

генетических исследований по мониторингу за резистентностью ВИЧ к АРВ-препаратам.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Методическое письмо от 04.08.2006 г. № 4174-РХ «Проведение лабораторного обследования на ВИЧ-инфекцию (в том числе исследование иммунитета и вирусной нагрузки при ВИЧ-инфекции)». М.; 2006.
2. Методические рекомендации от 06.08.2007 г. № 5956-РХ «О проведении надзора за циркуляцией генетических вариантов вируса иммунодефицита человека, включая циркуляцию штаммов, резистентных к антиретровирусным препаратам». М.; 2007.
3. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции». М.; 2011.
4. Парфенова О.В., Пекишева О.Ю., Зайцева Н.Н. Мутации, определяющие резистентность ВИЧ к антиретровирусной терапии в ПФО в 2008–2012 гг. Медицинский альманах. 2013; 2 (26): 79–82.
5. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 09.07.2007 г. № 474 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным болезнью, вызванной ВИЧ». М.; 2007.
6. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 09.07.07 г. № 475 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным болезнью, вызванной ВИЧ» (при оказании специализированной помощи). М.; 2007.
7. Носов Н.Н., Парфенова О.В., Иванова Н.И. Об организационных проблемах внедрения молекулярной диагностики в службе профилактики СПИД. В кн.: Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2010». М.; 2010; I: 75–6.

## REFERENCES

1. Methodological letter from 04.08.2006 Number 4174-PX "Conducting laboratory testing for HIV (including the study of immunity and viral load in HIV infection)." Moscow; 2006. (in Russian)
2. Guidelines of 06.08.2007 Number 5956-RH "On supervision for circulation of genetic variants of human immunodeficiency virus, including the circulation of strains resistant to antiretroviral drugs." Moscow; 2007. (in Russian)
3. Sanitary Regulations SP 3.1.5.2826-10 "HIV infection". Moscow; 2011. (in Russian)
4. Parfenova O.V., Peksheva O.Yu., Zaytseva N.N. Mutations defining HIV resistance to antiretroviral therapy in Volga Federal District from 2008 to 2012. *Meditinskiy al'manakh*. 2013; 2 (26): 79–82. (in Russian)
5. Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation 09.07.2007 Number 474 "On approval of the standard of medical care to patients with a disease caused by HIV." Moscow; 2007. (in Russian)
6. Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation from 09.07.2007 Number 475 "On approval of the standard of medical care to patients with a disease caused by HIV" (for specialized care). Moscow; 2007. (in Russian)
7. Nosov N.N., Parfenova O.V., Ivanova N.I. On organizational problems introduction of molecular diagnostics in the service of AIDS prevention. In: "Molecular Diagnostics – 2010": Proc. VII Russian scientific and practical conference with international participation. Moscow; 2010; 1: 75–6. (in Russian)

Поступила 21.02.14

Received 21.02.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 579.843.1.083.2

Рыковская О.А., Чемисова О.С., Смоликова Л.М., Монахова Е.В., Подойницына О.А., Чайка, С.О., Сагакянц М.М.

## ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* И *VIBRIO ALGINOLYTICUS*

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия

*Vibrio parahaemolyticus* и *Vibrio alginolyticus* – филогенетически близкородственные виды. У них общие экологические ниши, одинаковые культуральные свойства и сходные биохимические признаки. Фенотипическая изменчивость и таксономическое сходство штаммов этих видов затрудняют дифференциацию по биохимическим признакам *V. parahaemolyticus* от *V. alginolyticus*. Для получения достоверных результатов диагностики использования дополнительных методов дифференциации и идентификации этих двух видов бактерий. Целью настоящей работы явилась сравнительная оценка эффективности биохимического тестирования, ПЦР-анализа и метода масс-спектрометрии для дифференциации видов *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus* на модели коллекции, включая атипичные штаммы этих видов. Для подтверждения видовой принадлежности штаммов *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus* необходимо использовать в дополнение к биохимическим методам идентификации ПЦР-анализ с видоспецифичными праймерами генов металлопротеазы (коллагеназы) *pprC* и *varC*. Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии может служить дополнительным эффективным методом идентификации и межвидовой дифференциации видов *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus*, выделенных из разных источников.

Ключевые слова: *Vibrio parahaemolyticus*; *Vibrio alginolyticus*; видоспецифичные гены; MALDI-TOF масс-спектрометрия; ПЦР-анализ; биохимические тесты.

O.A. Rykovskaya, O.S. Chemisova, L.M. Smolikova, E.V. Monakhova, O.A. Podoinitsina, S.O. Chaika, M.M. Sagakyantz

THE DIFFERENTIATION OF SPECIMENS OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AND *VIBRIO ALGINOLYTICUS*

The Rostov-on-Don anti-plague institute of Rosпотребнадзор of Russia, 344002 Rostov-on-Don, Russia

Для корреспонденции:

Рыковская Оксана Алексеевна, науч. сотр.

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40

E-mail: plague@aaanet.ru

*Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* are phylogenetically closely-related species. They have common ecological niches, same cultural features and similar biochemical characteristics. The phenotype variability and taxonomy similarity of strains of these species impedes differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* according biochemical characteristics. To obtain reliable results of diagnostic application of additional methods of differentiation and identification these two species of bacteria are needed. The study was organized to comparatively evaluate effectiveness of biochemical testing, polymerase chain reaction analysis and mass-spectrometry technique in differentiation of species of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*. The study implemented analysis of methods of differentiation of species of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* using model of collection including atypical strains of these species. To substantiate species belonging of strains of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* such techniques are to be additionally applied to biochemical methods of identification as polymerase chain reaction analysis with species-specific primers of genes of metalloproteinase (collagenase) *vppC* and *vapC*. The MALDI-TOFF method of mass-spectrometry can be used as additional effective method of identification and inter-species differentiation of species of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* isolated from various sources.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; *Vibrio alginolyticus*; species-specific genes; MALDI-TOFF mass-spectrometry; polymerase chain reaction analysis; biochemical test.

**Введение.** Бактерии видов *Vibrio parahaemolyticus* и *Vibrio alginolyticus* являются галофильными микроорганизмами, которые могут быть причиной заболеваний у людей. Штаммы *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus* – филогенетически близкородственные виды [1]. У них общие экологические ниши, одинаковые культуральные свойства и сходные биохимические признаки. *V. alginolyticus* раньше обозначали как биотип 2 *V. parahaemolyticus*, в 1974 г. решением международного комитета по бактериологической систематике вынесен в самостоятельный вид *V. alginolyticus* [2, 3].

Несмотря на наличие сходных биохимических и таксономических признаков *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus* разнятся по набору детерминант вирулентности. Основным фактором передачи *V. parahaemolyticus* являются инфицированные гидробионты. Опасность заражения парегмолитическими вибрионами существует там, где население использует в питании продукты моря. *V. alginolyticus* выделяют из прибрежных вод и донных отложений по всему миру. Эта бактерия является человеческим патогеном, вызывая раневые инфекции, отиты и гастроэнтериты [4, 5], а также одним из наиболее важных патогенов в аквакультуре, причиняя огромный вред моллюскам и ракообразным [6].

Традиционным методом идентификации и дифференциации *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus* является оценка биохимических признаков, основанная на детекции ферментативной активности бактерий. Для этого используются различные субстраты, метаболиты которых дают цветную окраску. Фенотипическая изменчивость и таксономическое сходство штаммов этих видов затрудняет дифференциацию по биохимическим признакам *V. parahaemolyticus* от *V. alginolyticus*. Для получения достоверных результатов диагностики требуется использование дополнительных методов дифференциации и идентификации этих двух видов бактерий, в частности таких, как масс-спектрометрия и ПЦР-анализ [6, 7].

Метод ПЦР является быстрым и высокоспецифичным для обнаружения *V. parahaemolyticus* в экологических пробах воды, клинических образцах и различных продуктах питания [8–11]. В настоящее время в качестве маркеров *V. parahaemolyticus* предложены гены *tl* (термолабильного гемолизина), *gyrB* (гиразы) [12], *tox R* (регуляторного белка), *Vpfla* (жгучикового антигена). А. Di Pinto и соавт. [13]. использовали для дифференциации *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus* различия в нуклеотидных последовательностях генов металлопротеазы (коллагеназы), соответственно *vppC* и *vapC*. Все предложенные видоспецифичные праймеры опробованы разными авторами на небольшом числе штаммов. Основными факторами патогенности *V. parahaemolyticus* является термо-стабильный прямой гемолизин (TDH) и TDH-родственный гемолизин (TRH), кодируемые генами *tdh* и *trh* соответственно [14, 15]. У вида *V. alginolyticus* ген *tdh* отсутствует, однако имеются сообщения о выделении *trh*-позитивных штаммов [16]. Также к потенциальным факторам патогенности *V. parahaemolyticus* относятся предполагаемые металлопротеиназа и липаза, сходные соответственно с гемагглютинин/протеазой и цитотоническим фактором Сef холерных ви-

брионов, у которых они являются факторами патогенности/персистенции [17]. Соответствующие гены обозначаются как гены *pmp* и *cefVp* (*para cef*). Возможно, что способность *tdh-trh*-штаммов *V. parahaemolyticus* вызывать заболевания отчасти обусловлена продуктами этих генов [18]. О наличии этих генов у штаммов *V. alginolyticus* практически неизвестно.

Особую важность для дифференциации и идентификации видов рода *Vibrio* представляет метод масс-спектрометрии. Масс-спектрометрия – физический метод измерения массы ионов исследуемого вещества и их относительных количеств в смесях, основанный на разделении ионов разных масс в вакууме под действием электрических и магнитных полей. Возможность получения специфических для конкретного вида микроорганизма масс-спектров белков дает основание для использования данного метода для быстрой идентификации микроорганизмов, что впервые показано еще в 1975 г. [19]. Реализация этого принципа стала возможной только в последние годы и связана с появлением в арсенале масс-спектрометрии “мягкого” способа ионизации молекул исследуемого вещества (MALDI). Использование матричной лазерной десорбционной ионизации в комплексе с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS) обеспечило настоящий прорыв в анализе сложных биоорганических молекул, в частности, тяжелых, труднотлетучих молекул нуклеиновых кислот и белков [20]. В отличие от традиционных микробиологических методов метод масс-спектрометрии позволяет быстро и эффективно выявить различные виды рода *Vibrio*. Этот метод предложен для скрининга изолятов *V. parahaemolyticus* [21] и дифференциации *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus* [22]. Преимуществами данного метода являются короткое время анализа, низкая себестоимость, широкий спектр анализируемых микроорганизмов, высокая воспроизводимость результатов.

Целью настоящей работы явилась сравнительная оценка эффективности биохимического тестирования, ПЦР-анализа и метода масс-спектрометрии для дифференциации видов *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus*.

**Материалы и методы.** В работу взято 120 штаммов *V. alginolyticus* и 100 штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных от человека и из внешней среды в период с 1986 г. по 2012 г. Штаммы выращены на агаре Мартена с 2% NaCl при  $t = 37^{\circ}\text{C}$ . Культуры исследованы биохимическим методом.

В качестве контрольных образцов взяты типовые штаммы *V. alginolyticus* 16463 (ATCC 17749) и *V. parahaemolyticus* 13580 (ATCC 17802) [4].

Наличие видоспецифичных генов и генов, ассоциированных с вирулентностью, определяли в ПЦР со специфическими праймерами. Синтез праймеров выполнен ООО НПФ “Литех” (Москва). Для постановки ПЦР суточные агаровые культуры суспендируют в дистиллированной воде до  $1 \cdot 10^9$  микробных клеток в 1 мл и обеззараживают прогреванием при  $99^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин. Клетки осаждают центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 5 мин и используют прозрачные супернатанты в качестве ДНК-матриц. Реакцию проводят отдельно для каждого гена в 10 мкл смеси следующего состава:

ва: 10X буфер для амплификации (коммерческий) – 1 мкл; 2,5 мМ раствор смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTR) – 1 мкл; 2,5 мМ раствор смеси прямого и обратного праймеров – 1 мкл; ДНК-матрица – 1 мкл; ТАQ-полимераза (5 ед/мкл) – 0,1 мкл; деионизированная вода – 6,9 мкл. Амплификацию проводили на программируемом термостате “Терцик” (“ДНК-Технология”, Москва). По окончании реакции смеси разделяют электрофоретически в 2% агарозном геле, приготовленном на трис-ацетатном либо трис-боратном буфере, окрашивают бромистым этидием и визуализируют в УФ свете. Амплификаты исследуемых штаммов также сравнивают с таковыми контрольного штамма [23].

Все исследуемые штаммы идентифицированы методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (масса молекулы оценива-

ется по времени пролета от источника ионизации до детектора). Использовали суточные агаровые культуры штаммов *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus*, выращенные на агаре Мартена с добавлением 2% NaCl при температуре 37°C. Анализ начинается с того, что на подложке масс-спектрометра смешивают биоматериал из колонии бактерий и специальную матрицу ( $\alpha$ -циано-гидроксикоричная кислота, 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). Образец помещают в прибор и подвергают воздействию наносекундных лазерных импульсов. При этом молекулы матрицы и аналита (в частности, белки) переходят в газовую фазу, а протонированные молекулы матрицы взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд. Под действием электрического поля ионизированные белки движутся от источ-

Таблица 1

Результаты изучения штаммов *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus* биохимическими методами

Признаки	Характеристика, % положительных результатов							
	<i>V. parahaemolyticus</i>				<i>V. alginolyticus</i>			
	вида Берджи, 2005	типового штамма 13580 (ATCC 17802)	клинических штаммов	выделенных из внешней среды	вида Берджи, 2005	типового штамма 16463 (ATCC 17749)	клинических штаммов	выделенных из внешней среды
Подвижность	100	+	100	100	100	100	100	100
Оксидаза	100	+	100	100	100	+	100	100
Нитратредуктаза	100	+	100	100	100	+	100	100
Продукция:								
индола	100	+	100	100	80	+	100	100
H <sub>2</sub> S	0	-	0	0	0	-	0	0
Фогеса-Проскауэра	0	-	0	0	80	+	95	98
Наличие:								
лизиндекарбоксилазы	100	+	100	100	100	+	98	96
аргининдигидролазы	0	-	0	0	0	-	0	0
орнитиндекарбоксилазы	100	+	93	100	40	-	56	80
Образование газа из глюкозы	0	-	0	0	0	-	0	0
Ферментация:								
глюкозы	100	+	100	100	100	+	100	100
лактозы	0	-	0	0	0	0	0	0
арабинозы	80	+	40	60	0	0	0	0
маннозы	100	+	100	80	100	+	99	97
сахарозы	0	-	0	0	100	+	100	100
целлобиозы	0	-	0	0	100	+	50	95
маннита	80	+	100	98	100	+	100	100
инозита	0	-	0	0	0	-	0	0
салицина	0	-	0	0	0	-	0	0
галактозы	60	+	60	65	20	-	15	40
Хью-Лейфсона О/Ф (к/к)	100	к/к	100	100	100	к/к	100	100
Рост в пептонной воде:								
без соли	0	-	0	20	0	-	25	30
3% NaCl	100	+	100	100	100	+	100	100
7% NaCl	100	+	100	100	100	+	100	100
10% NaCl	0	-	0	30	100	+	100	100
Уреазная активность на среде Крестенсена	15	+	16	0	0	-	2	0

Таблица 2

Результаты ПЦР-детекции видоспецифичных генов и генов, ассоциированных с вирулентностью у представителей видов *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*

Гены	Длина амплификата, п. н.	Ссылки	Количество положительных результатов, %	
			<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>tlh</i>	450	[11]	76	100
<i>gyrB</i>	285	[12]	75	100
<i>tox RS</i>	370	[8]	92	100
<i>Vpfla</i>	897	[10]	29	100
<i>vppC</i>	271	[13]	0	100
<i>vapC</i>	737	[13]	100	0
<i>tdh</i>	251	[23]	0	50
<i>trh</i>	585	[23]	0,8	4
<i>pmp</i>	759	[18]	1,6	88
<i>para cef</i>	487	[18]	11,6	100

Таблица 3

Видоспецифичные гены *V. alginolyticus* в различных сочетаниях

	Видоспецифичные гены			Количество штаммов
	<i>tlh</i>	<i>gyrB</i>	<i>gyrBS</i>	
-	-	-	-	4
-	-	-	+	11
+	-	-	+	11
-	+	-	-	1
-	+	+	+	13
+	+	-	-	3
+	+	+	+	79

ника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам. Программное обеспечение прибора оценивает время пролета частиц и преобразует эту информацию в спектр молекулярных масс (масс-спектр). Масс-спектры анализируются экспертной системой, и на основании сведений о массах характеристических белков происходит идентификация микроорганизмов. Для идентификации используются белки, присутствующие в клетке в неизменной концентрации, независимо от внешних обстоятельств (температуры и времени инкубации, типа питательной среды). Учет результатов проводили по шкале показателей Score в диапазоне 0–3: значения 2,300–3,000 указывают на высокую вероятность идентификации вида, 2,000–2,2999 – на надежную идентификацию рода бактерий и возможную идентификацию вида, 1,700–1,999 – на возможную идентификацию рода, менее 1,700 – на отсутствие надежной идентификации.

**Результаты и обсуждение.** Результаты биохимического тестирования приведены в табл. 1. Типовые штаммы *V. alginolyticus* 16463 (ATCC 17749) и *V. parahaemolyticus* 13580 (ATCC 17802) проявляли типичные для вида свойства. У изученных культур штаммов *V. parahaemolyticus* отмечены некоторые отклонения по отдельным признакам. У 7% клинических штаммов не выявлена продукция орнитиндекарбоксилазы. У части изолятов из окружающей среды зарегистрирован рост в 1% пептонной воде без соли и с 10% NaCl, в то время как штаммы, выделенные от больных типичны по этим признакам. Среди алгинолитических вибрионов, как клинических, так и из окружающей среды, также выявлены атипичные по способности к росту на безсолевой среде представители. У клинических изолятов *V. alginolyticus* отмечен высокий процент неактивных по отношению к целлобиозе. До 6% штаммов *V. alginolyticus* не продуцировали лизиндекарбоксилазу. Выявлен один клинический штамм *V. alginolyticus*, ферментирующий мочевины, что не характерно для вибрионов этого вида. Перечисленные особенности затрудняют идентификацию культур. Вариабельность дифференциальных признаков *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus*, таких как образование ацетилметилкарбинола, ферментация арабинозы, характер роста в пептонной воде с 10% NaCl, также усложняла идентификацию видов. Видовая принадлежность атипичных штаммов, определенная по совокупности таксономических признаков, нуждалась в подтверждении другими методами.

Результаты ПЦР-детекции видоспецифичных генов, ассоциированных с видовой принадлежностью, представлены в табл. 2. Рекомендуемые в качестве видоспецифичных для идентификации *V. parahaemolyticus* гены *tl* (термолабильного гемолизина), *gyrB* (гиразы), *tox R* (регуляторного белка) выявлены у парагемолитических вибрионов в 100% случаев, а у *V. alginolyticus* – в 75–92%. Гены *tl*, *gyrB* и *tox R* у *V. alginolyticus* в различных сочетаниях представлены в табл. 3. У подавляющего большинства (79) штаммов *V. alginolyticus* присутствовали все три видоспецифичных гена. У 13 штаммов присутствовали гены *gyrB* и *tox R*, при отсутствии *tl* гена. И у четырех штаммов отсутствовали гены *tl*, *gyrB* и *tox R*. Ген *Vpfla* (жгутикового антигена) обнаружен у всех штаммов *V. parahaemolyticus* и у 29% штаммов алгинолитических вибрионов. По результатам наших исследований только гены *vppC* и *vapC* оказались строго специфичны по отношению к вибрионам соответствующих видов.

Также нами все исследуемые нами штаммы *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus* были протестированы на наличие генов ассоциированных с вирулентностью, в частности *tdh*, *trh*, *pmp* и *para cef* (см. табл. 2). Ген *tdh*, который является одним из основных факторов патогенности *V. parahaemolyticus* выявлен практически у всех клинических штаммов парагемолитических вибрионов и не выявлен у представителей *V. alginolyticus*. TDH-родственный гемолизин (TRH), кодируемый геном *trh*, определен у четырех клинических из 100 штаммов *V. parahaemolyticus*. Среди штаммов алгинолитиче-

ских вибрионов обнаружен один *trh*-положительный штамм. Ген *pmp* присутствовал у 88 (88%) штаммов *V. parahaemolyticus* и только у 2 (1,6%) клинических штаммов *V. alginolyticus*. Ген *para cef* обнаружен у всех исследуемых культур парагемолитических вибрионов и у 14 (11,6%) штаммов *V. alginolyticus*.

Результаты исследования методом масс-спектрометрии совпали с итогами биохимической идентификации у 98,6% изученных штаммов (3 несовпадения). Расхождения результатов отражены в табл. 4. Результаты несоответствий сравнены с итогами ПЦР-идентификации соответствующих штаммов с видоспецифичными праймерами генов *vppC* и *vapC*.

Сахарозаположительный штамм 16622 по биохимическим характеристикам идентифицированный как *V. alginolyticus* определен как *V. parahaemolyticus*, что совпало с результатами ПЦР.

Два штамма 16618 и 19397 (свежевыделенный Новороссийской противочумной станцией) дающие неоднозначные результаты в “цветных рядах” (не ферментировали сахарозу, росли в 1% пептонной воде с добавлением 10% NaCl, образовывали ацетилметилкарбинол), определенные как *V. parahaemolyticus*, по данным масс-спектрометрии идентифицированы как *V. alginolyticus* с показателем Score 2,2 и 2,27 соответственно (надежная идентификация рода бактерий и возможная идентификация вида). Методом ПЦР штамм 19397 также определен как *V. alginolyticus*. По результатам ПЦР-идентификации с видоспецифичными праймерами *vppC* и *vapC* штамм 16618 аналогично результатам биохимических тестов был определен как *V. parahaemolyticus*, что не совпало с результатами масс-спектрометрии.

**Заключение.** Проведена сравнительная оценка эффективности методов дифференциации *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus*

Таблица 4

Расхождения результатов идентификации штаммов *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus* тремя методами

№ штамма	Хью-Лейфсона к/к	Линзин	Аргинин	Орнитин	Арабиноза	Манноза	Сахароза	Целлобиоза	Маннит	Инозит	Салицин	Галактоза	Рост в 1% пептонной воде		Нитратредуктаза	Фогеса-Проксуера	Вид по результатам		
													без NaCl	10% NaCl			биохимических тестов	масс-спектрометрии (Score)	ПЦР с видоспецифическими праймерами
16622	к/к	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> (1.97)	-
16618	к/к	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i> (2.2)	-
19397 (692)	к/к	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i> (2.27)	+

Примечание. "+" – наличие признака; "-" – отсутствие признака; к – кислота.

*olyticus* на модели коллекции, включая атипичные штаммы этих видов.

Биохимические тесты не являются достаточно точным методом для дифференциации видов *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus*. Для подтверждения видовой принадлежности необходимо использовать дополнительные методы идентификации, в частности ПЦР-анализ с видоспецифическими праймерами. Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии может служить дополнительным эффективным методом идентификации и межвидовой дифференциации видов *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus*, выделенных из разных источников.

Данные ПЦР-анализа штаммов *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus* с видоспецифическими праймерами генов *tl*, *gyrB*, *tox R*, *Vpfla*, *vppC* и *vapC* свидетельствуют о высокой специфичности генов *vppC* и *vapC*. И именно их детекцию следует рекомендовать для дифференциации *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus*. Проведена ПЦР-детекция генов, ассоциированных с вирулентностью, которая позволила выявить среди культур *V. alginolyticus trh*-позитивный штамм и штаммы, содержащие гены *pmr* и *para cef*. Специфичным для большинства клинических штаммов *V. parahaemolyticus* оказался только ген термостабильного прямого гемолизина (TDH). Гены *trh*, *pmr* и *para cef* присутствовали у представителей обоих видов.

Полученные результаты подчеркивают необходимость использования дополнительных методов идентификации, что позволит избежать неверных результатов при исследованиях, основанных главным образом на биохимических характеристиках.

ЛИТЕРАТУРА

1. Montieri S., Suffredini E., Ciccozzi M., Croci L. Phylogenetic and evolutionary analysis of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* isolates based on *gyrB* gene sequence. *New Microbiol.* 2010; 33: 359–72.
2. Garrity G.M. Bergey's manual of systematic bacteriology. *The gammaproteobacteria*. New York: Springer; 2005; 2B: 1108.
3. Hugh R., Sakazaki R. International committee on systematic bacteriology. Subcommittee on the taxonomy of vibrios. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1975; 25 (4): 389–91.
4. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П., Стейли Дж., Уилльямс С., ред. *Определитель бактерий Берджи. т. 1*. Пер. с англ. М.: Мир; 1997.
5. Reilly G., Reilly C., Smith E. *Vibrio alginolyticus*-associated wound infection acquired in British waters. *Euro Surveill.* 2011; 16 (42).
6. МУК 4.2.1793-03. *Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых параземолитическими и другими патогенными для человека вибрионами: Методические указания*. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2003.
7. West P.A., Colwell R.R. Identification and classification overview. *Vibrios in the environment*. New York: John Wiley Sons, Inc.; 1984: 285–363.
8. Шалу О.А., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В. и др. ПЦР-генотипы штаммов *Vibrio parahaemolyticus*, выделенных от людей на территориях СНГ. В кн.: *Холера и патогенные для человека вибрионы: материалы совещания специалистов Роспотребнадзора и проблемной комиссии*. Ростов-на-Дону; 2010: 99–105.
9. Robert-Pillot A., Guenole A., Fournier J. Usefulness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* species: validation by DNA-DNA hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002; 215: 1–6.
10. Tarr C.L., Patel J.S., Puhf N.D. et al. Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (1): 134–40.
11. Ward L.N., Bej A.K. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72 (3): 2031–42.
12. Venkateswaran K., Dohmoto N., Harajama S. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64 (2): 681–7.

13. Di Pinto A., Ciccacese G., Tantillo G. A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Food Protection*. 2005; 68 (1): 150–3.
14. Nishibuchi M., Kaper J.B. Thermostable direct hemolysin gene and of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect. Immun.* 1995; 63: 2093–9.
15. Park K.S., Ono T., Rokuda M. et al. Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin – deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48 (4): 313.
16. Gonzales-Escalona N., Blackstone G.M., DePaola A. Characterization of a *Vibrio alginolyticus* strain, isolated from Alaskan oysters, carrying a hemolysin gene similar to the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (trh) of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72 (12): 7925–9.
17. Монахова Е. В. *Факторы патогенности нехолерогенных штаммов *Vibrio cholerae**: автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. Ростов-на-Дону; 2012.
18. Подойницына О. А. *Генотипическая характеристика штаммов *V. parahaemolyticus*, циркулирующих на территориях России и сопредельных государств*: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Ростов-на-Дону; 2013.
19. Anhalt J. P., Fenselau C. Identification of bacteria using mass-spectrometry. *Analyt. Chem.* 1975; 47: 219–25.
20. Кубанова А.А., Говорун В.М., Ильина В.А. и др. Первый опыт применения метода прямого белкового профилирования для идентификации и типирования *N. Gonorrhoeae*. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2006; 5: 25–9.
21. Hazen H., Martinez J., Chen Y. et al. Rapid Identification of *Vibrio parahaemolyticus* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75 (21): 6745–56.
22. Dieckmann R., Strauch E., Alter T. Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using MALDI-ToF mass-spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 109 (1): 199–211.
23. Рыковская О.А., Шалу О.А., Монахова Е.В. и др. Комплексный метод оценки вирулентности парагемолитических вибрионов. *Клиническая и лабораторная диагностика*. 2013; 2: 38–41.

## REFERENCES

4. Hoult Dzh., Krig N., Snit P., Stejli Dzh., Uill'jamsa S., eds. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. vol. 1: Translation from English. Moscow; 1997. (in Russian)
8. Shalu O.A., Nepomnjashhaja N.B., Monakhova E.V. et al. PCR genotypes strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the people on the territories of CIS countries. In: *Cholerae and others human pathogenic vibrios*. Mat. Meeting of specialists of Rospotrebnadzor and the problem Commission. Rostov-na-Donu; 2010: 99–105. (in Russian)
17. Monakhova E.V. Pathogenicity factors of nontoxigenic *Vibrio cholerae* strains. Diss. Rostov-na-Donu; 2012. (in Russian)
18. Podoinitsyna O.A. *Genotypic characterization of *V. parahaemolyticus* strains, circulating on the territories of Russia and the adjacent States*. Diss. Rostov-na-Donu; 2013. (in Russian)
20. Kubanova A.A., Govorun V.M., Il'ina V.A. et al. The first experience with the use of the direct protein profiling method to identify and type *N. gonorrhoeae*. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2006; 5: 25–9. (in Russian)
23. Rykovskaya O.A., Shalu O. A., Monakhova E.V. et al. The development of complex technique of evaluation of virulence of para-hemolytic vibrio. *Klinicheskaya i laboratornaya diagnostika*. 2013; 2: 38–41. (in Russian)

Поступила 21.02.14  
Received 21.02.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.98:579.841.111-078.33:577.21.083

Прохватилова Е.В., Антонов В.А., Викторов Д.В., Храпова Н.П., Ткаченко Г.А., Илюхин В.И., Захарова И.Б., Гришина М.А., Плеханова Н.Г., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Булатова Т.В., Корсакова И.И., Савченко С.С., Бондарева О.С., Тетерятникова Н.Н., Сенина Т.В., Лопастейская Я.А., Батурин А.А., Куликова А.С.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИНФОРМАТИВНОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ И СРЕДСТВ НА ЭТАПАХ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора России

Референс-центром по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза проведены испытания наборов реагентов для диагностики *in vitro* возбудителя мелиоидоза и других близкородственных видов буркхолдерий. На этапах специфической индикации (СИ) патогенных буркхолдерий оценены диагностические возможности коммерческих и экспериментальных наборов реагентов для методов экспресс- и ускоренного анализа. Критериями оценки диагностической ценности наборов реагентов являлись чувствительность, специфичность, а также время проведения исследований. Анализ с использованием моно- и мультилокусных амплификационных систем, в том числе ПЦР в реальном времени, позволил в течение 5–6 ч осуществить идентификацию и дифференциацию *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* и *B. ceracia*.

Ключевые слова: мелиоидоз; буркхолдерии; полимеразная цепная реакция; иммунологические методы; бактериологическое исследование.

Автор для корреспонденции:

Прохватилова Елена Валерьевна, канд. мед. наук, доц., зам. директора  
Адрес: 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7  
E-mail: mari2@sprint-v.com.ru