МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ
И МИКРОБИОЛОГИИ ИМ. Н. Ф. ГАМАЛЕИ АМН СССР

КЛИНИКА, ЛЕЧЕНИЕ И ДИАГНОСТИКА ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА

(Методические рекомендации)

Москва 1987

gost.e-ecolog.ru

Методические рекомендации подготовлены академиком АМН СССР профессором **В. И. Покровским**, академиком АМН СССР профессором **С. В. Прозоровским**, к. м. н. **С. Н. Беленьким**, к. б. н. **И. С. Тартаковским**, **Е. А. Котовой**, профессором д. м. н. **В. И. Васильевой**, к. м. н. **Е. В. Русаковой**, **И. А. Калашниковым**, к. м. н. **Ю. Ф. Белым**, к. б. н **О. В. Радченко**, **И. А. Буникисом**, к. м. н. **Р. А. Брудным**, к. м. н. **Г. В. Гальцевой**

Ответственный за выпуск к. м. н. врач-эпидемиолог Пермской облсанэпидстанции В. Д. Медведев.

УТВЕРЖДАЮ:

Заместитель министра
здравоохранения РСФСР
К. И. Акулов
2 ноября 1987 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ КЛИНИКА, ЛЕЧЕНИЕ И ДИАГНОСТИКА ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА

За последние годы легионеллез занял значительное место среди инфекционных заболеваний человека бактериальной этиологии.

В СССР легионеллезная инфекция выявляется с 1979 года. Описаны спорадические случаи и вспышки легионеллеза, штаммы возбудителя выделены от больных и из внешней среды. Аэрогенный путь заражения, многообразие клинических форм (болезнь легионеров, лихорадка понтиак и др.), сложность дифференциальной диагностики, широкое распространение возбудителя во внешней среде требуют внедрения в практику здравоохранения эффективных методов диагностики и лечения данного заболевания: контроля за распространением возбудителя; четких представлений об особенностях клинического течения данного заболевания.

В методических рекомендациях отражены современные представления о клинических формах и лечении легионеллеза, изложены основные методы лабораторной диагностики и профилактические мероприятия.

Методические рекомендации предназначены для практических врачей-терапевтов, пульмонологов, инфекционистов, бактериологов, эпидемиологов и гигиенистов краевых и областных СЭС.

1. КЛИНИКА ЛЕГИОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ. ОСТРАЯ ПНЕВМОНИЯ

(болезнь легионеров, легионелла-пневмония, питтсбургская пневмония)

Основным клиническим синдромом легионеллеза является легочный, что соответствует пневмотропной природе возбудителя. В рамках респираторного синдрома легионеллез представлен тремя клиническими формами: острая пневмония (или болезнь легионеров, легионелла-пневмония, питтсбургская пневмония, вызываемая Legionella micdadei), острый альвеолит и острый бронхит (лихорадка Понтиак).

Ведущая нозологическая форма легионеллеза — острая пневмония, отличающаяся рядом клинико-лабораторных и рентгенологических особенностей. Удельная значимость легионеллеза в этиоло-

гической структуре острых пневмоний достаточно велика и достигает 15%. Большинство зарубежных клиницистов продолжает пользоваться термином «болезнь легионеров» для обозначения пневмонической формы легионеллезной инфекции. Клинически она характеризуется четко очерченной симптоматикой острой лобарной плевропневмонии, как правило, тяжелого и среднетяжелого течения.

Ведущими клиническими синдромами легионелла-пневмонии являются лихорадка (до 90%), одышка (80%), выраженные плевральные боли (до 75%), кашель (80—90%).

Развернутой клинической картине болезни в классическом варианте предшествует продромальный период продолжительностью от 2 до 10 дней. В этот период больные отмечали повышенную утомляемость, анорексию, умеренную головную боль. Типичным симптомом продромы считается преходящая диарея, не связанная с алиментарной погрешностью. Признаки активности бронхолегочной инфекции, катаральные явления носоглотки в продромальный период не отмечены. Температура у больных часто остается нормальной или умеренно субфебрильной (37,5°С).

Моментом начала заболевания у всех больных легионеллезом принято считать резкое ухудшение состояния с развитием астении, высокой лихорадкой, сопровождающейся ознобом, профузной потливостью, интенсивными болями в грудной клетке, связанными с дыханием. Бурное начало, как правило, предшествует быстрому прогрессированию инфекционного процесса в виде респираторных (одышка, кашель, плевральные боли) и генерализованных проявлений.

Лихорадка — универсальный первый признак легионеллезной инфекции. Более чем у 90% больных легионеллезом отмечен подъем температуры в 1-е сутки болезни до 38,9°С; примерно две трети больных демонстрируют лихорадочный пик 40°С. Лихорадка, как правило, носит ремитирующий характер и переходит в затяжную (более 2 недель) при тяжелом варианте клинического течения и неадекватной терапии.

Тахикардия — признак легионеллезной интоксикации. Встречается у трети больных. Некоторые авторы указывают на относительную брадикардию (ЧСС 100 при t 39,4°С) при легионеллезе, что сближает эту инфекцию с микоплазменной, вирусной пневмонией и пситтакозом. Значительная же часть авторов считает тенденцию к тахикардии более характерной для легионеллеза, как и для других бактериальных пневмоний.

Одышка — регистрируется во всех тяжелых и среднетяжелых случаях легионеллеза. Тип одышки определяется как смешанный при объективно выявляемом тахипноэ — до 50 дыханий в минуту. При филадельфийской вспышке (1976 г.) число дыханий превышало 25 в мин у 42% больных. Выраженность одышки можно свя-

зать с действием легионеллезного токсина, а также объемом и интенсивностью консолидации легких. Легионеллез нередко осложняется развитием острой дыхательной недостаточности, почти всегда требующей оксигенотерапии. У 20% больных возникает необходимость в искусственной вентиляции легких (ИВЛ). Эта группа больных характеризуется высокой летальностью.

Боли в грудной клетке плеврального генеза типичны для 50—60% больных легионеллезом. Болевой синдром варьирует от умеренного до резкого. У трети больных боли строго соответствуют интенсивности и локализации развивающегося парапневмонического фибринозного плеврита. Легионеллезное поражение плевры обусловливает болевой синдром и влияет на степень дыхательной недостаточности.

Кашель характерен для всех вариантов течения легионеллеза и появляется в первые 2—3 дня от начала болезни у 80—90% больных. У половины больных он приобретает малопродуктивный характер с отделением крайне скудной, вязкой, слизисто-гнойной мокроты.

Кровохарканье — значительно менее типично для легионеллеза, чем для пневмококковой или пневмонии Фридлендера. Оно отмечено у менее чем 30% больных легионеллезом.

При анализе клиники легионеллезной пневмонии удается выделить некоторые общие закономерности течения и физикальных данных. При перкуссии определяется притупление перкуторного звука под пораженной зоной легкого, что указывает на преимущественную локализацию воспалительного очага в базальных сегментах на глубине, не превышающей 4—5 см от поверхности легкого. Усиление бронхофонит и голосового дрожания иногда предшествует появлению тупости. При высокой плотности пневмонической инфильтрации над пораженной областью легкого выслушивается бронхиальное дыхание. Аускультативная картина включает влажные мелкопузырчатые хрипы, звучность которых варьирует от глухих до звонких. Даже в отсутствии массивной легочной консолидации фокальные влажные хрипы определяются у большинства больных легионеллезом. Сопутствующие сухие хрипы, указывающие на развитие бронхиальной обструкции, отмечены у половины больных легионеллезной пневмонией.

Физикальные параметры легионеллезной пневмонии строго связаны с характером легочного поражения, его объемом, типом развивающихся осложнений.

Для легионеллезных пневмоний более характерны правосторонние очаговые или долевые поражения легких, что нельзя, однако, рассматривать как патогномо ический признак легионеллеза, так как подобная локализация свойственна бактериальным пневмониям различной этиологии. Легионелла-пневмонию отличает от других острых пневмоний сравнительное разнообразие локализа-

ций и значительный удельный вес тотальных и субтотальных пневмоний (21%).

Рентгенологическая характеристика легочного поражения при легионеллезе схематично представлена двумя формами: односторонняя плевропневмония и двусторонняя очагово-инфильтративная пневмония.

Абсцедирование и другие виды легочной деструкции наряду с эмпиемой плевры и пневмотораксом нетипичны для легионеллеза и чаще встречаются у больных с наличием иммунодефицита различного генеза. Две трети больных легионелла-пневмонией демонстрируют прогрессирование процесса на рентгенограмме в первые 2—5 суток болезни с последующей билатерализацией. Дифференциальным рентгенологическим признаком легионелла-пневмонии является длительное разрешение воспалительной инфильтрации и плевральных изменений, даже на фоне этиотропной терапии. У 50% больных те или иные изменения выявляются на рентгенограмме через 3 месяца после выздоровления. Около трети больных легионеллезом дают исход пневмонии в очаговый пневмосклероз часто со стойкой реакцией плевры.

Внелегочная клиническая симптоматология отличается достаточным разнообразием и сопровождает тяжелое и среднетяжелое течение инфекции.

Неврологические нарушения. Преимущественным типом легионеллезного поражения ЦНС является диффузная токсическая энцефалопатия. Ствол головного мозга и мозжечок — главные мишени легионеллезного поражения ЦНС, выявляемые в виде дизартрии, атаксии, нистагма и паралича взора, в 10 раз чаще, чем у больных острой пневмонией иной этиологии.

Среди наиболее тяжелых неврологических расстройств при легионеллезе — мозговая кома, эпистатус. Поражение периферической нервной системы включает моторные невриты. На ЭЭГ выявляются, как правило, неспецифические изменения, характерные для токсического поражения мозга. При легионеллезе отмечены случаи развития делирия, энцефаломиелита.

Поражение мышечного и костно-суставного аппарата

Токсическое поражение мышц при легионеллезе варьирует от разлитой миалгии с мышечной слабостью до рабдомиолиза.

Последний является проявлением тяжелой интоксикации, сопровождается, как правило, острой почечной недостаточностью и повышенным содержанием КФК в плазме.

Желудочно-кишечные расстройства

Наиболее типичным проявлением является преходящая диарея, выявляемая в первые сутки заболевания или в коротком периоде продрома; отмечена у 10—15% больных легионеллезом. По убывающей частоте регистрируются тошнота, рвота, боли в животе, которые, как и диарея, приурочены к первым суткам болезни, а иногда предшествуют развитию респираторного синдрома. Казуистикой является развитие острого панкреатита, острого аппендицита, острой кишечной непроходимости, желтухи.

Поражение почек, сердца

Поражения почек при легионеллезе манифестируют, главным образом, в виде острого очагового нефрита. Осложнением, и нередко тяжелым, легионелла-пневмонии является острый канальцевый некроз, приводящий к прогрессирующей почечной недостаточности и летальному исходу, как правило, на фоне токсического шока и сосудистого коллапса.

Среди поражений сердца выделяют редкие эпизоды развития легионеллезного миокардита и перикардита. Причем последний, как правило, связан с массивным поражением плевры.

Анализ секционного материала более чем в 70% случаев легионеллеза указывал на увеличение селезенки и последующее выявление возбудителя из органа. При этом спленомегалия клинически фиксируется крайне редко. Патогенез диссеминированного характера поражения изучен недостаточно. Ежегодно регистрируются случаи сепсиса, как при эпидемиях, так и при спорадических случаях

Цитолитические и некротические процессы в инфицированных тканях, характерные для легионеллеза, указывают на важную роль в развитии болезни легионеров токсических факторов, разрушающих мембраны клеток-мишеней — цитолизинов.

Лабораторные параметры при легионеллезе и морфологическая оценка инфекции

Анализ крови. Лейкоцитоз характерен для 50—75% больных легионеллезом в дебюте заболевания. Содержание лейкоцитов выше 10 000/мл выявляется у 25% больных; 15 000—20 000/мл — у половины больных. Нейтрофилез с характерным сдвигом формулы влево встречается у более 80% больных легионеллезом.

Достаточно типичным для легионеллеза считается относительная лимфопения (1000/мл), отмечается у $^2/_3$ больных. Значительное ускорение СОЭ (до 100 мм/ч) характерно для легионеллеза: 60 мм/ч у 65% больных.

Биохимические параметры

Гипонатриемия (130 мм/л) в начале заболевания — 50—60% больных. Титры ферментов печени (АЛТ, АСТ) повышены у 50—75%; гипоальбуминемия и гипофосфатемия регистрируются, соответственно, в 65% и 50% случаев болезни.

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 слизистый или слизисто-гнойный, обнаруживается большое количество нейтрофилов и альвеолярных макрофагов.

Обычная окраска по Граму не позволяет выделить 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 и верификация диагноза легионеллеза методом прямой иммунофлюоресценции.

Морфологическая характеристика инфекции

Микроскопически ведущим органом-мишенью легионеллезной инфекции являются легкие и плевра.

Как правило, при патолого-анатомическом исследовании выявляется различная степень консолидации легочной ткани на стадии красного или серого опеченения. Деструкция легких относится к случаям инфекции на фоне иммунодефицита и в целом нетипична для легионеллеза. Выпот в плевральную полость, серозный или серозно-геморрагический, обнаруживается почти во всех летальных случаях легионеллеза, тогда как эмпиема плевры считается редкой находкой.

Наиболее типичными микроскопическими признаками легионеллеза рассматривают макрофагальную и нейтрофильную инфильтрацию альвеол, сопровождающуюся образованием фибрина и экстравазацией эритроцитов.

Дифференциально-диагностическим морфологическим признаком легионелла-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 рецидивирования инфекции.

Дифференциальная диагностика легионелла-пневмонии

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

Легионеллезная пневмония характеризуется следующими 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, поражение почек, сердца), наличие лабораторных сдвигов (нейрофилез, лимфопения, гипоальбуминемия, гипонатриемия, повышение титров АЛТ, АСТ, КФК, микрогематурия, протеинурия).

В дополнение к указанным клинико-лабораторным и рентгенологическим параметрам для дифференциации от других заболеваний необходимо учитывать эпидемиологический анамнез и наличие факторов риска: средний и пожилой возраст, весенне-летний период развития болезни, фактор 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 (ХНЗЛ, сахарный диабет, коллагенозы, лимфопролиферативные заболевания) и факторов первичного и вторичного иммунодефицита, употребление алкоголя, курения и пр.

Помимо этого необходимо подтверждение диагноза с помощью различных лабораторных тестов.

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 циллиарного 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 акустический 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 не отмечено очагово-инфильтративных и плевральных изменений. Двустороннее ограничение стояния куполов диафрагмы является характерным рентгенологическим признаком альвеолитов.

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 аьвеолите не обнаружено.

Легионеллезный альвеолит манифестирует, как правило, тяжелый вариант легионеллезной инфекции и регистрируется как спорадически, так и в виде ограниченных вспышек (Армавир, 1987). При изучении рентгенограммы больных эпидемическим вариантом легионеллезного альвеолита появляются признаки легочного васкулита, нередко и сопутствующая реакция плевры.

Лихорадка Понтиак

Непневмоническая форма легионеллеза — лихорадка Понтиак — по названию города в штате Мичиган (США), где произошла первая известная вспышка болезни в 1968 году. Ретроспективный анализ сывороток от заболевших в эту эпидемию указал на легионеллезную этиологию заболевания. Клиническая картина болезни представлена гриппоподобным синдромом: 1—2-дневная лихорадка (t до 40°С) с ознобом, сухим кашлем, катаральными явлениями носоглотки (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%, миалгии — 30%, диарея — 25%), заболевание протекает в легкой форме с регрессом клинической картины в короткие сроки (2—7 дней). Летель-

ные исходы при понтиакской лихорадке не зарегистрированы. Эта форма легионеллеза выявляется исключительно в эпидемическом варианте. Эпидемии лихорадки Понтиак, как правило, несут пневмонический «шлейф» (до 10% пораженных инфекций).

Спорадический аналог понтиакской лихорадки — острый бронхит — имеет те же клинические параметры.

Вопрос о том, почему один возбудитель — Legionella pneumophila — вызывает развитие различных клинических вариантов инфекционного поражения человека, остается нерешенным, несмотря на значительный прогресс медицинских знаний об этой новой бактериальной легочной инфекции.

2. ЭТИОТРОПНАЯ И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА

Антимикробная терапия легионеллезной инфекции

Выбор антибиотика при лечении острых пневмоний всегда представляет сложную клиническую задачу, требующую учитывать целый ряд факторов. Эффективность антибактериальной терапии следует рассматривать по традиционным критериям: нормализация или значительное снижение температуры в первые 48 часов от начала лечения, улучшение клинического состояния больного, положительная аускультативная динамика над легкими в виде уменьшения количества, распространенности и звучности хрипов и крепитации. Антибиотиком при лечении легионеллеза является эритромицин. Суточная доза препарата 2,0 г (0,5×4) для перорального приема адекватна легкому течению заболевания. Терапия должна быть начата при наличии подозрения на легионеллез ex juvantibus и при получении клинического эффекта продолжена вне зависимости от результата лабораторного исследования.

Длительность курса антибактериальной терапии при ее эффективности составляет в среднем 10—12 дней. Среднетяжелое и тяжелое течение заболевания, как правило, требует применения больших дозировок эритромицина: 4,0 г/сут. (1,0×4) внутривенно. При недостаточном клиническом эффекте рационально сочетание эритромицина с рифампицином (рифадин, бенемицин, римактан) в суточной дозе 1,2 г (0,6×2) на пероральный прием. При стойкой нормализации температуры, регрессе других клинических параметров пневмонии целесообразно осуществить переход с внутривенного на пероральный прием эритромицина с 4—5-го дня от начала лечения по снижающим дозировкам (4,0—2,0 г/сут). Продолжительность антимикробной терапии определяется динамикой процесса под влиянием лечения и при среднетяжелом и тяжелом вариантах

течения колеблется в пределах от 2 до 3 недель. Однако при необходимости (медленно разрешающийся процесс в легких, стойкий субфебрилитет) курс лечения может продолжаться 1,5—2 мес. Антибактериальная терапия эритромицином при его доказанной клинической эффективности и установленном лабораторном диагнозе легионеллеза может быть возобновлена при рецидиве инфекции. Там, где лечение эритромицином по разным причинам невозможно, рекомендуется применять доксициклин (вибрамицин, доксимицин) по следующей схеме: 200 мг — первая доза; 100 мг — через 12 час; 100 мг — 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 маркером легионеллеза.

По данным, основанным на 5-летнем опыте изучения легионеллеза в США, летальность в случаях инфекции на фоне иммунодефицита достигала 80%, если для лечения не использовался эритромицин.

Когда терапия эритромицином проводилась своевременно в адекватных дозировках, летальность при эпидемиях уменьшалась в 4—6 раз. Возможно также интраплевральное применение препарата, показанное 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 дней.

Как для внутривенного, так и интраплеврального введения применяется отечественный препарат — эритромицинфосфат, хорошо растворимый в воде и выпускаемый во флаконах по 100 мг. Для приема внутрь используется эритромицин в дозе 0,25 г в одной таблетке, иногда — 0,1 г, что значительно менее удобно, особенно при длительном лечении.

Следует подчеркнуть, что побочные явления при лечении эритромицином: тошнота, рвота, диарея — выявляются крайне редко. Ничтожна и частота аллергических реакций при лечении препаратом — 0,5%.

Таким образом, ведущим звеном в тактике этиотропной терапии всех клинических форм легионеллеза является эритромицин в суточной дозе 2,0—4,0 г, продолжительность приема которого составляет в среднем 14 дней. Перспективным направлением в антимикробной терапии легионеллеза считают использование новых синтетических препаратов группы макролидов и производных окси-

хинолиновой кислоты, ровамицин (Франция), таривид (ФРГ), эффективность которых, по предварительным данным, в отношении этой инфекции оценивается выше, чем эритромицина.

Принципы патогенетической терапии легионеллеза

Кортикостериоды абсолютно показаны при развернутой клинической картине легионеллезного альвеолита, осложненного острой дыхательной недостаточностью. Максимальная начальная доза стероидов при лечении легионеллезного альвеолита составляет 30—40 мг/сут в преднизолоновом эквиваленте.

Длительность стероидной терапии по снижающей схеме с отменой не превышает, как правило, 3 недель. В случаях, где легионеллез представлен тяжелой острой пневмонией, проявляющейся симптомами выраженной интоксикации, плевральным синдромом, артериальной гипотензией или коллапсом, стероидная терапия также необходима: преднизолон — до 240 мг/сут для внутривенного введения до купирования грозных синдромов (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 внимания препарат, нашедший широкое применение в практике лечения острых пневмоний,— презоцил (ВНР). Препарат представляет собой комбинацию преднизолона (0,75 мг), делагина (0,25 г) и аспирина (0,2 г). Презоцил применяется по 2 табл. 3—4 раза в день в течение 12—14 дней с последующей отменой. Синдром отмены и гипергликемия при лечении всех клинических форм легионеллезной инфекции кортикостероидами не зарегистрированы.

Обструктивные нарушения легочной вентиляции выявляются в 95% случаев пневмонии, особенно в острый период болезни. Поэтому целесообразным считается применение бронхолитиков при легионелла-пневмониях: теофедрин $^1/_2$ табл. 3 раза в день (12—14 дней).

При лечении легионеллеза довольно широкое применение имеет неспецифический иммунокорректор метилурацил, который назначается вне острой фазы, то есть, как правило, со второй недели от начала лечения.

Оправдано и рекомендовано применение водорастворимой камфоры сульфокамфоракаин 20% — 2,0—4,0 3 раза в день, в/м, при всех формах легионеллеза, так как препарат способствует снижению легочной гипертензии.

Посиндромная терапия легионеллеза должна включать дезинтоксикационные средства (гемодез, реополиглюкин), оксигенотерапию, трансфузии нативной плазмы и другие заменители протеинов.

С дезагрегантной целью при тяжелом и среднетяжелом течении инфекции показано применение гепарина, аспирина. При некроти-

ческих процессах в легочной ткани целесообразно использование ингибиторов протеаз (контрикал, гордокс).

В каждом случае характер терапии диктуется конкретной клинической ситуацией.

Резюмируя этиотропный и патогенетический подходы к терапии легионеллеза, следует подчеркнуть необходимость индивидуализации лечебной программы с учетом изложенных принципов. Такая тактика доказала свое преимущество перед канонизированной терапией в практике лечения острых воспалительных заболеваний легких различной этиологии.

3. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

В настоящее время используют три основные группы методов лабораторной диагностики:

1. Серологические методы.
2. Бактериологические методы.
3. Экспресс-методы обнаружения возбудителя и его антигенов.

Серологические методы получили наибольшее распространение для диагностики легионеллеза в связи с простотой их выполнения и доступностью практических лабораторий. Нарастание диагностических титров к возбудителю легионеллеза в любых двух из трех рекомендуемых серологических реакций с высокой степенью надежности подтверждает диагноз. К недостаткам 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 о наличии вспышки легионеллезной инфекции. Однако применение их на практике требует специальной подготовки персонала. Выделение культуры отдельно или из внешней среды и ее предварительная идентификация занимают не менее 2—3 недель.

Из высокочувствительных и специфичных методов экспресс-диагностики наибольшее распространение получила прямая иммунофлюоресценция. Однако спектр исследуемого материала тот же, что и при выделении культуры, редко позволяет поставить диагноз в первые дни заболевания. Иммуноферментный метод дает возможность обнаружить легионеллезный антиген в моче больных уже на 3—5-й день болезни.

Внедрение в практику работы клинических учреждений экспресс-методов позволит значительно ускорить постановку диагноза и своевременно начать этиотропную терапию.

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

1. Реакция непрямой иммунофлюоресценции (РИФ)

Техника постановки

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% CO_2. 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 (pH=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) pH=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 pH=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 90× (1,25) и окуляр 5×7 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 (титр не менее 1:64). 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 спиттакоза и лихорадки КУ. Однако титр антител в реакции с гомологичной культурой обычно бывает выше, чем с гетерологичной, что является основой для дифференциальной диагностики.

2. Реакция иммуноферментного анализа (ИФА)

Техника постановки реакции

В лунки полистиролового планшета вносят по 100 мкл растворимого антигена L. pneumophila в концентрации 1—10 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) pH=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, производства НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР). Конъюгат разводят тем же буфером с твином-20. 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 0,1М цитратно-фосфатном буфере pH=6,0 в присутствии 0,006% H_2O_2. 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.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Возбудитель редко удается выделить от больного. Для исследования берут материал бронхоскопии, плевральную жидкость, легочный экссудат. Описаны единичные случаи выделения возбуди-

теля 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.

1. 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 прорастания 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 (pH 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 (pH 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. Максимальное количество вводимых колоний обычно вырастает на 8—10-е сутки. При подозрении на рост легионелл 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 селезен-

ки 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, K_2HPO_4 — 0,85 г, KH_2PO_4 — 1,0 г, агар — 17 г, дистиллированная H_2O — 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 HCl. 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.

2. 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 10^3—10^4 клеток бактерий. Через 12—48 часов у морских свинок возникает лихорадочное заболевание с подъемом температуры до 39,5—41°С, пространией 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 (pH 7,0) через 48—72 часа появляется рост культуры. Если в отпечатках из органов присутствует малое число клеток возбудителя ($\leqslant 5$ 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-и 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.

3. 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. Окончательная идентификация в настоящее время возможна только в референс-центре НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи (с помощью биохимических тестов, газово-жидкостной хромотографии и гибридизации ДНК).

МЕТОДЫ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ

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 pH 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 90× (1,25) и окуляры 5×7× 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 (см. стр. 14). 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 pH 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.

2. Реакция иммуноферментного анализа (ИФА) для определения легионеллезного антигена

Реакция иммуноферментного анализа (ИФА) позволяет определить легионеллезный антиген в клиническом материале (моча, мокрота, бронхиальные смывы) при экспериментальных и клинических исследованиях.

Техника приготовления препаратов

В лунки полистироловых планшетов вносят по 100 мкл легионеллезных иммуноглобулинов в концентрации 20—30 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере (КББ) pH 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 pH 6,0, в присутствии 0,006% H_2O_2. 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.

4. ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ МЕРОПРИЯТИЯ

В настоящее время отсутствуют данные, подтверждающие контагиозность легионеллеза, поэтому изоляция и санитарная обработка лиц, находящихся в контакте с больными, и медицинского персонала не представляется целесообразной.

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

Легионеллы являются естественными обитателями пресноводных источников. Симбиотические взаимодействия с некоторыми бактериями, сине-зелеными водорослями, а также способность ле-

гионелл к внутриклеточному паразитизму в простейших (амебы, жгутиковые) определяют размножение легионелл в водоемах, различающихся по температуре, pH, содержанию органических и неорганических соединений, а также в почвах.

Высокие адаптивные способности легионелл позволяют бактериям успешно колонизовать искусственные водные резервуары: кондиционеры, увлажнители, охлаждающие башни-градирни, компрессорные устройства, системы водопроводной воды, душевые установки, плавательные бассейны, ванны для бальнеопроцедур, медицинское оборудование и инструменты и др.

Условия для выживания легионелл в искусственных сооружениях оказываются более благоприятными, чем в естественных, что приводит к накоплению возбудителя в значительных концентрациях и реальной возможности попадания в организм человека.

Для развития легионеллеза необходимо попадание мелкодисперсного аэрозоля, содержащего легионеллы, в легкие человека. Величина заражающей дозы не установлена, однако известно, что заражение здоровых людей происходит при концентрации легионелл в воде более 10^4 КОЕ/л. В этой связи профилактические мероприятия должны быть направлены на снижение концентрации возбудителя легионеллеза в водных системах. Основными способами контроля содержания легионелл в водных резервуарах являются термический и химический.

При первом способе осуществляют нагрев воды, контаминированной значительным количеством возбудителя, до температуры не менее 80°С в течение суток. Данный момент нашел применение при обработке систем отопления, водопроводной воды, замкнутых систем циркулирующей воды.

При химическом контроле наибольшее распространение получили соединения-донаторы активного хлора. Для дезинфекции целесообразно использовать соединения, обеспечивающие концентрацию остаточного хлора 1—3 мг/л. При необходимости сокращения времени хлорирования концентрацию активного хлора следует увеличивать до 20—50 мг/л. Для обеззараживания промышленных или бытовых водных резервуаров, градирен, прудов-отстойников, систем оборотного водоснабжения рекомендуется следующая схема. После проведения постоянного хлорирования при концентрации 2—3 мг/л свободного хлора в течение 24—48 часов переходят на хлорирование меньшими дозами 0,7—1,0 мг/л по 1 часу в сутки. Для подтверждения эффективности обеззараживающих мероприятий следует проводить бактериологическое исследование проб воды с определением концентрации легионелл.

Необходимо отметить, что убиквитарность легионелл не позволяет добиться полного удаления бактерий из эксплуатируемых водных систем или исключить их повторное заражение. Поэтому меры

эпидемиологического надзора должны сводиться к поддержанию допустимого уровня концентрации возбудителя (не более 10^3 КОЕ/л), не приводящего к эпидемическому легионеллезу.

На промышленных предприятиях, атомных и тепловых электростанциях, в больницах и гостиницах при наличии систем оборотного водоснабжения, используемых в технологических процессах для кондиционирования или охлаждения, необходимо не менее 2 раз в год проводить чистку и промывку систем. При обнаружении в системах легионелл необходимо ежеквартально проводить вышеописанные дезинфекционные мероприятия с последующим обязательным бактериологическим исследованием проб воды.

СБОР И ТРАНСПОРТИРОВКА МАТЕРИАЛА ОТ БОЛЬНЫХ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗОМ

1. 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.

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

3. 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.

4. При сборе секционного материала образцы пораженных участков легочной ткани, печени и селезенки (по 2—3 кусочка размером 1×1 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.

5. Материалы от больных с подозрением на легионеллез и неидентифицированные легионеллезные штаммы могут быть направлены в НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР для подтверждения диагноза по следующему адресу: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР.

ОТБОР И ТРАНСПОРТИРОВКА ОБРАЗЦОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

1. Отбор проб

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

Из одной точки необходимо брать по 2 и более пробы. Воду в количестве 500 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 может быть уменьшен до 100 мл. Бутыли с водой помещают в клеенчатые или полиэтиленовые мешки и упаковывают в ящик для доставки в лабораторию.

Для исследования берут смывы с внутренней поверхности кондиционеров, санитарно-технического и больничного оборудования, водопроводных кранов, головки 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. Тампоном, увлажненным 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 профильтрованную через фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

2. Условия хранения и транспортировки

Возбудитель хорошо сохраняется в водной среде. Образцы воды, содержащие возбудитель в концентрации 10^3 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. 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 температуре +4°С.

3. 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 7—8 тыс. 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.

1. Приготовление фосфатно-солевого буфера (ФСБ).

40 мл основного раствора (27,4 г/л NaH_2PO_4, 7,87 г/л Na_2HPO_4) смешивают с 8,5 г NaCl, добавляют дистиллированной воды до 1 л, проверяют pH, которая должна быть 7,2, стерилизуют при температуре 120°С в течение 20 минут.

2. Приготовление 0,5% среды яичного желтка.

Берут стерильной пипеткой 10 мл содержимого желточного мешка свежего куриного яйца и суспендируют их в 100 мл фосфатного буфера, добавляют 0,05% азида натрия, полученный 10% раствор хранят при температуре +4°С.

Для приготовления рабочего 0,5% раствора 10% раствор разводят фосфатным буфером pH 7,2 в 20 раз.

3. Среда с глицерином.

Берут 9 частей глицерина и 1 часть фосфатно-буферного раствора pH 8,5. Фосфатно-буферный раствор делают путем соединения 10 частей раствора № 1 и 1 части раствора № 2. Раствор № 1 делают путем соединения K_2HPO_4 — 1,161 г, NaCl — 0,85 г и H_2O — 100 мл. Раствор № 2 делают путем соединения KH_2PO — 0,907 г, NaCl — 0,85 г и H_2O — 100 мл.

4. Карбонат-бикарбонатный буфер 0,05 моль/л pH 9,5 (буфер присоединения).

Буфер делают путем соединения $NaHCO_3$ — 0,24 г, Na_2CO_3 — 0,7 г и 200 мл H_2O.

5. Буфер цитратный 0,1 моль/л, pH 5,5 (буфер для субстрата).

Буфер делают путем соединения лимонной кислоты — 0,234 г, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ — 0,9 г, H_2O — 62,5 мл.

Непосредственно перед использованием, после растворения добавить 0,3 мл 3% перекиси водорода.

Список необходимого лабораторного оборудования

1. Термостат t +37°С.
2. Холодильник t +4°С.
3. Потенциометр.
4. Микроскоп люминесцентный.
5. Весы технические.
6. Весы аналитические.
7. Автоматические пипетки-дозаторы.
8. Дистиллятор.
9. Планшеты для иммунологических реакций Ленинградского завода «Медполимер» ТУ 64-2-278—79.
10. Предметные стекла.
11. Петли для титрования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ РЕАКТИВОВ

№ п/п	Наименование реактивов	№ ГОСТа или ТУ	Примечание
1.	Натрий хлористый	ГОСТ 4233—77×4	
2.	Натрий фосфорнокислый однозамещенный	ГОСТ 245—76 чда	
3.	Натрий фосфорнокислый двузамещенный	ГОСТ 4172—76 хч	
4.	Натрий углекислый	ГОСТ 83—79 чда	
5.	Натрий двууглекислый	ГОСТ 4201—79 чда	
6.	Серная кислота	ГОСТ 4204—77 ч	
7.	Ацетон	ТУ 2603—79 чда	
8.	Твин-20		
9.	Орто-фенилендиамин	ТУ 60907—691—76	г. Харьков
10.	Бычий сывороточный альбумин (БСА)	ТУ 60910—342—75	Бел. НИИЭМ
11.	Пергидроль 30%	ГОСТ 10929—76 хч	
12.	Глицерин	ГОСТ 6259—75	
13.	Лимонная кислота	ГОСТ 3652—69	

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДИАГНОСТИКУМОВ

опытно-экспериментальные серии НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи

1. Иммунная легионеллезная сыворотка (контрольная положительная сыворотка).
2. Иммуноглобулины легионеллезные, сухие.
3. Иммуноглобулины легионеллезные, меченные пероксидазой хрена, сухие.
4. Иммуноглобулины легионеллезные, диагностические, люминесцирующие, сухие.
5. Антиген корпускулярный L. pneumophila 1, 2, 3 серотипа для РИФ.
6. Липополисахаридный (ЛПС) легионеллезный антиген (для контроля).
7. Антисыворотка кроличья к L. pneumophila.

ОТРЫВНОЙ ЛИСТОК

для учета использования методических рекомендаций «Клиника, лечение и диагностика легионеллеза»

(Направить в НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР по адресу: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18).

1. Клиника, лечение и диагностика легионеллеза (методические рекомендации).
2. Утвержден начальником _____
3. _____
(кем и когда получен документ)
4. Количество лечебно-профилактических учреждений, которые внедрили методы, предложенные данным документом.
5. Формы внедрения (семинары, подготовка и переподготовка специалистов, сообщения и пр.) и результаты применения метода (количество наблюдений за 1 год и эффективность).

6. Замечания и предложения (текст) _____

_____

_____

_____

7. Подпись _____
(должность, ф., и., о. лица, заполнявшего карту)

Подписано в печать 18.11.87. ЛБ30083. Формат 60×84 1/16. Бум. типографская № 1. Литературная гарн. Печать высокая. Условн. печ. л. 1,86. Тираж 1000 экз. Заказ № 1173. Бесплатно.

Ордена Трудового Красного Знамени тип. изд. «Звезда», 614600, г. Пермь, ГСП-131, ул. Дружбы, 34.

gost.e-ecolog.ru