытных лунках. Появление желто-оранжевого окрашивания в лунках с антигенсодержащими пробами при его отсутствии в контрольных отрицательных пробах свидетельствует о положительной реакции. При фотометрическом учете результатов при 492 нм проба считается положительной, если ОП опыта в 2 раза и более превышает ОП контроля. В качестве отрицательных контролей обязательны контроль субстрата и контроль сорбции конъюгата.

Специфичность анализа подтверждается реакцией торможения, избытком легионеллезных антител и реакцией с гетерологичными антигенами грамотрицательных бактерий.

28. Бактериологические методы

### Возбудитель редко удается выделить от больного. Для исследования берут материал бронхоскопии, плевральную жидкость, легочный экссудат. Описаны единичные случаи выделения возбудителя из мокроты, крови. Значительно чаще выделяют возбудитель из секционного материала (легочной ткани). При бактериологическом исследовании на легионеллез применяют посев на специальные питательные среды и биологическую пробу на чувствительных животных.

Посев на питательные среды

Возбудитель легионеллеза не растет на обычных питательных средах, в том числе очень богатых (мясо-пептонный агар, агар Хоттингера, триптически-соевый агар, среды на сердечно-мозговом экстракте и др.).

На шоколадном и кровяном агаре возможен слабый рост микроба в первой генерации при массивных посевах культуры.

Выделение возбудителя от больных и из внешней среды проводят на специальных питательных средах, применяемых для культивирования легионелл с обязательным добавлением L-цистеина и растворимого пирофосфата железа. Наибольшее распространение получила угольно-дрожжевая среда. Хорошие результаты получены при замене дрожжевого экстракта на сернокислый гидролизат рыбокостной муки. При этом концентрация добавляемого в среду L-цистеина снижается в 2 раза. Для предотвращения пророста посторонней микрофлоры при исследовании контаминированного материала и образцов внешней среды к агару добавляют антибиотики (полимиксин М 40 ед./мл +пенициллин 0,5 мкг/мл + амфотерицин Б 80 мкг/мл).

При подготовке к высеву жидкие образцы разводят 1 : 10 фосфатным буфером (рН 7,2). Высевают разведенный и цельный образец в количестве 0,2 мл. При исследовании секционного материала кусочек ткани массой 1 г растирают в стерильной ступке пестиком и готовят 10% суспензию ткани в фосфатном буфере (рН 7,2). Приготовленную суспензию разводят 1: 50 тем же буфером и высевают на среды.

Рост колоний из клинического материала наблюдается не ранее чем через 4—5 суток при температуре 35oС.

Максимальное количество вводимых колоний обычно вырастает на 8—10-е сутки. При подозрении на рост легионелл (молодые колонии обычно имеют вросший центр, гранулярную или блестящую поверхность) колонии пересевают на ту же среду и на среду, не поддерживающую рост легионелл (контрольную среду). В качестве контрольной среды обычно используют агар Хоттингера или триптически-соевый агар. Рост колоний во втором пассаже на угольно-дрожжевой или рыбокостной среде при отсутствии роста на контрольной среде с большой долей вероятности позволяет заподозрить легионеллез и указывает на необходимость дальнейшей идентификации.

С целью получения культуры возбудителя легионеллеза от биопробных морских свинок рекомендуется производить посев селезенки биопробного животного одновременно на 3 чашки со следующими средами:

1. Угольно-дрожжевой агар.

2. Угольно-дрожжевой агар с антибиотиками.

3. Агар Хоттингера.

Угольно-дрожжевая среда может быть заменена на рыбокостную среду. При гибели животного от легионеллеза посев должен быть положительным на первых двух чашках. При гибели от другой инфекции рост возбудителя будет отмечаться на 1-й и 3-й чашках и отсутствовать во 2-й.

Угольно-дрожжевая среда: дрожжевой экстракт—10 г, активированный уголь — 2 г, L-цистеин — 0,4 г, пирофосфат железа растворимый — 0,25 г, К2НРО4 — 0,85 г, КН2РО4—1,0 г, агар— 17 г, дистиллированная Н2О — 980 мл.

Все компоненты среды кроме L-цистеина и пирофосфата железа добавляют к 980 мл дистиллированной воды, растворяют, доводя до кипения, и автоклавируют 15 минут при температуре 121°С. Среду охлаждают до 50°С и добавляют свежеприготовленные растворы L-цистеина (0,4 г в 10 мл дистиллированной воды) и пирофосфата железа (0,25 г в 10 мл дистиллированной воды), профильтрованные через мембранные фильтры (с диаметром пор 0,45 мкн). РН среды доводят до 6,9 при температуре 50°С добавлением 1н КОН или 1н НС1. Среду быстро разливают, слегка взбалтывая для равномерного распределения активированного угля.

Разлитую среду можно хранить в чашках, помещенных в пластиковые или металлические контейнеры в течение 2 недель.

Рыбокостная среда готовится так же, как и угольно-дрожжевая, за исключением того, что в качестве питательной основы вместо дрожжевого экстракта используется сернокислый гидролизат рыбной кормовой муки — 10 г. Количество цистеина, добавляемого в среду, снижается до 0,2 г.

Биологическая проба

Биологическая проба является чувствительным методом обнаружения легионелл в исследуемом материале. Для биологической пробы используют морских свинок весом 250—300 г, которые заболевают и гибнут от легионеллезной инфекции при внутрибрюшинном заражении суспензией, содержащей 103—104 клеток бактерий. Через 12—48 часов у морских свинок возникает лихорадочное заболевание с подъемом температуры до 39,5—41°С, прострацией и поражением глаз. При массивном заражении исследуемого материала морские свинки гибнут на 3—4-е сутки; при меньшей инфицированности материала гибель затягивается до 5 - 8 суток. Срок наблюдения за животными до 10 дней.

В большинстве случаев животные погибают от легионеллеза с характерными патологическими изменениями. При вскрытии обнаруживается перитонит со скудным фибринозным экссудатом, резкая гиперемия париетальной брюшины с инъекцией сосудов. Печень и селезенка увеличены с фибринозным налетом на капсуле. В селезенке встречаются мелкие очаги некроза. Наиболее характерным следует считать развитие пневмонии без резко выраженного инфильтративного воспалительного процесса, некробиоз септальных клеточных элементов, нередко с некрозом альвеолярных перегородок и без поражения крупных сосудов. Характерны также набухание и десквамация мезотелия плевры.

В мазках-отпечатках из селезенки и легких при окраске по Романовскому — Гимза обнаруживают, как правило, значительное количество легионелл, а при посеве на угольно-дрожжевой агар десятипроцентной суспензии селезенки морских свинок в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0) через 48—72 часа появляется рост культуры. Если в отпечатках из органов присутствует малое число клеток возбудителя (≤ 5 клеток в поле зрения микроскопа), то посев на среды может быть отрицательным. В этом случае рекомендуется ввести 10% суспензию селезенки морских свинок в желточные мешки 5 - 6-дневных куриных эмбрионов в количестве 0,3 - 0,4 мл. Желточные мешки куриных эмбрионов, погибших на 4 - 6-й день после заражения (на 1 - 3-й сутки эмбрионы погибают от посторонней микрофлоры), содержат значительное количество возбудителя (50 - 100 клеток в поле зрения микроскопа), выявляемого окраской по Романовскому — Гимза или прямой иммунофлюоресценцией.

Идентификация возбудителя

Предварительную идентификацию легионелл осуществляют на основании морфологии и окраски бактерий в мазках по Граму. Легионелла — грамотрицательная палочка длиной 2—3 мк (иногда до 10 мк) специфического свечения в реакции прямой иммунофлюоресценции, отсутствует рост на контрольных средах.

## 29. Серологические методы диагностики

29.1. Реакция непрямой иммунофлюоресценции (РИФ).

На чистое обезжиренное предметное стекло наносят 3 отдельных небольших капли легионеллезного антигена, в качестве которого используют убитую кипячением 2-суточную культуру L. pneumophila, выращенную на угольно-дрожжевом агаре, содержащем L-цистеин (0,4 г/л) и пирофосфат железа, растворимый (0,25 г/л) в атмосфере 5% СО2. В работе используют антиген L. pneumophila из штамма Philadelphia I в рабочем разведении (40 бактериальных клеток в поле зрения в фазоконтрастном микроскопе). После подсушивания антигена на воздухе в течение 10—15 минут препарат фиксируют в ацетоне 15 минут и снова подсушивают в течение 2—3 минут на воздухе при комнатной температуре. После фиксации препарата антиген на стороне мазков следует обвести стеклографом, что в дальнейшем препятствует слиянию капель сыворотки в различных разведениях. Стекла с антигеном помещают во влажную камеру (чашка Петри с увлажненной фильтровальной бумагой на дне), и препараты с антигеном обрабатывают сывороткой больных в разведениях 1: 32, 1: 64, 1: 128. Первое разведение сыворотки 1: 8 делают в 0,5% растворе яичного желтка в забуференном физрастворе (рН = 7,2), последующие двукратные разведения сыворотки проводят в забуференном физрастворе. Препарат антигена с сывороткой инкубируют 30 минут при температуре 37°С во влажной камере, после чего промывают 5—10 минут фосфатным буфером (ФСБ) рН= 7,2, дистиллированной водой и высушивают на воздухе. Далее препарат обрабатывают люминесцирующей сывороткой против глобулинов человека, взятой в рабочем разведении. Инкубируют 30 минут при температуре 37°С во влажной камере, промывают 5—10 минут в ФСБ рН = 7,2, споласкивают дистиллированной водой, высушивают на воздухе и наносят среду с глицерином, покрывают покровным стеклом. Такой препарат готов для просмотра в люминесцентном микроскопе. При постановке реакции иммунофлюоресценции необходимо делать положительный контроль (антиген с положительной кроличьей легионеллезной сывороткой) и отрицательный контроль (антиген с нормальной сывороткой).

## Учет и оценка реакции

Препарат микроскопируют в падающем свете люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ. Для микроскопии используют иммерсионный объектив 90X (1,25) и окуляр 5X7 и нефлюоресцирующее иммерсионное масло.

В положительных случаях, то есть когда исследуемая сыворотка содержит специфические антитела, после обработки данного препарата люминесцирующей сывороткой против глобулинов человека выявляется специфическое яркое зелено-желтое свечение бактерий на темном фоне препарата. При специфической флюоресценции удается обнаружить более яркое свечение по периферии бактериальной клетки и более слабое в ее центральной части. Для оценки интенсивности специфического свечения используют четырехкрестовую систему: + + + + - яркие сверкающие изумрудно-зеленые клетки, люминесцирующие по периферии, четко контрастирующие с темным телом клетки; + + + - умеренная изумрудно-зеленая люминесценция по периферии клетки; + + - зеленое свечение всей клетки; + - едва заметная зеленая люминесценция всей клетки. Положительным результатом считают флюоресценцию, оцениваемую на «+ + + +» и «+ + +». За титр исследуемой сыворотки принимают последнее разведение, которое обеспечивает бактериальной клетке специфическое свечение, оцениваемое на «+ + + +» и «+ + +». Разведение сыворотки, при котором отмечается слабое свечение бактериальной клетки, оцениваемое на «++» и « + », не учитывают.

Положительный контроль (препарат антигена с положительной кроличьей легионеллезной сывороткой) должен давать яркое специфическое свечение легионелл. В отрицательном контроле (препарат легионеллезного антигена с нормальной кроличьей сывороткой) свечение отсутствует полностью.

Большинство больных легионеллезом имеет выраженную сероконверсию с нарастанием титров антител в 4—128 раз в сыворотках реконвалесцентов, по сравнению с первой сывороткой, полученной в острый период заболевания. В случаях, когда проанализировать динамику изменения не представляется возможным, диагноз ставится по высокому уровню специфических антител. Появление специфических антител у отдельных больных может происходить уже к 6—7-му дню от начала заболевания. Титры быстро возрастают на 2—3-й неделе, достигая максимальных значений к 5-й неделе от начала заболевания. В последующие месяцы титры уменьшаются. Необходимо учитывать возможность выявления перекрестных реакций сыворотки больных легионеллезом в РИФ с антигенами пситтакоза и лихорадки КУ. Однако титр антител в реакции с гомологичной культурой обычно бывает выше, чем с гетерологичной, что является основой для дифференциальной диагностики.

29.2. Реакция иммуноферментного анализа (ИФА)

В лунки полистиролового планшета вносят по 100 мкл растворимого антигена L. pneumophila в концентрации 1—10 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) рН = 7,2. Планшеты инкубируют при температуре 37°С в течение 2 часов или в течение 18 часов при температуре +4°С. Затем планшеты трижды отмывают в ФСБ с 0,05% твина-20 и просушивают. В лунки сенсибилизированных планшетов вносят последовательно двукратные разведения исследуемых сывороток (или крови) в объеме 100 мкл. Разведения сывороток делают на ФСБ с 0,05% твина-20. Начальное разведение сывороток 1: 100. Инкубация 1 час при температуре 37°С. Затем планшеты трижды отмывают по 5 минут ФСБ с 0,05% твина-20.

В лунки отмытого планшета вносят конъюгат в рабочем разведении в объеме 100 мкл (кроличьи иммуноглобулины к сывороточным глобулинам человека, меченные пероксидазой хрена). Конъюгат разводят тем же буфером с твином-20. После 1-часовой инкубации при температуре 37oС лунки планшета тщательно отмывают от непрореагировавшего конъюгата. Затем в лунки планшета вносят по 100 мкл свежеприготовленного субстрат-индикаторного раствора, содержащего 0,04% О-фенилендиамина в 0,1М цитратно-фосфатном буфере рН = 6,0 в присутствии 0,006% Н2О2. Инкубируют 30 минут в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливают равным объемом 1н раствора серной кислоты.

### Учет результатов

Интенсивность окрашивания определяют визуально или спектрофотометрически при длине волны 492 нм. Результаты исследования считают положительными, если титр исследованной сыворотки превосходит титр отрицательного контроля более чем на 2 разведения при визуальном учете результатов реакции, или оптическая плотность (ОП) исследованной сыворотки более чем в 2 раза превышает показания ОП отрицательного контроля при фотометрическом учете.

За положительные результаты принимают наличие антител к L. pneumophila в титрах 1: 400 и выше.

Диагноз легионеллеза считается установленным:

при выделении легионелл из отделяемого респираторного тракта, легочной ткани или из крови;

при 4-кратном или более нарастании уровня специфических антител к L. pneumophila серогруппы 1 в реакции непрямой иммунофлюоресценции или микроагглютинации;

при определении специфического растворимого антигена легионелл в моче с помощью иммуноферментного анализа.

Диагноз считается предположительно установленным:

при 4-кратном или более нарастании (через 4–6 нед.) уровня специфических антител к другим серогруппам L.pneumophila или другим видам легионелл в реакции непрямой иммунофлюоресценции или микроагглютинации;

при обнаружении высокого титра антител в одиночной сыворотке (>1:256) к L.pneumophila серогруппы 1, другим серогруппам L.pneumophila и видам легионелл;

при выявлении легионелл в отделяемом респираторного тракта или в легочной ткани с помощью прямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител к видоспецифическому антигену L.pneumophila.

## ГЛАВА VII

МЕРОПРИЯТИЯ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИИ ЛЮДЕЙ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗОМ

30. На каждый случай заболевания, подозрения на заболевание легионеллезом врач или средний медицинский работник, выявивший или заподозривший заболевание, обязан заполнить «экстренное извещение», которое в течение 12 часов высылается в территориальное учреждение государственного санитарного надзора. В оперативном порядке информация сообщается в это же территориальное учреждение государственного санитарного надзора по телефону.

31. Для персонального учета больных территориальным учреждением государственного санитарного надзора и организациями здравоохранения, оказывающими стационарную и амбулаторно-поликлиническую помощь (далее – организациями здравоохранения) ведется «Журнал учета инфекционных заболеваний» (ф. 060-У).

32. За полноту, достоверность и своевременность учета инфекционных заболеваний, а также за оперативное сообщение о них в территориальное учреждение государственного санитарного надзора ответственность несет главный врач организации здравоохранения.

33. Главные государственные санитарные врачи административных территорий обеспечивают представление информации о заболевании в соответствии с действующим постановлением (приказом) Министерства здравоохранения Республики Беларусь, определяющим порядок представления информации об инфекционных заболеваниях.

34. Больные легионеллезом подлежат госпитализации в инфекционные отделения, а при их отсутствии, в отдельные палаты соматических отделений больниц.

35. Эпидемиологическое обследование очага инфекции начинают в течение суток после получения экстренного извещения из организации здравоохранения.

36. Целью эпидемиологического обследования очага является установление его границы, выявление резервуара и возможных путей передачи инфекции, разработка и проведение адекватных противоэпидемических мероприятий. Результаты обследования заносятся в карту эпидемиологического обследования очага инфекционного заболевания (ф. 357/у).

37. При проведении противоэпидемических мероприятий необходим отбор проб воды на предмет выявления палочек легионеллы:

в зданиях общественного пользования, прежде всего там, где находятся пожилые и больные люди (санатории, больницы, дома престарелых);

в гостиницах и общежитиях;

в зданиях, в которых вода в сетях не достигает рекомендуемых параметров (температура теплой воды – ниже 600С) либо концентрация свободного хлора (в случае хлорирования воды) ниже 0,3 мг С12/л;

всегда в водной сети в местах пребывания людей, у которых было подозрение на легионеллёз либо было установлено заболевание легионеллёзом.

38. При обнаружении легионелл в объектах внешней среды проводится дезинфекция термическим или химическим способом водных систем и объектов с последующим бактериологическим исследованием проб воды (приложение 3).

39. Критерием эффективности дезинфекции водных систем является отсутствие новых случаев заболеваний легионеллезом, а также полное или частичное удаление легионелл из системы, характеризующееся снижением уровня колонизации системы (удельный вес положительных результатов проб воды из периферийных точек – менее 30%) и уровня концентрации возбудителя (не более 103 КОЕ/л).

40. Диспансерное наблюдение за переболевшими не регламентировано.

## ГЛАВА VIII

## ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ МЕРОПРИЯТИЯ

41. Мероприятия по предупреждению заболеваний легионеллезом должны применяться заблаговременно до появления единичных или групповых случаев.

42. Необходим системный подход, предполагающий выявление на каждой административной территории водных объектов высокого риска, разработку, с учетом специфики конкретного объекта и результатов его обследования, мер профилактики и осуществление постоянного контроля (мониторинга) за их проведением.

43. К объектам наиболее вероятного риска заражения легионеллезными бактериями относятся:

* водные системы охлаждения воздуха, включая охлаждающие башни и испарительные конденсоры;
* системы горячего и холодного водоснабжения гостиниц, больниц, промышленных предприятий и ряда других объектов;
* бассейны;
* SPA салоны (ванны джакузи), вихревые ванны;
* кондиционеры увлажнители;
* другие водные системы с температурой воды более 20oС, в процессе эксплуатации которых могут генерироваться мелкодисперсные аэрозоли.

44. При разработке и реализации мер неспецифической профилактики особое значение приобретают особенности экологии возбудителя ─ его способность к размножению в воде и распространению с водным аэрозолем.

45. Комплекс мероприятий по профилактике легионеллеза должен включать:

меры, направленные на предотвращение процессов колонизации и накопления легионелл в искусственных водных резервуарах и системах:

* эксплуатационные и инженерно-технические решения, направленные на профилактику застойных явлений, ликвидацию тупиков;
* поддержание оптимальных температурных параметров воды систем горячего водоснабжения (температура горячей – не ниже 60oС);
* применение биоцидов с целью подавления (регуляции) роста и размножения микрофлоры (приложение 3);
* регулярное проведение очистки (удаление ила и осадка) и профилактических дезинфекционных мероприятий (приложение 3);

меры, направленные на предотвращение аэрозолизации вдыхаемого воздуха:

* проектные решения, исключающие прямое поступление воздуха из охлаждающих башен или испарительных конденсоров в воздухозаборные устройства;
* регулярная очистка и замена (в соответствии с инструкцией изготовителя) наружных фильтров в системе забора воздуха.

46. Рекомендуемые схемы контроля (мониторинга) за эффективностью проведения профилактических мероприятий приведены в приложении 4.

47. Микробиологический мониторинг качества воды проводится:

47.1. система горячей и холодной воды:

в зданиях общественного пользования, прежде всего там, где находятся пожилые и больные люди (санатории, больницы, дома престарелых);

в гостиницах и жилых комплексах;

в зданиях, в которых вода в сетях не достигает рекомендуемых параметров либо концентрация свободного хлора (в случае хлорирования воды) ниже 0,3 мг С12/л;

Присутствие палочек легионелла в воде, поступающей из сети, в зависимости от числа и серологической группы, обнаруженных бактерий этого вида требует принятия соответствующих профилактических и интервенционных мер (приложение 5).

47.2. системы охладительных вод (в том числе, холодильные башни)

В системах охлаждения существуют благоприятные условия для роста микроорганизмов. Температура воды, уровень рН, содержание питательных агентов, растворенного кислорода и углекислого газа в воде. Солнечный свет и очень большая влажная поверхность позволяет развиваться простейшим, водорослям, грибкам и бактериям, в том числе палочкам легионелла. Результат эффективности действия применяемых дезинфекционных мер оценивается на основании результата обычных бактериологических исследований воды.

Исследования воды в холодильных циклах на предмет обнаружения палочек легионелла должны производиться не реже 2 раз в год. Равно как и обычная очистка и дезинфекция холодильных сетей и оборудования должна производиться как минимум 2 раза в год, предпочтительно весной и осенью, если системы работают сезонно, достаточно 1 раза в год (перед началом сезона). Кроме этого очистка и дезинфекция охладительных систем должна всегда осуществляться перед повторным включением, если система выключалась на срок более 5 дней. Меры, предпринимаемые в зависимости от результата бактериологического исследования воды из охладительного цикла, представлены в приложении 5.

48. Другие устройства, требующие постоянного надзора по причине риска заражения Legionella.

Среди устройств, которые бывают частым фактором коллективных заболеваний следует указать лечебные и вибрационные ванны (бассейны с гидромассажем). Обычно они содержат воду при температуре более 30°С, которая при аэрации образует аэрозоли, вдыхаемые пользователями, обслуживающим персоналом либо другими лицами, находящимися поблизости. Поэтому концентрация свободного хлора в ваннах с гидромассажем должна быть выше, чем в обычных бассейнах для купания, она должна составлять как минимум 0,7 мг/л, максимум 1,0 мг/л., кроме этого бассейны с гидромассажем должны всегда по окончании дня эксплуатации опорожняться, мыться и дезинфицироваться (приложение 4).

#####  Приложение 1

к Инструкции по эпидемиологии, клинике, лечению, лабораторной диагностике и профилактике легионеллеза

Таксономия легионелл

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Вид | Количество серогрупп | Связь с клиническими случаями |
| L.adelaidensis |  | – |
| L.anisa  |  | + |
| L.binninghamensis  |  | + |
| L.bozemanii | 2 | + |
| L.brunensis |  | - |
| L.cherri  |  | + |
| L.cincinnatiensis  |  | + |
| L.dumoffii |  | + |
| L.erythra | 2 | – |
| L.fairfieldensis  |  | + |
| L.feeleii | 2 | + |
| L.geestiana |  | - |
| L.gonnanii  |  | + |
| L.gratiana  |  | – |
| L.hackeliae  | 2 | + |
| L.israelensis |  | - |
| L.jamestownniensis  |  | – |
| L.jordanis  |  | + |
| L.londiniensis | 2 | - |
| L.longbeachae | 2 | + |
| L.lytica (comb.nov.) |  | + |
| L.maceachemii  |  | + |
| L.micdadei |  | + |
| L.moravica  |  | – |
| L.nautarum  |  | – |
| L.oakridgensis  |  | + |
| L.parisiensis  |  | + |
| L.pneumophila | 16 | +++ |
| L.quateirensis  |  | – |
| L.quinlivanii | 2 | – |
| L.rubrilucens |  | - |
| L.sainthelensi | 2 | + |
| L.santicrucis |  | – |
| L.shakespearei |  | – |
| L.spiritensis | 2 | + |
| L.steigenvaltii |  | – |
| L.tusconensis  |  | + |
| L.wadsworthii  |  | + |
| L.waltersii |  | - |
| L.worsleiensis  |  | – |

#####  Приложение 2

##### к Инструкции по эпидемиологии, клинике, лечению, лабораторной диагностике и профилактике легионеллеза

# Вопросник

для сбора эпиданамнеза у больных при подозрении на легионеллез

1.Фамилия Имя Отчество

2. Возраст (год рождения) Лет

3. Пол

4. Профессия

5. Место жительства

6. Дата заболевания

7. Перенесенные заболевания за последние 6 месяцев

8. Наличие частых респираторных заболеваний в анамнезе

9.Был ли контакт с инфекционными больными? Да Нет

 10. Находился ли в больнице по поводу какого-либо заболевания, в течение последнего месяца?

11. Участие в земляных, строительных, оросительных работах.

12. Контакт с пресными водоемами (работа, купание).

13.Путешествие, пребывание в гостинице (за 2 недели до заболевания).

 14.Контакт с системами кондиционирования, охлаждения, компрессорными устройствами.

 15. Контакт с различными производственными и бытовыми аэрозолями.

16. Контакт с медицинским и лабораторным оборудованием.

17. Курение - в течение какого периода (лет).

18. Употребление алкоголя.

 19. Наличие сопутствующих заболеваний (туберкулез, диабет, болезни легких, сердца, печени, почек и др.). Было ли лечение иммунодепрессантами (какими, когда).

20. При вспышках на промышленных предприятиях:

а) профессиональные маршруты заболевших рабочих;

б) зоны пересечения маршрутов у заболевших.

#####  Приложение 3

##### к Инструкции по эпидемиологии, клинике, лечении, лабораторной диагностике и профилактике легионеллеза

Методы обработки и дезинфекции водных систем и объектов

1. Системы охлаждения рециркуляторного типа.

Биоциды.

Биоциды используются для долговременного контроля микробиологической активности в системах охлаждения и бывают окислительного и неокислительного действия. Включаются в состав программ обработки этих систем. В системах, содержащих видимую биопленку, использование биодисперсантов может повысить эффективность окислительного действия биоцидов. Большинство биоцидов неокислительного действия уже содержат в своем составе биодисперсанты.

Биоциды окислительного действия.

Применяемая доза биоцида должна быть достаточной для достижения уровня свободного остаточного хлора в воде 0,5-1 мг/л или брома 1-2 мг/л. Для избежания коррозии следует избегать (за исключением особых обстоятельств) уровня свободного остаточного хлора/брома выше 2 мг/л. Желательно проводить постоянное хлорирование, но если оно проводится периодически, то эффективная концентрация должна достигаться, как минимум, 4 раза в сутки. Когда хлорирование прекращается, остаточное количество хлора быстро снижается, оставляя систему открытой для реинфицирования и повторного накопления микроорганизмов.

В целях дезинфекции используются более высокие дозы до 50 мг/л свободного остаточного хлора. Дезинфекция проводится регулярно не менее 2 раз в год. Внеочередная дезинфекция проводится в следующих случаях:

* перед пуском в эксплуатацию;
* после продолжительного (месяц и более) перерыва в работе;
* в случае механического повреждения охлаждающей башни или другой части системы охлаждения;
* если чистота охлаждающей башни или системы вызывает сомнение;
* если загрязнение подтверждается результатами микробиологических исследований.

Биоциды неокислительного действия.

По сравнению с биоцидами окислительного действия они более стабильны и длительно удерживают остаточную концентрацию. Частота и количество вещества будет зависеть от объема обрабатываемой воды, времени контакта (обычно 4 часа) и рН воды. Программы применения биоцидов неокислительного действия должны включать использование 2-х биоцидов попеременно.

2. Системы горячего водоснабжения.

Термическая обработка (температурный шок).

Обработка горячей водой с температурой 70-80°C в течение относительно короткого периода используется как для экстренной, так и периодической дезинфекции системы, как составная часть долговременных программ контроля. Термическая дезинфекция проводится путем поднятия температуры воды в нагревателе до 70-80°C и обеспечения дальнейшей ее циркуляции в системе в течение 3-х дней. При этом в выходных точках системы температура не должна опускаться ниже 65°C. По окончании термической обработки отбирают образцы проб воды и осадка из отдаленных точек системы для исследования на наличие легионелл. При необходимости данную процедуру повторяют до достижения эффекта деконтаминации.

Основными преимуществами данного метода являются отсутствие специального оборудования и возможность немедленного проведения этой процедуры. Однако в связи с большим расходом энергии данный метод не нашел применения на крупных промышленных объектах, но может быть рекомендован для небольших объектов и систем. Существует также большой риск образования накипи. Несмотря на снижение числа легионелл после такой обработки, колонизация системы может продолжиться несколько недель спустя, особенно если не применяются другие меры воздействия.

Постоянное поддержание температуры между 55 и 60°C.

При 60°C в течение 2-х минут инактивируется 90% популяции легионелл. Эффективность такой температуры была доказана в больницах и гостиницах. Системы горячего водоснабжения, поддерживаемые при температуре свыше 50°C, реже колонизируются легионеллами. Циркуляция воды при температуре 60°C означает, что температура, вытекающей из любого крана воды в течение 1-й минуты, должна составлять не менее 50°C (желательно 55°C). Данный метод наиболее часто используется для контроля легионелл в системах горячего водоснабжения. Недостатки метода – рост потребления энергии и увеличение риска образования накипи.

### Хлорирование.

Хлорирование также используется для обработки воды систем горячего водоснабжения. Однако в связи с тем, что бактерицидное действие хлора быстро понижается при рН воды выше 7.0, необходим постоянный контроль концентрации свободного остаточного хлора в воде, а также принятие других мер воздействия.

Для постоянного хлорирования горячей воды чаще всего используются соединения гипохлорита кальция или натрия. Уровень свободного остаточного хлора может варьировать между 1 и 2 мг/л в зависимости от качества воды, ее расхода, наличия в системе биопленки. Если имеются застойные участки или проблемы в циркуляции воды, то остаточный хлор не приведет к инактивации легионелл в этих местах. Хотя постоянное хлорирование воды рассматривается, как средство контроля легионелл в горячей воде, однако достаточно трудно поддерживать достаточный уровень хлора в ней, так как он быстро улетучивается. Кроме того, коррозийное действие хлора с увеличением температуры усиливается.

Диоксид хлора также успешно используется для контроля легионелл в ряде систем горячего водоснабжения. Применяется аналогично выше описанным препаратам. Обладает рядом преимуществ: менее летуч при высокой температуре и более активен в отношении биопленки.

Монохлорамин обладает меньшей по сравнению с другими хлорсодержащими препаратами активностью, но действует более длительно и эффективен в отношении биопленки.

Ионизация.

Ионизация – электролитическая генерация ионов меди и серебра для обработки воды. В концентрации от 400 мкг/л (для меди) и 40 мкг/л (для серебра) эти ионы могут быть эффективны против легионелл в планктоне и биопленочной фазе систем горячего водоснабжения. После умягчения воды концентрация ионов серебра в диапазоне 20-30 мкг/л также может быть эффективной при минимально поддерживаемой концентрации 20 мкг/л. На процесс ионизации большое влияние оказывает жесткость воды, но он практически не зависит от ее температуры. Ввиду значительных флюктуаций концентрации ионов этот процесс должен контролироваться автоматически.

Перекись водорода и серебро.

Обработка производится с использованием концентрированной перекиси водорода и серебра. По своему бактерицидному действию оба препарата усиливают друг друга. Данный метод используется сравнительно недавно и требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

Облучение ультрафиолетом.

Ультрафиолетовое облучение воды – альтернативный метод дезинфекции, с доказанной эффективностью. Воздействие высокой температурой и хлорирование могут применяться до обработки воды ультрафиолетом. УФ оборудование легко устанавливается, не приводит к изменению вкуса воды и не повреждает трубопроводы. Данная техника не применяется в случае необходимости обработки воды системы в целом. В связи с тем, что УФ не обладает остаточным действием, легионеллы сохраняются в биопленке, тупиках и застойных участках сети.

3. Системы холодного водоснабжения.

В этих системах широко используются окислительные биоциды (жидкий хлор, гипохлорит кальция или натрия, монохлорамин и диоксид хлора). Максимальная возможная концентрация остаточного активного хлора 0,5 мг/л.

4. SPA салоны.

Эти объекты подлежат тщательной постоянной обработке. Вода должна постоянно фильтроваться и обрабатываться хлором или бромом. Необходимая остаточная концентрация для хлора 1-2 мг/л и брома 2-3 мг/л. Должны быть оборудованы фильтрами, применяемыми в плавательных бассейнах, которые подлежат ежедневной промывке обратным током воды. Как минимум половина воды должна ежедневно обновляться. Система циркуляции и обработки воды должна функционировать 24 часа в сутки. Концентрация остаточного хлора/брома должна измеряться несколько раз в день.

#####  Приложение 4

##### к Инструкции по эпидемиологии, клинике, лечению, лабораторной диагностике и профилактике легионеллеза

Рекомендуемые схемы контроля (мониторинга) за эффективностью проведения профилактических мероприятий для организаций, эксплуатирующих системы водоснабжения.

Таблица 1. Рекомендуемая частота контроля различных систем риска

Системы охлаждения

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Система | Цель (задача) | Частота |
| Охлаждающие башни и испарительные конденсоры | Контроль качества воды, режима биоцидной/химической обработки воды, включая ключевые химические и микробиологические параметры, осмотр внутреннего состояния резервуаров и поверхности воды | См. таблицу 2 |
| Очистка и дезинфекция  | 1 раз в 6 месяцев |

Системы холодного и горячего водоснабжения

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Система | Цель (задача) | Частота |
| Система горячего водоснабжения | Контроль температуры воды на выходе и обратном входе в нагреватель | Ежемесячно |
| Контроль температуры в контрольных точках (должна достигать 50°C в течение 1 минуты) | Ежемесячно |
| Визуальный контроль внутренней поверхности нагревателя (осадок, накипь). Контроль температуры в контрольных точках системы на репрезентативной основе. | Ежегодно |
| Система холодного водоснабжения | Контроль температуры на входе и в резервуаре. Отметить максимальную температуру, зарегистрированную максимум/минимум термометром (если установлен). | 1 раз в 6 месяцев |
| Контроль температуры в контрольных точках (должна быть ниже 20°C после спускания воды в течение 2 минут) | Ежемесячно |
| Визуальный контроль резервуаров для холодной воды. Контроль температуры в контрольных точках на репрезентативной основе. | Ежегодно |
| Головки душа | Демонтаж, очистка и удаление накипи (отложений) | Ежеквартально или по мере необходимости |
| Редко используемые выходные отверстия | Промывка и спуск в канализацию | Еженедельно |

Другие системы риска

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Система | Цель (задача) | Частота |
| Спреевые увлажнители, воздушные мойщики, влажные очистители | Очистка и дезинфекция, соприкасающихся с водой поверхностей | 1 раз в 6 месяцев |
| Умягчители воды | Очистка и дезинфекция  | В соответствии с рекомендациями производителей |
| Установки для разбрызгивания воды | Убедиться, что риск воздействия образующихся аэрозолей является минимальным |  |
| Токарные станки и другое оборудование, где используется охлаждение водой | Очистка и дезинфекция (резервуары, распределительная сеть) | 1 раз в 6 месяцев |
| SPA салоны (ванны) | Контроль за ежедневным промывание фильтров | Ежедневно |
| Контроль обработки воды окислительным биоцидом | 3 раза в день |
| Очистка и дезинфекция системы в целом | Еженедельно |
| Садовые опрыскиватели | Очистка и дезинфекция резервуаров, разводящей сети и насадок (головок) | Ежегодно и при необходимости более часто |
| Стационарные системы охлаждения, используемые в зубоврачебной практике | Дренирование и очистка | В конце каждого рабочего дня |
| Промывание | Перед началом каждого рабочего дня |
| Мойщики машин/автобусов | Контроль за работой систем фильтрации, очистки и дезинфекции | В соответствии с инструкцией производителя |
| Декоративные фонтаны (особенно внутри помещений) | Очистка и дезинфекция бассейнов, головок, резервуаров | Периодичность в зависимости от условий использования |

Таблица 2. Типовая схема частоты контроля химических и микробиологических показателей качества воды систем охлаждения.

|  |  |
| --- | --- |
| Параметры | Периодичность |
| Кальциевая жесткость мг/л CaCO3 | Ежемесячно |
| Магниевая жесткость мг/л CaCO3 | Ежемесячно  |
| Общая жесткость мг/л CaCO3 | Ежемесячно |
| Общая щелочность мг/л CaCO3 | Ежеквартально |
| Хлориды мг/л Cl | Ежеквартально |
| Сульфаты мг/л SO4  | Ежеквартально |
| Общие растворимые твердые вещества | Еженедельно |
| Взвешенные твердые вещества мг/л | Ежеквартально |
| Уровень ингибиторов мг/л l | Ежемесячно |
| Окислительный биоцид мг/л  | Еженедельно |
| Температура °C | Ежеквартально |
| PH  | Еженедельно |
| Растворимое железо мг/л Fe | Ежеквартально |
| Общее железо мг/л Fe | Ежеквартально |
| Фактор концентрации | Ежеквартально |
| Микробиологическая активность | Ежеквартально |
| Legionella  | Ежеквартально |

Таблица 3. Мониторинг температурного режима воды систем холодного и горячего водоснабжения

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Периодичность контроля | Объекты контроля (контрольные точки) | Стандартные параметры | Примечание |
| Холодная вода | Горячаявода |
| Ежемесячно | Холодная и горячая вода из выходных отверстий системы (краны в местах потребления). | 20°C или менее после спускания воды в течение 2 минут | Не менее 60°C во время ее спускания в течение 1 минуты | Предназначен для контроля постоянства темперы воды в разводящей сети.Количество контрольных точек зависит от конфигурации сети, но не менее 2-х  |
| Ежемесячно | Горячая вода после водонагревателя и оборотная вода |  | На выходе из нагревателя – 60°C.Оборотная вода – 50°C  | Рекомендуемые точки для измерения температуры: верхняя часть водонагревателя и возвратное колено |
| 1 раз в полугодие | Холодная вода на входе в систему (1 раз зимой и 1 раз летом) | Менее 20 гр. в любой период года |  |  |
| 1 раз в полугодие | Репрезентативное количество контрольных точек, характеризующих систему в целом | 20°C или менее после спускания воды течение 2 минут | Не менее 60°C во время ее спускания в течение 1 минуты. Диапазон между верхним и нижним значением температуры(после одной минуты) не должен превышать 10°C | Предназначен для оценки правильности функционирования температурного режима системы в целом. |

#####  Приложение 5

##### к Инструкции по эпидемиологии, клинике, лечению, лабораторной диагностике и профилактике легионеллеза

Микробиологический мониторинг и принимаемые меры

Таблица 1 Профилактические действия в зависимости от результата бактериологического исследования воды из холодильного цикла.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Число аэробных бактерий КОЕ/мл при 30oC (минимальная инкубация 48 часов) \* | Бактерия легионелла кое/мл \*\* | Предпринимаемые действия |
| 10,000 или менее | 1,000 или менее | Взятие системы под контроль |
| Более 10,000 и менее 100,000 | Более 1,000 и менее 10,000 | Необходим повторный анализ воды. Если получен аналогичный результат, то следует провести оценку принимаемых мер (температурный контроль, применение биоцидов) и их коррекцию с целью повышения эффективности обработки воды в системе.Если выделяется легионелла и большинство образцов положительны, то рекомендуется проведение дезинфекции системы. |
| Более 100,000 | Более 10,000 | Повторный отбор проб, немедленная ревизия системы, принятие экстренных мер воздействия, включая дезинфекцию. |

Таблица 2. Профилактические действия в зависимости от числа бактерий легионелла, обнаруженных в пробах воды в больницах, санаториях и домах престарелых.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Число клеток легионелла КОЕ/100мл. | Вид применения | Частота контроля |
| <10 | • Не следует использовать в зонах повышенного риска, например, в отделениях трансплантации• За пределами зоны повышенного риска нет ограничений в применении | 1раз в год |
| 10-103 | • Не следует использовать для медико-технических устройств• Увлажняющие устройства должны подвергаться временным процедурам очистки и дезинфекции | 2 раза в год |
| > 103 | •ППринципиальное ограничение использования воды, безотлагательные процедуры очистки и дезинфекции, если это невозможно, следует применять временные процедуры и контроль местных заражений | 4 раза в год |

Таблица 3. Профилактические действия в зависимости от числа бактерий легионелла, обнаруженных в пробах воды в гостиницах, крупных жилых комплексах и на предприятиях.

|  |  |
| --- | --- |
| Число клеток легионелла КОЕ/100 мл | Действие |
| <10 | Не требуется действия: система эксплуатируется правильно. |
| 10-103 | 1. Если это результат 1-2 проб, следует повторно отобрать пробы и исследовать их. Такой же повторный результат требует анализа ситуации в целях обнаружения источника заражения.2. Если большинство проб показывает такой уровень загрязнения, следует признать водную сеть зараженной и предпринять меры, направленные на сокращение числа бактерий рода легионелла. |
| >103 | Повторить отбор проб воды и одновременно сразу же приступить к интервенционным действиям, включая очистку и дезинфекцию системы. |