

УДК 579.843:57.083.18:576.3:616-078

DOI: 10.17072/1994-9952-2019-2-175-181.

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

Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-н/Д, Россия

## РАЗРАБОТКА СПОСОБА ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* С ПОМОЩЬЮ REAL-TIME ПЦР

Бактерии *Vibrio parahaemolyticus* могут быть причиной возникновения острого кишечного заболевания у людей, протекающего по типу пищевой токсикоинфекции. Успех лечебно-профилактических и санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение распространения «галофилезов», во многом зависит от своевременной точной идентификации штаммов вибрионов, выделяемых от больных, из морепродуктов и при мониторинге объектов окружающей среды. Представлена разработка способа 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. Показана возможность индикации и идентификации микроорганизмов вида *V. parahaemolyticus* при исследовании проб биологического материала (рыба, морепродукты) на основе метода Real-Time PCR.

**Ключевые слова:** *Vibrio parahaemolyticus*; Real-Time PCR; праймеры; металлопротеаза (коллагеназа).

**M. V. Poleeva, O. S. Chemisova, A. L. Trukhachev**

Research Institute for Plaque Control, Rostov-on-Don, Russian Federation

## THE DEVELOPMENT OF REAL-TIME PCR METHOD FOR INDICATION AND IDENTIFICATION OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

Bacteria *V. parahaemolyticus* - gram-negative halophilic bacteria that can be the cause of acute intestinal disease in humans, occurring as food toxicoinfection. The success of the treatment-and-prophylactic and sanitary-anti-epidemic measures aimed at preventing of "halophiles" spreading largely depends on timely and accurate identification of *Vibrio cholerae* strains isolated from patients, seafood and under monitoring of environmental objects. This article presents the development of a method for identifying *V. parahaemolyticus* strains by Real-Time PCR, which includes the isolation of chromosomal DNA from the test material, setting up the PCR method with constructed primers specific to the site of the collagenase gene *vppC* and probe, allowing to detect the amplified fragment and to record the results in real time. The possibility of indication and identification of microorganisms of *V. parahaemolyticus* species under the study of samples of biological material (fish, seafood) based on the Real-Time PCR method is shown.

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

### Введение

*Vibrio parahaemolyticus* – грамотрицательная галофильная бактерия, встречающаяся в природе в морских и эстуарных водах и часто изолируемая из различных морепродуктов – устриц, креветок, крабов, лобстеров, омаров, раков, рыбы (треска, сардина, скумбрия, камбала), осьминогов, гребешков и замороженных морепродуктов во многих странах мира [Spanggaard et al., 2000; Hara-Kudo et al., 2001; Deeranjalil et al., 2005]. Этот возбудитель вызывает заболевание по типу острого гастроэнтерита, характеризующегося тошнотой, рвотой, спаз-

мами в животе, диареей [Chakraborty, Nair, Shinoda, 1997; Daniels et al., 2000]. Выявлена взаимосвязь обсемененности вибриофлорой воды и рыбы с заболеваемостью людей. Заражение людей происходит при употреблении в пищу некачественно приготовленных продуктов моря. Так, установлено, что последние годы в Астраханской обл. острые кишечные инфекции, обусловленные вибрионами, составляют около 14% всех диарей. В районах промысла дельты р. Волги различные вибрионы были выделены из судака, осетра, белуги, стерляди. Заболевания, вызываемые парагемолитическими вибрионами и связанные с употребле-

нием в пищу морепродуктов, регистрируются на побережье Черного и Азовского морей [Домницкий, 2016]. В 2012 г. была зарегистрирована вспышка пищевой токсикоинфекции, вызванной *V. parahaemolyticus* в Хасанском р-не Приморского края.

Успех лечебно-профилактических и санитарно-эпидемиологических мероприятий, направленных на предотвращение распространения «галофилезов», во многом зависит от своевременной точной идентификации штаммов вибрионов, выделяемых от больных, из морепродуктов, а также при мониторинге объектов окружающей среды.

В настоящее время существует большое количество микробиологических методов детекции, основанных на культивировании, выделении чистых культур и биохимической идентификации этих вибрионов [Лабораторная ..., 2004]. Сложность идентификации и дифференциации парагемолитических от других близкородственных видов вибрионов традиционными методами обусловлена их большим фенотипическим сходством, вариабельностью признаков и, как следствие, небольшой относительной диагностической ценностью отдельных таксономических тестов.

Молекулярно-генетические методы находят широкое применение, как для идентификации культивируемых микроорганизмов, так и для детекции специфических групп бактерий. Для быстрой идентификации *V. parahaemolyticus* успешно применяется метод MALDI-ToF масс-спектрометрии; однако, не все лаборатории оснащены необходимым оборудованием [Чемисова и др., 2013; Полеева, Чемисова, 2018].

Методы диагностики бактериальных инфекций на основе видоспецифичной полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностика) показали свое преимущество перед классическими микробиологическими методами [Белькова, Дзюба, Суханова, 2009] и могут стать основой молекулярно-генетического мониторинга ассоциированной микрофлоры водных организмов. Они требуют меньшего времени и эффективны в детекции конкретных патогенов на всех стадиях заболевания. ПЦР-диагностика позволяет корректно идентифицировать микроорганизмы, культивирование и определение которых по классическим биохимическим тестам затруднительно. Эти методы активно используются в странах с развитой аквакультурой, постоянно совершенствуются и развиваются [Buller, 2004; Белькова и др., 2010].

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), преимуществами которого являются объединение этапов амплифика-

ции и детекции, что упрощает процедуру анализа, снижает риск контаминации, позволяет проводить количественный учет результатов, обеспечивает высокую специфичность и чувствительность анализа [Ребриков и др., 2009].

Ранее зарубежными авторами, были выявлены видоспецифичные для *V. parahaemolyticus* участки ДНК и разработаны методы идентификации с помощью ПЦР с электрофоретическим способом учета результатов [Di Pinto, Ciccacese, Tantillo, 2005; Luan et al., 2007; Reham, Amani, 2012; Li et al., 2016]. Однако учет результатов реакции с помощью электрофореза требует дополнительного времени, организации отдельной рабочей зоны в связи с повышенным риском контаминации. Эти обстоятельства усложняют использование метода ПЦР с учетом результатов с помощью электрофореза в геле. Метод Real-Time ПЦР лишен этих недостатков. На сегодняшний день в Российской Федерации отсутствуют зарегистрированные олигонуклеотидные праймеры и зонды для видовой идентификации вида *V. parahaemolyticus*, а существующие зарубежные тест-системы являются дорогостоящими для широкого применения в лабораторной практике.

Цель данной работы – разработка способа индикации и идентификации микроорганизмов вида *V. parahaemolyticus* при исследовании проб биологического материала (рыба, морепродукты) на основе метода полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (Real-Time PCR).

## Материалы и методы исследования

В работе были использованы штаммы *V. parahaemolyticus* (100 штаммов) из коллекции Музея живых культур ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, а также коллекционные штаммы других видов рода *Vibrio* – *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).

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). Для проведения амплификации использована коммерческая стандартизированная реак-

ционная смесь для проведения ПЦР в режиме «реального времени» компании «Синтол» (г. Москва). Амплификацию и флуоресцентную детекцию проводили на автоматическом детектирующем термоциклере «ДТ-Lite» (ДНК-технология, Россия), в режиме «реального времени».

#### Подготовка материала для исследования

1. Штаммы микроорганизмов. Суточные агаровые культуры суспендировали в дистиллированной воде до  $1 \times 10^9$  микробных клеток в 1 мл (м. кл./мл) и обеззараживали прогреванием при 100°C в течение 30 мин., согласно МУ 1.3.2569-09 [МУ 1.3.2569-09, 2010]. Затем дебрис осаждали центрифугированием при 10 тыс. об/мин в течение 5 мин. и использовали супернатанты в качестве ДНК-матриц при ПЦР.

2. Образцы тканей рыбы (судака), искусственно контаминированной бактериями *V. parahaemolyticus*. В исследование брали кусочки кожи с чешуей и мышцами. Навеску массой 1 г измельчали и тщательно растирали в стерильной ступке с 2–3 г стерильного кварцевого песка. Добавляли 10 мл забуференного физиологического раствора, тщательно перемешивали. Затем к гомогенату добавляли 0.1 мл микробной взвеси *V. parahaemolyticus*, содержащей  $10^9$ – $10^3$  м. кл./мл согласно стандарту мутности ГИСК им. Тарасевича. Тщательно перемешивали и давали отстояться приготовленной смеси 20 мин. при комнатной температуре. Затем через стерильный тампон отбирали пробу (надсадочную жидкость) объемом 0.5 мл и использовали в качестве ДНК-матриц при ПЦР.

3. При использовании бактериальных взвесей с концентрацией  $10^4$ – $10^1$  м. кл./мл проводили дополнительное обогащение в 1%-ной пептонной воде с 2%-ным NaCl в течение 8 ч. Контроль количества клеток проводили бактериологическим высевом на плотную питательную среду с последующим подсчетом колоний. ПЦР ставили через 2, 4, 6, 8 ч. выращивания в среде обогащения.

**Выделение ДНК** проводили с помощью комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала «АмплиПрайм ДНК-сорб-В», согласно прилагаемой инструкции. В качестве контроля реакции использовали бактериальные взвеси в концентрации  $10^9$ – $10^3$  м. кл./мл согласно стандарту мутности ГИСК им. Тарасевича.

**Приготовление реакционной смеси для ПЦР.** Реакцию проводили в 25 мкл смеси, содержащей: буферный раствор для ПЦР в реальном времени; 0.25 мМ каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов; 1 ед. Taq-полимеразы с функцией «горячего старта»; 2.5 мМ хлористого магния; 50 пкМ каждого праймера; 50 пкМ зонда и 20 нг хромосомной ДНК одного из исследуемых образцов.

**Амплификация.** Постановку реакции амплификации в автоматическом детектирующем амплификаторе ДТ-Lite (ДНК-технология, Россия), в котором были заданы следующие условия: первичной денатурации и активация Taq-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 наличии 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.

#### Результаты и их обсуждение

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 содержит 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 специфические для вида *V. parahaemolyticus* праймеры:

– праймер vppCFor (CGG-CAA-GCG-TGG-TTT-GTG-AC);

– праймер vppCRev (CGT-TGA-TGC-AAC-TTG-CAC-CTT-G).

Был получен патент на изобретение «Способ идентификации штаммов вида *Vibrio parahaemolyticus* методом ПЦР в режиме реального времени № 2644232 от 8 февр.2018 г.

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

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

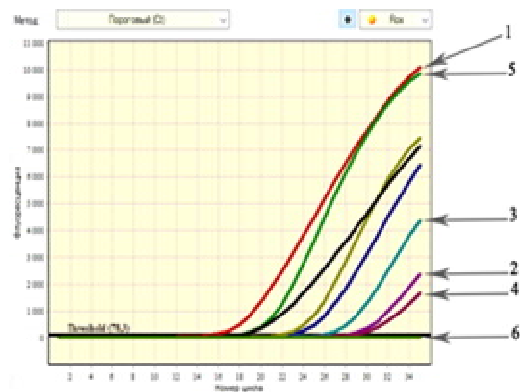
Вид микроорганизма	Число исследованных штаммов	Результаты ПЦР	
		число положительных проб	число отрицательных проб
<i>V. parahaemolyticus</i>	100	100	0
<i>V. alginolyticus</i>	25	0	25
<i>V. fluvialis</i>	10	0	10
<i>V. hollisae</i>	5	0	5
<i>V. vulnificus</i>	10	0	10
<i>V. harvey</i>	5	0	5
<i>V. mimicus</i>	5	0	5
<i>V. furnisii</i>	5	0	5
<i>V. fortis</i>	2	0	2

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* (таблица). При исследовании чистых культур бактериальных суспензий положительный результат нами наблюдался при концентрации клеток  $10^9$ – $10^5$  м. кл./мл. При этом наблюдалась зависимость количества клеток и номера цикла (начала реакции): 15-й цикл при  $10^9$  м. кл./мл и 29-й при  $10^5$  м. кл./мл. (рисунок).

Таким образом, в результате проведенной нами работы были сконструированы специфичные 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.

Следующим этапом нашей работы было определение возможности использования сконструированных нами праймеров для индикации штаммов *V. parahaemolyticus* в биологическом материале. Для этого использовали пробы рыбы, искусственно контаминированные бактериями *V. parahaemolyticus*. В результате наблюдали наличие флуоресценции по каналу ROX в пробах, содержащих (с учетом разведений)  $10^7$ – $10^5$  м. кл./мл. При этом реакция начиналась позже, чем при постановке ее с чистой культурой микроорганизмов:  $10^7$  – 27-й цикл,  $10^5$  – 31-й цикл (рисунок).



Зависимость флуоресценции канала ROX и номера цикла от состава пробы:

- 1 – концентрация клеток чистой культуры *V. parahaemolyticus*  $10^9$  м. кл./мл; 2 – концентрация клеток чистой культуры *V. parahaemolyticus*  $10^5$  м. кл./мл; 3 – концентрация клеток *V. parahaemolyticus* в контаминированной пробе рыбы,  $10^7$  м. кл./мл; 4 – концентрация клеток *V. parahaemolyticus* в контаминированной пробе рыбы,  $10^5$  м. кл./мл; 5 – положительный контроль; 6 – отрицательный контроль

Проведенные нами исследования показали возможность использования полученных праймеров, специфичных последовательности генов металлопротеазы (коллагеназы) – vppC *V. parahaemolyticus*, для индикации параземолитических вибрионов в зараженных пробах рыбы. Чувствительность реакции составила  $10^5$  м. кл. в 1 г зараженного продукта.

При изучении возможности использования среды обогащения (1%-ная пептонная вода с 2%-ным NaCl) для накопления культуры в пробах, содержащих *V. parahaemolyticus* в количестве  $10^1$ – $10^4$  м. кл./мл было показано, что после «подрасщивания» проб, изначально содержащих  $10^4$  м. кл./мл, в течение 4 ч. в среде обогащения количество колоний на плотной агаровой среде составило  $10^5$  м. кл./мл; пробы, изначально содержащие  $10^1$  м. кл./мл, достигли концентрации  $10^5$  м. кл./мл через 8 ч. выращивания в среде обогащения. После проведения ПЦР в режиме «реального времени» через 8 ч. выращивания наблюдали наличие флуоресценции по

каналу ROX в пробах, изначально содержащих  $10^1$  м. кл./мл.

Использование метода Real-Time ПЦР с предложенными нами праймерами, позволяет существенно повысить достоверность ПЦР-анализа, исключив возможность контаминации; сократить трудозатраты и время анализа, задействовав в аналитическом процессе минимум сотрудников; проводить ПЦР-анализ в одном помещении, что играет существенную роль для лабораторий, занимающихся исследованиями объектов рыбного промысла.

### Выводы

Набор полученных нами олигонуклеотидов, включающий прямые, обратные праймеры и флуоресцентно-меченый зонд, сконструированные на основе фрагментов гена металлопротеазы (коллагеназы), специфичного *V. parahaemolyticus*, позволяет методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени выявлять ДНК возбудителей *V. parahaemolyticus* в исследуемом материале.

Применение разработанного набора реагентов для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR) при исследовании проб биологического материала и объектов окружающей среды позволяет обнаружить и дифференцировать ДНК возбудителей *V. parahaemolyticus* с аналитической чувствительностью от  $1 \times 10^5$  м. кл./мл и аналитической специфичностью – 100%.

Предварительное обогащение проб в 1%-ной пептонной воде с 2%-ным NaCl в течение 8 ч. позволяет выявлять бактерии *V. parahaemolyticus* при исходной концентрации их в пробе  $10^1$  м. кл./мл методом Real-Time PCR.

### Библиографический список

Белькова Н.Л., Дзюба Е.В., Суханова Е.В. Молекулярно-генетическая идентификация кишечной микрофлоры и протистов байкальских рыб // Аннотированный список фауны оз. Байкал и его водосборного бассейна. Новосибирск: Наука, 2009. С. 957–980.

Белькова Н.Л. и др. Молекулярно-генетический мониторинг ассоциированной микрофлоры лососевидных рыб: разнообразие и физиологический статус // Известия Самарского научного центра РАН. 2010. Т. 12, № 1(4). С. 1108–1114.

Домницкий И.Ю. Ихтиопатология: краткий курс лекций. Саратов, 2016. 120 с.

Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых паразитическими и другими патогенными для человека вибрионами: МУК

4.2.1793-03. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 26 с.

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.

Полеева М.В., Чемисова О.С. Использование масс-спектрометрического анализа для детекции бактериальных токсинов // ЖМЭИ. 2018. № 1. С. 93–101.

Ребриков Д.В. и др. ПЦР в реальном времени. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2019. 223 с.

Способ идентификации штаммов вида *Vibrio parahaemolyticus* методом ПЦР в режиме реального времени: пат. № 2016146441 Рос. Федерации, 2016. № 2644232; заявл. 08.02.2018. Бюл. № 4 / Чемисова О.С., Трухачев А.Л., Рыковская О.А., Полеева М.В.

Чемисова О.С. и др. Масс-спектрометрический анализ как метод идентификации и внутривидовой дифференциации *Vibrio parahaemolyticus* // Холера и патогенные для человека вибрионы: материалы проблемной комиссии. Ростов-н/Д, 2013. Вып. 26. С. 153–157.

Buller N.B. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. Oxfordshire: CABI publishing, 2004. 361 p.

Chakraborty S., Nair G.B., Shinoda S. Pathogenic vibrios in the natural aquatic environment // Rev. Environ. Health. 1997. Vol. 12 (2). P. 63–80.

Daniels N.A. et al. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: A prevention quandary // J. Am. Med. Assoc. 2000. Vol. 284 (12). P. 1541–1545.

Deepanjali A. et al. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oyster along the southwest coast of India // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71 (7). P. 3575–3580.

Di Pinto A., Ciccarese G., Tantillo G. A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* // J. of Food Protection. 2005. Vol. 68, № 1. P. 150–153.

Hara-Kudo Y. et al. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood // Appl. Environ. Microbiol. 2001. Vol. 67 (12). P. 5819–5823.

Li R. et al. A Novel PCR-Based Approach for Accurate Identification of *Vibrio parahaemolyticus* // Front Microbiol. 2016. Vol. 7. P. 44.

Luan X.-Y. et al. Comparison of different primers for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* using the polymerase chain reaction // Lett. Appl. Microbiol. 2007. Vol. 44 (3). P. 242–247.

- Reham A.A., Amani M.S. Specific Detection of Pathogenic *Vibrio* species in shellfish by using multiplex polymerase chain reaction // *J. Global Veterinaria*. 2012. Vol. 8, № 5. P. 525–531.
- Spanggaard B. et al. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification // *Aquaculture*. 2000. Vol. 182. P. 1–15.
- ### References
- Belkova N.L., Dzyuba E.V., Suhanova E.V. [Molecular-genetic identification of intestinal microflora and protists Baikal fishes] *Annotirovanni spisok fauni ozera Baikal i ego vodosbornogo baseina* [Annotated list of fauna of lake Baikal and its catchment area: in 2 volumes]. Novosibirsk, Nauka Publ., 2009, pp. 957-980. (In Russ).
- Belkova N.L., Suhanova E.V., Denikina N.N, Rusinek O.T., Dzyuba E.V. [Molecular-genetic monitoring of salmon fishes associated microflora: diversity and physiological status]. *Izvestija Samarskogo naučnogo centra RAN*. V. 12, N 1(4) (2010): pp. 1108-1114. (In Russ).
- Domnitsky I.Yu. *Ichtiopatologija: kratkij kurs lekcij dlja studentov* [Ichtiopatologie: a short course of lectures for III year students]. Saratov, 2016. 120 p. (In Russ).
- Labopatornaja diagnostika zabozevanij, vyzvaemych paragemolitičeskimi i drugimi patogennymi dlja čeloveka vibrionami: [MUK 4.2.1793-03. Methodical instructions: Laboratory diagnostics of the diseases caused by parahemolytic and other pathogenic for the person vibrions], Moscow, Federal center of Gossanepidnadzor of the Ministry of health of Russia Publ., 2004. 26 p. (In Russ).
- Organizacija raboti laboratorij, ispol'zujuščich metody amplifikacii nukleinovych kislot pri rabote s materialom, soderžaščim mikroorganizmy I-IV grupp patogennosti: MU 1.3.2569-09 [Methodical instructions: the Organization of work of the laboratories using methods of amplification of nucleic acids at work with the material containing microorganisms of I-IV groups of pathogenicity: MU 1.3.2569-09] Moscow: Federal center for hygiene and epidemiology of Rospotrebnadzor Publ., 2010. 51 p. (In Russ).
- The patent of the Russian Federation № 2644232, 08.02.2018. *Sposob identifikacii shtammov vida Vibrio paraharmolyticus metodom PCR v rezhime real'nogo vremeni* [Method of identification of *Vibrio paraharmolyticus* strains by PCR in real time]. Patent of Russia. № 2016146441. 2016. Bul. № 4. Chemisova O.S., Trukhachev A.L., Rykowskaya O.A., Poleeva M.V. (In Russ).
- Poleeva M.V., Chemisova O.S. [The use of mass spectrometric analysis for the detection of bacterial toxins]. *Žurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. N 1 (2018): pp.93-1001. (In Russ).
- Rebrikov D.V., Samatov D.Yu., Trofimov D.Yu., Semenov P.A., Savilova A.M., Kofiadi I.A., Abramov D.D. *PCR v real'nom vremeni* [PCR in Real-Time]. Moscow, Binom. Laboratorija znanij Publ.. 2019. 223 p. (In Russ).
- Chemisova O.S., Telesmanich N.R., Rykowskaya O.A., Seina S.O., Chaika I.A. [Mass-spectrometric analysis as a method of identification and intraspecific differentiation of *Vibrio paraharmolyticus*]. *Cholera i patogennye dlja čeloveka vibriony. Materialy problemnoj komissii* [Cholera and pathogenic for humans, *Vibrio*: Materials of the Commission]. Rostov-on-Don, 2013, V. 26. pp. 153-157. (In Russ.).
- Buller N.B. *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*. Oxfordshire, CABI publishing, 2004. 361 p.
- Chakraborty S., Nair G.B., Shinoda S. Pathogenic vibrios in the natural aquatic environment. *Rev. Environ. Health*. V. 12(2) (1997): pp. 63-80.
- Daniels N.A., Ray B., Easton A., Marano N., Kahn E., McShan A.L., Del Rosario L., Baldwin T., Kingsley M.A., Puhf N.D., Wells J.G., Angulo F.J. Emergence of a new *Vibrio paraharmolyticus* serotype in raw oysters: A prevention quandary. *J. Am. Med. Assoc.* V. 284 (12) (2000): pp. 1541-1545.
- Deepanjali A., Kumar H.S., Karunasagar I., Karunasagar I. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio paraharmolyticus* bacteria in oyster along the southwest coast of India. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 71 (7) (2005): pp. 3575-3580.
- Di Pinto A., Ciccarese G., Tantillo G. A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio paraharmolyticus*. *J. of Food Protection*. V. 68, N 1 (2005): pp. 150-153.
- Hara-Kudo Y., Nishina T., Nakagawa H., Konuma H; Hasegawa J; Kumagai S. Improved method for detection of *Vibrio paraharmolyticus* in seafood. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 67 (12) (2001): pp. 5819-5823.
- Li R., Chiou J., Chan E. W.-C., Chen S. A Novel PCR-Based Approach for Accurate Identification of *Vibrio paraharmolyticus*. *Front Microbiol.* V. 7 (2016): p. 44.
- Luan X.-Y., Chen J.-X., Zhang X.-H., Jia J.-T., Sun F.-R., Li Y. Comparison of different primers for rapid detection of *Vibrio paraharmolyticus* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* V. 44 (3) (2007): pp. 242-247.
- Reham A.A., Amani M.S. Specific Detection of Pathogenic *Vibrio* species in shellfish by using

multiplex polymerase chain reaction. *J. Global Veterinaria*. V. 8, N 5 (2012): pp. 525-531.  
Spanggaard B., Huber I., Nielsen J., Nielsen T. The microflora of rainbow trout intestine: a compari-

son of traditional and molecular identification. *Aquaculture*. V. 182 (2000): pp. 1-15.

Поступила в редакцию 20.03.2019

#### Об авторах

Полеева Марина Владимировна, научный сотрудник  
ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора  
**ORCID:** 0000-0001-8086-376X  
344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40; marina-akulova@mail.ru; (863)2402703

Чемисова Ольга Сергеевна, кандидат биологических наук, врио заместителя директора по научной работе  
ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора  
**ORCID:** 0000-0002-4059-2879  
344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40; chemisova\_os@antiplague.ru; (863)2402703

Трухачев Алексей Леонидович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией  
ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора  
**ORCID:** 0000-0002-3531-1146  
344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40; trukhachev\_al@antiplague.ru; (863)2402703

#### About the authors

Poleeva Marina Vladimirovna, researcher  
Research Institute for Plaque Control, Rostov-on-Don.  
**ORCID:** 0000-0001-8086-376X  
117/40, M. Gorky Str., Rostov-on-Don, Russia, 344002; marina-akulova@mail.ru; (863)2402703

Chemisova Olga Sergeevna, candidate of biology, acting Deputy Director for research  
Research Institute for Plaque Control, Rostov-on-Don.  
**ORCID:** 0000-0002-4059-2879  
117/40, M. Gorky Str., Rostov-on-Don, Russia, 344002; chemisova\_os@antiplague.ru; (863)2402703

Trukhachev Aleksei Leonidovich, candidate of medical Sciences, head of laboratory  
Research Institute for Plaque Control, Rostov-on-Don.  
**ORCID:** 0000-0002-3531-1146  
117/40, M. Gorky Str., Rostov-on-Don, Russia, 344002; trukhachev\_al@antiplague.ru; (863)2402703

#### Информация для цитирования:

Полеева М.В., Чемисова О.С., Трухачев А.Л. Разработка способа индикации и идентификации *Vibrio parahaemolyticus* с помощью Real-Time ПЦР // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2019. Вып. 2. С. 175–181. DOI: 10.17072/1994-9952-2019-2-175-181.

Poleeva M.V., Chemisova O.S., Trukhachev A.L. [The development of Real-Time PCR method for indication and identification of *Vibrio parahaemolyticus*]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija*. Iss. 2 (2019): pp. 175-181. (In Russ.). DOI: 10.17072/1994-9952-2019-2-175-181.

