

7. Obshhie trebovaniya k kompetentnosti ispytel'nykh i kalibrovочnykh laboratorij: GOST ISO/MEK 17025–2009 [General requirements for the competence of testing and calibration laboratories: GOST ISO/IEC 17025–2009]. Available at: <http://gostrf.com/normadata/1/4293801/4293801404.pdf> (accessed 05.12.2016). (In Russ.)
8. Otsenka sootvetstviya. Osnovnye trebovaniya k provedeniyu proverki kvalifikatsii: GOST ISO/IEC 17043–2013 [Conformity assessment. Basic requirements for the qualification test: GOST ISO/IEC 17043–2013]. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200108187> (accessed 05.12.2016). (In Russ.)
9. Politika Rosakkreditatsii v otnoshenii proverki kvalifikatsii putem provedeniya MSI : Utv. rukovoditelem Federal'noj sluzhby po akkreditatsii 28.10.2016. № 03.1-9.0099 [Policy of the Federal service for accreditation in respect of the qualification test by holding the ICT (approved by the Head of the Federal Service for Accreditation 28.10.2016, no. 03.1-9.0099)]. Available at: <http://oookompetentnost.ru/upload/iblock/aad/aad35ccf9be34b3ceeb77ef526449f3f.pdf> (accessed 05.12.2016). (In Russ.)
10. Sterlikov A.V. Analiz protsessa akkreditatsii ispytel'nykh laboratorij i organov inspektzii uchrezhdenij federal'nogo mediko-biologicheskogo agentstva [Analysis of the process of accreditation of testing laboratories and inspection agencies of the Federal medical-biological Agency]. Aktual'nye problemy mediko-sanitarnogo obespecheniya dejatel'nosti objektov morskoy tekhniki, predpriyatij s vrednymi i (ili) opasnymi proizvodstvennymi faktorami, a takzhe ekologicheskogo blagopoluchija territorij, obsluzhivaemykh Federal'nym mediko-biologicheskim agentstvom: Materialy IV Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii posvyashhennoj 50-letiyu Federal'nogo gosudarstvennogo unitarnogo predpriyatija nauchno-issledovatel'skogo instituta promyshlennoj i morskoy mediciny Federal'nogo mediko-biologicheskogo agentstva (28–29 iyunja 2017 g Sankt-Peterburg, Rossiya). Saint Petersburg, 2017, pp. 302–303. (In Russ.)
11. ILAC Policy for Participation in Proficiency Testing Activities ILAC P9:06/2014. Available at: <http://gac.gov.ge/files/ILAC.pdf> (accessed 05.12.2016).

Контактная информация:

Стерликов Александр Васильевич, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией ФГУП «Научно-технический центр радиационно-химической безопасности и гигиены» ФМБА России
тел.: +7 (903) 231-91-88, e-mail: asterlikov@mail.ru

Contact information:

Sterlikov Alexander, Candidate of Medical Sciences, Head of laboratory of the Scientific and Technical Center of Radiation-Chemical Safety and Hygiene of the Federal Medical-Biological Agency of Russia
phone: +7 (903) 231-91-88, e-mail: asterlikov@mail.ru

© Рыковская О.А., Полеева М.В., Чемисова О.С., Трухачев А.Л., 2018

УДК 579.843:57.083.18:576.3

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ИДЕНТИФИКАЦИИ *V. PARAHAEMOLYTICUS* С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

О.А. Рыковская, М.В. Полеева, О.С. Чемисова, А.Л. Трухачев

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора,
ул. Максима Горького, 117/40, г. Ростов-на-Дону, 344002, Россия

Бактерии V. parahaemolyticus – галофильные микроорганизмы, которые могут быть причиной возникновения острого кишечного заболевания у людей, протекающего по типу пищевой токсикоинфекции. Успех лечебно-профилактических и санитарно-эпидемиологических мероприятий, направленных на предотвращение распространения «галофилов» во многом зависит от своевременной точной идентификации штаммов вибрионов, выделяемых от больных, из морепродуктов и при мониторинге объектов окружающей среды. В данной работе представлен способ идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом ПЦР в режиме реального времени (Real-Time PCR), который включает выделение хромосомной ДНК из исследуемого материала, постановку ПЦР со сконструированными нами праймерами, специфичными к участку гена коллагеназы *vppC*, и зондом, позволяющим детектировать амплифицированный фрагмент и проводить учет полученных результатов в режиме реального времени.

Ключевые слова: парегемолитические вибрионы; металлопротеаза (коллагеназа); ПЦР в режиме реального времени.

O.A. Rykovskaya, M.V. Poleeva, O.S. Chemisova, A.L. Trukhachev **□ DEVELOPMENT OF A METHOD FOR IDENTIFYING OF *V. PARAHAEMOLYTICUS* BY REAL-TIME PCR**
□ Rostov-on-Don Research Institute for Plaque Control of Rospotrebnadzor, 117/40, Maxim Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russia.

Bacteria of the species V. parahaemolyticus are halophilic microorganisms that may be causing acute enteric disease in humans, occurring according to the type of foodborne illness. The success of the treatment-and-prophylactic and sanitary-epidemiological measures aimed at the prevention of the proliferation of «halophiles» largely depends on timely and accurate identification of strains of *Vibrio* secreted from patients, seafood, as well as in monitoring of environmental objects. This paper presents a method of identifying strains of the species *V. parahaemolyticus* by PCR in «real time» (Real-Time PCR), which enables the selection of chromosomal DNA from the test material, the PCR with the designed by us primers specific to the portion of a gene collagenase *vppC* and the probe, allowing to detect amplification the fragment and to incorporate the results in real-time.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; metalloprotease (collagenase); Real-time PCR.

В последние годы все большее внимание уделяется случаям пищевых инфекций среди людей, вызываемых галофильными вибрионами. Наиболее частым этиологическим агентом диарейных заболеваний, связанных с галофильными микроорганизмами, являются штаммы *V. parahaemolyticus*. Средой обитания представителей вида *V. parahaemolyticus* является морская вода, а основным фактором передачи человеку служат инфицированные ими гидробионты. Опасность заражения *V. parahaemolyticus* существует везде, где население использует в питании продукты моря и контактирует с морской водой. Поэтому для практического здравоохранения важно быстро и достоверно определить возбудителя в исследуемом материале.

В настоящее время существует большое количество микробиологических методов детекции, основанных на культивировании, выделении чистых культур и биохимической идентификации этих вибрионов [1]. Сложность идентификации и дифференциации парегемолитических от других близкородственных видов вибрионов традиционными методами обусловлена их большим фенотипическим сходством, вариабельностью признаков и, как следствие, небольшой относительной диагностической ценностью отдельных таксономических тестов. Для быстрой идентификации *V. parahaemolyticus* успешно применяется метод MALDI-ToF масс-спектрометрии; однако, не все лаборатории оснащены необходимым оборудованием [5].

В связи с этим весьма перспективен метод ПЦР с видоспецифичными праймерами, позволяющий определить в геноме бактерий участки молекулы ДНК, специфичные для каждого вида микроорганизма [6, 8, 10]. Данный метод обладает рядом преимуществ по сравнению с традиционными бактериологическим и серологическим методами, так как сочетает в себе быстроту и простоту исполнения, а также высокую специфичность и чувствительность при выявлении патогенных микроорганизмов. Однако недостатком данного метода является необходимость учета результатов реакции с помощью электрофореза, что требует дополнительное время и оборудование, а также отдельные рабочие зоны, для предотвращения контаминации анализируемых образцов.

В последние годы широкое распространение получил метод идентификации микроорганизмов с помощью полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (Real-Time PCR) [9]. Основными преимуществами Real-Time PCR является объединение этапов амплификации и детекции, что упрощает процедуру анализа, снижает риск контаминации, позволяет проводить количественный учет результатов, обеспечивает высокую специфичность и чувствительность анализа [3].

Ранее было показано, что для *V. parahaemolyticus* видоспецифичным является участок ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность генов металлопротеазы (коллагеназы) – *vppC* [4, 7]. Однако в Российской Федерации отсутствуют зарегистрированные олигонуклеотидные праймеры и зонды для видовой идентификации вида *V. parahaemolyticus*. Поэтому **цель исследования** – разработка способа идентификации вида *V. parahaemolyticus* на основе метода полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (Real-Time PCR).

Материалы и методы. В работе было использовано 100 штаммов *V. parahaemolyticus* из коллекции Музея живых культур ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора с точно установленной видовой принадлежностью, а также коллекционные штаммы других видов рода *Vibrio*: *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. hollisae*, *V. vulnificus*, *V. harvey*, *V. mimicus*, *V. furnisii* и *V. fortis*.

Для анализа нуклеотидной последовательности ДНК *V. parahaemolyticus* была использована база данных GeneBank. Для поиска уникальных последовательностей специфического гена были использованы ресурсы GeneBank – on-line Blast. Для конструирования праймеров и зонда было применено программное обеспечение PrimerM (ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора) и BLAST NCBI.

Синтез сконструированных нами праймеров и зонда был осуществлен компанией «Синтол» (г. Москва). Затем были подобраны оптимальные условия проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (концентрация праймеров, температурные параметры и количество циклов амплификации). Для проведения амплификации использована коммерческая стандартизированная реакционная смесь для проведения ПЦР в режиме реального вре-

мени компании «Синтол» (г. Москва). Амплификацию и флуоресцентную детекцию проводили на автоматическом детектирующем термоджеле «ДТ-Lite» (ДНК-технология, Россия), в режиме реального времени.

Результаты исследования. Для дизайна праймеров был использован ген металлопротеазы (коллагеназы) *V. parahaemolyticus*. С помощью программного обеспечения PrimerM (ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора) и BLAST NCBI был проанализирован участок гена металлопротеазы (коллагеназы), в результате чего определен специфический фрагмент гена, который был использован в качестве мишени для конструирования специфического зонда, комплементарного соответствующей последовательности ДНК. Зонд имел следующую структуру: *vppCProbaA* (ROX-CG-TTC-ACA-ACC-ACC-AAC-AGC-AAC-GAC-TTG-BHQ2). Зонд комплементарен специфическим продуктам ПЦР, гибридизуясь с ними и впоследствии разрушаясь под воздействием ДНК-полимеразы во время ферментативной реакции, что приводит к началу флуоресцентного свечения флуорофора, связанного с зондом. Данный специфический зонд *vppCProbaA*, содержащий в своем составе флуоресцентную метку ROX, гаситель флуоресценции BHQ2.

Для амплификации в ПЦР фрагмента ДНК, содержащего мишень для зонда, и в соответствии с нуклеотидной последовательностью зонда были сконструированы и синтезированы специфичные для вида *V. parahaemolyticus* праймеры:

Праймер *vppCFor* (CGG-CAA-GCG-TGG-TTT-GTG-AC)

Праймер *vppCRev* (CGT-TGA-TGC-AAC-TTG-CAC-CTT-G).

Для постановки ПЦР суточные агаровые культуры суспендировали в дистиллированной воде до 1×10^6 микробных клеток в 1 мл и обеззараживали прогреванием при 100 °C в течение 15 минут, согласно МУ 1.3.2569-09 [2]. Затем дебрис осаждали центрифугированием при 10 тыс. об./мин в течение 5 минут, и супернатанты использовали в качестве ДНК-матрицы при ПЦР.

Следующий этап заключался в составлении реакционной смеси для ПЦР. Реакцию проводили в 25 мкл смеси, содержащей: 1 х (в финальной концентрации) буферный раствор для ПЦР в реальном времени (Интерлабсервис, Москва), 0,25 mM каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов (Thermo Scientific), 1 ед. Таq-полимеразы с функцией «горячего старта» (Интерлабсервис, Москва), 2,5 mM хлористого магния (Интерлабсервис, Москва), 50 пкМ каждого праймера, 50 пкМ зонда и 20 нг хромосомной ДНК одного из исследуемых штаммов.

После приготовления реакционной смеси осуществляли постановку реакции амплификации в автоматическом детектирующем амплификаторе ДТ-Lite (ДНК-технология, Россия), в котором были заданы следующие условия амплификации: первичной денатурации и активации Таq-полимеразы (94 °C, 15 мин), 35 циклов, включающих этапы 94 °C, 30 с, 55 °C, 30 с (детекция) и 72 °C, 30 с.

Детекция флуоресценции производится автоматически в ходе проведения ПЦР с помощью детектирующего амплификатора. При на-

личии в исследуемой пробе ДНК гена металлопротеазы (коллагеназы) вида *V. parahaemolyticus* с помощью используемой пары специфических праймеров гибридизируется зонд, так как является комплементарным ему (фрагменту), а последующее разрушение зонда Taq-полимеразой приводит к началу флуоресцентного свечения флуорофора ROX с длиной волны 605 нм, которое регистрируется прибором.

Учет детекции флуоресцентного свечения по соответствующей длине волны в амплификаторе отражается на мониторе компьютера, связанного с прибором, в виде графиков, на которых представлены кривые и численные значения, отражающие уровни флуоресцентного свечения определенной длины волны, соответствующие каждой пробе, взятой для исследования.

При апробации предложенного способа на коллекционных штаммах *V. parahaemolyticus* (100 штаммов) с точно установленной видовой принадлежностью и штаммах видов *V. alginolyticus* (25 штаммов), *V. fluvialis* (10 штаммов), *V. hollisae* (5 штаммов), *V. vulnificus* (10 штаммов), *V. harvey* (5 штаммов), *V. mimicus* (5 штаммов), *V. furnisii* (5 штаммов) и *V. fortis* (2 штамма) разработанные праймеры и зонд показали 100%-ю специфичность по отношению к штаммам *V. parahaemolyticus*.

Флуоресцентный сигнал с длиной волны 605 нм, характерной для флуорофора ROX, детектировался в ПЦР выше порогового значения тогда, когда пробы содержали ДНК параземолитических вибрионов, и не детектировался в случае содержания в пробах ДНК других представителей рода *Vibrio* (табл. 1).

Заключение. В результате проведенной работы были сконструированы специфические праймеры и зонд к ДНК гена металлопротеазы (коллагеназы) *V. parahaemolyticus*. Были подобраны оптимальные условия проведения полимеразной цепной реакции с выбранной парой праймеров и флуоресцентным зондом в режиме реального времени. Использование предполагаемого способа выявления специфического участка ДНК гена металлопротеазы (коллагеназы) *V. parahaemolyticus* с помощью ПЦР в режиме реального времени позволит быстро, точно и эффективно проводить идентификацию представителей вида *V. parahaemolyticus* и дифференцировать их от близкородственных видов. Простое в исполнении тестирование, небольшая себестоимость, высокая чувствительность и специфичность данных праймеров и зонда даст возможность применять их в практике бактериологических лабораторий Центров гигиены и эпидемиологии, а также в лечебно-профилактических, противочумных и других учреждениях.

Таблица 1. Результаты идентификации клинических штаммов *V. parahaemolyticus* методом Real-Time ПЦР

№ п/п	Вид микроорганизма	Количество исследованных штаммов	Результаты ПЦР	
			количество положительных проб	количество отрицательных проб
1	<i>V. parahaemolyticus</i>	100	100	0
2	<i>V. alginolyticus</i>	25	0	25
3	<i>V. fluvialis</i>	10	0	10
4	<i>V. hollisae</i>	5	0	5
5	<i>V. vulnificus</i>	10	0	10
6	<i>V. harvey</i>	5	0	5
7	<i>V. mimicus</i>	5	0	5
8	<i>V. furnisii</i>	5	0	5
9	<i>V. fortis</i>	2	0	2

ЛИТЕРАТУРА (п. 6–10 см. References)

1. Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых параземолитическими и другими патогенными для человека вибрионами: МУК 4.2.1793–03. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 26 с.
2. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности: МУ 1.3.2569–09 М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. 51 с.
3. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР в реальном времени. М: Бином. Лаборатория знаний, 2009. 223 с.
4. Рыковская О.А., Чемисова О.С., Смоликова Л.М. и др. Дифференциация представителей *Vibrio parahaemolyticus* и *Vibrio alginolyticus* // Клиническая лабораторная диагностика. 2014. Т. 59. № 12. С. 50–55.
5. Чемисова О.С., Телесманич Н.Р., Рыковская О.А. и др. Масс-спектрометрический анализ как метод идентификации и внутривидовой дифференциации *Vibrio parahaemolyticus* // Холе́ра и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии. Ростов-на-Дону. 2013. Вып. 26. С. 153–157.

REFERENCES

1. Laboratornaya diagnostika zabolevanij, vyzyvayemykh paragemoliticheskimi i drugimi patogennymi dlya cheloveka vibriionami: MUK 4.2.1793–03 [Laboratory diagnosis of diseases caused by parahaemolyticus and other pathogenic for humans vibrios: MUK 4.2.1793–03]. Moscow: Moscow: Federal'nyi center gossanepidnadzora Minzdrava Russii Publ., 2004. 26 p. (In Russ.)
2. Organizatsiya raboty laboratorij, ispol'zujushchikh metody amplifikatsii nukleinovykh kislot pri rabote s materialom, soderzhashhim mikroorganizmy I–IV grupp patogennosti: MU 1.3.2569–09 [Organization of work of laboratories using methods of nucleic acid amplification when working with material containing microorganisms of pathogenicity groups I–IV: MU 1.3.2569–09]. Moscow: Federal'nyi center gigeny i epidemiology Rosпотреbnadzora, 2010. 51 p. (In Russ.)
3. Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Ju. et al. PCR v real'nom vremeni [Real-time PCR]. Moscow: Binom. Laboratorija znaniy, 2009. 223 p. (In Russ.)

4. Rykovskaja O.A., Chemisova O.S., Smolikova L.M. et al. Differentsiatsiya predstavitelej *Vibrio parahaemolyticus* i *Vibrio alginolyticus* [Differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* representatives]. Klinicheskaja laboratornaja diagnostika, 2014, vol. 59, no. 12, pp. 50–55. (In Russ.)
5. Chemisova O.S., Telesmanich N.R., Rykovskaja O.A. et al. Mass-spektrometričeskij analiz kak metod identifikatsii i vnutrividovoj differentsiatsii *Vibrio parahaemolyticus* [Mass spectrometric analysis as a method of identification and intraspecific differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*]. Holera i patogennye dlya cheloveka vibriony: Mater. probl. komissii. Rostov-on-Don, 2013, issue 26, pp. 153–157. (In Russ.)
6. Chakraborty R. et al. Species-specific identification of *Vibrio fluvialis* by PCR targeted to the conserved transcriptional activation and variable membrane tether regions of the *toxR* gene / R. Chakraborty, S. Sinha, A.K. Mukhopadhyay [et al.] // J. Med. Microbiol. 2006. Vol. 55. pp. 805–808.
7. Di Pinto A. et al. A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* / A. Di Pinto, G. Ciccarese, G. Tantillo // J. of Food Protection. 2005. Vol. 68. № 1. pp. 150–153.
8. Khamesipour F. et al. Detection of *Vibrio* spp. in shrimp from aquaculture sites in Iran using polymerase chain reaction (PCR) / F. Khamesipour, E. Noshadi, M. Moradi [et al.] // J. AACL Bioflux. 2014. Vol. 7. № 1. pp. 1–7.
9. Panicker G. et al. Real-time PCR detection of *Vibrio vulnificus* in oysters: comparison of oligonucleotide primers and probes targeting *vvhA* / G. Panicker, A.K. Bej // J. Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71. № 10. pp. 5702–5709.
10. Reham A.A. et al. Specific Detection of Pathogenic *Vibrio* species in shellfish by using multiplex polymerase chain reaction / A.A. Reham, M.S. Amami // J. Global Veterinaria. 2012. Vol. 8. № 5. pp. 525–531.

Контактная информация:

Рыковская Оксана Алексеевна, научный сотрудник музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора тел.: +7 (928) 191-15-42, e-mail: rykovskaya_ou@antiplague.ru

Contact information:

Rykovskaya Oksana, Researcher of the Museum of living cultures with the Center of human pathogenic vibrios of Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control of Rosпотреbnadzor phone: +7 (928) 191-15-42, e-mail: rykovskaya_ou@antiplague.ru