

На правах рукописи

**Полеева Марина Владимировна**

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ  
ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ *VIBRIO PARANAEMOLYTICUS***

1.5.11 – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

г. Ростов-на-Дону – 2021

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора)

**Научный  
руководитель:  
Официальные  
оппоненты:**

**Чемисова Ольга Сергеевна**  
кандидат биологических наук  
**Миронова Лилия Валерьевна,**  
доктор медицинских наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заместитель директора по лабораторно-диагностической работе

**Осина Наталья Александровна,**  
кандидат биологических наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующая лабораторией молекулярной диагностики  
**Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**

**Ведущая  
организация:**

Защита диссертации состоится «   » \_\_\_\_\_ 202\_\_ г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 64.1.006.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru/disser/dissert/> Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

Бугоркова Светлана Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Бактерии вида *V. parahaemolyticus* являются основной причиной пищевых токсикоинфекций, связанных с употреблением в пищу морепродуктов. Средой обитания *V. parahaemolyticus* является морская вода [Joseph S.W. et al., 1982], а основным фактором передачи человеку служат инфицированные ими гидробионты [Baker-Austin C. et al., 2018; Matsuda S. et al., 2020], употребление в пищу которых ведет к возникновению острого кишечного заболевания по типу острого гастроэнтерита [Bonnin-Jusserand M. et al., 2017; Li L. et al., 2019]. В особо тяжелых случаях инфицирование может приводить к распространению заболевания, сепсису и летальному исходу [Li L. et al., 2019]. *V. parahaemolyticus* также может вызывать поражение кожи, заболевание ушей, раневые инфекции [Baker-Austin C. et al., 2018]. Заболеваемость увеличивается в связи с появлением возбудителя серотипа O3:K6, несущего основной фактор патогенности парагемолитических вибрионов – гены прямого термостабильного гемолизина – TDH [Nishibuchi M. et al., 1995; Park K.S. et al., 2004; Nair G.B. et al., 2005; Gonzales-Escalona N. et al., 2006; Nair G.B. et al., 2007; Guin S. et al., 2019; Yan W. et al., 2020]. Поэтому для практического здравоохранения важно быстро и достоверно определить, как наличие возбудителя в исследуемом материале, так и его вирулентность [Bonnin-Jusserand M. et al., 2017; Xu D. et al., 2018].

Традиционными и основными на сегодняшний день методами идентификации *V. parahaemolyticus* являются бактериологические методы – культивирование и выделение чистой культуры микроорганизма, серотипирование и биохимические тесты, основанные на определении ферментативной активности [МУК 4.2.1793–03]. Сложность идентификации и дифференциации парагемолитических от других близкородственных видов вибрионов традиционными методами обусловлена их большим фенотипическим сходством, вариабельностью признаков [Thompson F.L. et al., 2004]. В связи с этим перспективен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с видоспецифичными праймерами, позволяющий определить в геноме бактерий участки молекулы ДНК, специфичные для вида микроорганизма [Tebbs R.S. et al., 2011; Escalante-Maldonado O. et al., 2015; Xu D. et al., 2018].

Развитие современных молекулярно-биологических технологий позволяет дать расширенную характеристику факторов патогенности микроорганизмов, а также выявить маркеры вирулентности [Janik E. et al., 2019]. Ведущую роль в патогенезе заболеваний, вызываемых *V. parahaemolyticus*, играет прямой термостабильный гемолизин, а метод определения гемолитической активности является ведущим для оценки вирулентности штаммов парагемолитических вибрионов. Метод MALDI-ToF-масс-спектрометрического анализа широко используется в лабораторной практике для идентификации микроорганизмов различных видов [Oberkmann S. et al., 2014; Kann S. et al., 2020], однако его использование для

определения гемолизина парагемолитических вибрионов ранее не предлагалось. В связи с этим для прикладных целей, связанных с лабораторной диагностикой необходимо наличие препаратов токсинов парагемолитических вибрионов и, следовательно, их продуценты.

**Цель работы:** Совершенствование лабораторной диагностики микроорганизмов вида *Vibrio parahaemolyticus* с использованием молекулярно-биологических методов, разработка новых методических подходов для выявления и ускоренной дифференциации парагемолитических вибрионов.

**Задачи исследования:**

1. Провести анализ нуклеотидных последовательностей генома штаммов микроорганизмов вида *V. parahaemolyticus* для получения праймеров и зондов, разработать способ идентификации *V. parahaemolyticus* на основе метода полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (Real-Time PCR).

2. Создать набор реагентов, позволяющий выявлять ДНК парагемолитических вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды, методом Real-Time ПЦР; определить его диагностическую эффективность.

3. Провести подбор штамма *V. parahaemolyticus* – продуцента термостабильного прямого гемолизина TDH; разработать метод получения, очистки и контроля стабильности препарата термостабильного прямого гемолизина.

4. Охарактеризовать иммунохимические и биологические свойства препарата TDH *in vitro*; получить специфические иммунные сыворотки к нему и оценить их специфическую активность.

5. Изучить особенности идентификации *V. parahaemolyticus*, формирующих биопленки на биотических объектах.

6. Оценить эффективность использования метода ПЦР на разных этапах лабораторной диагностики парагемолитических вибрионов. Провести испытания разработанного набора реагентов.

7. Разработать алгоритм лабораторной диагностики *V. parahaemolyticus* с использованием молекулярно-биологических методов.

**Научная новизна работы**

Выявлены нуклеотидные последовательности гена металлопротеазы (коллагеназы), позволяющие проводить дифференциацию *V. parahaemolyticus*, получены праймеры и зонды к нему. Показана высокая диагностическая чувствительность – не менее  $1 \times 10^5$  м.к./мл и специфичность – 100% праймеров и зондов при исследовании культур микроорганизмов, проб биологического материала и объектов окружающей среды.

Получен патент №2668805 от 02.10.2018 г. «Штамм *Vibrio parahaemolyticus*, используемый в качестве продуцента прямого термостабильного гемолизина (TDH)».

С использованием сконструированных олигонуклеотидов разработана «Тест-система для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR)» и получены доказательства её высокой диагностической эффективности при исследовании чистых культур микроорганизмов рода *Vibrio*, проб биологического материала и объектов окружающей среды, искусственно контаминированных штаммами *V. parahaemolyticus*. Диагностическая чувствительность набора составила от  $1 \times 10^5$  м.к./мл, специфичность – 100%, воспроизводимость – 100%.

Путем селекции штаммов отобран штамм *V. parahaemolyticus* 14810/1 (KM 2027) – продуцент прямого термостабильного гемолизина (TDH) парагемолитических вибрионов. Разработан способ выделения и очистки препарата термостабильного гемолизина методом высокоаффинной хроматографии, оптимизированы условия получения очищенного препарата с высокой гемолитической активностью.

Получен патент № 2644232 от 08.02.2018 г. «Способ идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR)».

Получены новые данные о масс-спектрометрическом профиле термостабильного прямого гемолизина. Методом MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа определен спектр масс-пиков препарата прямого термостабильного гемолизина *V. parahaemolyticus* и выявлены специфичные пики со значением  $m/z$ , равным  $2452 \pm 5$ ,  $4911 \pm 7$ ,  $4946 \pm 5$ . Метод MALDI-ToF масс-спектрометрии предложен для оценки стабильности препарата TDH.

Разработаны схемы получения иммунных сывороток к TDH-гемолину парагемолитических вибрионов. Из предлагаемых схем наиболее эффективной является четырехкратная иммунизация подкожно с интервалом в 7 дней и стимуляцией иммунного ответа иммуностимулирующими препаратами (иммунофан, полиоксидоний). Проведена оценка специфичности и чувствительности полученных сывороток.

Разработан алгоритм исследования проб с использованием метода Real – Time PCR после предварительного накопления культуры *V. parahaemolyticus*. Предварительное обогащение проб в 1% пептонной воде с 2% NaCl в течение 8 часов позволяет выявлять бактерии *V. parahaemolyticus* методом Real-Time PCR при исходной концентрации их в пробе  $10^1$  м.кл./мл.

### **Практическая значимость**

Сконструированы праймеры и зонды, позволяющие проводить идентификацию штаммов *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real – Time PCR).

Разработан методический подход на основе полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени, позволяющий за короткий срок выявлять ДНК *V. parahaemolyticus* в пробах чистых культур объектах окружающей среды.

Разработаны и одобрены Ученым советом и утверждены директором института Технические условия и инструкция по применению на набор реагентов «Тест-система для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR)» (протокол №12 от 14.12.2017 г.).

Депонирован штамм *V. parahaemolyticus* P-14810/1 – охраноспособный штамм – продуцент TDH *V. parahaemolyticus* KM 2027. Штамм принят в ГКПБ 17.02.2017 года.

Депонированы нуклеотидные последовательности в Международную базу данных GEN BANK, 26.07.2021 г. *V. parahaemolyticus strain* 14810/1.

Депонированы нуклеотидные последовательности в Международную базу данных GEN BANK, 22.09.2020 г. *V. parahaemolyticus strain* 14810.

Одобрены Ученым советом и утверждены директором института методические рекомендации учрежденческого уровня «Получение и очистка препарата прямого термостабильного гемолизина (TDH) *V. parahaemolyticus*» (протокол №12 от 14.12.2017 г.).

Сконструированные праймеры и зонды к гену металлопротеазы (коллагеназы) (*vppC*) *V. parahaemolyticus* для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени используются в номенклатурной ревизии штаммов вибрионов из коллекции Музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 20.04.2021 г.).

Разработанный набор реагентов «Тест-система для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR)» применяется в работе сотрудников Референс-центра по мониторингу за возбудителем холеры ФКУЗ Ростовский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 01.06.2021 г.), а также в других подразделениях института: лаборатории бактериофагов (акт внедрения от 10.06.2021 г.), в лаборатории биохимии микробов (акт внедрения от .06.2021 г.).

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Штамм-продуцент *V. parahaemolyticus* 14810/1 (КМ 2027) может быть использован для получения стандартных препаратов термостабильного прямого гемолизина (TDH) парагемолитических вибрионов при разработке диагностических тест-систем, а также иммунных сывороток к нему. Методом MALDI-ToF-масс-спектрометрического анализа установлено, что препарату прямого термостабильного гемолизина соответствуют пики со значением  $m/z$   $2452\pm 5$ ,  $4911\pm 7$ ,  $4946\pm 5$ , поэтому он может быть применён для оценки стабильности препаратов токсина в процессе их хранения.

2. Сконструированные праймеры и зонд к ДНК гена металлопротеазы (коллагеназы) *V. parahaemolyticus* характеризуются диагностической чувствительностью – не менее  $1\times 10^5$  м.к./мл и 100% специфичностью при исследовании культур микроорганизмов, проб биологического материала и объектов окружающей среды. Использование предлагаемого способа выявления специфического участка ДНК гена металлопротеазы (коллагеназы) *V. parahaemolyticus* с помощью ПЦР в режиме «реального времени» позволяет быстро, точно и эффективно проводить идентификацию представителей вида *V. parahaemolyticus* и дифференцировать их от близкородственных видов.

3. Набор реагентов «Тест-система для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR)», является качественным и эффективным изделием для диагностики *in vitro* с достаточными диагностическими чувствительностью и специфичностью, отвечает требованиям, предъявляемым к диагностическим тест-системам, что позволяет использовать его в лабораторной практике для выявления гена *vppC* (*V. parahaemolyticus*) у штаммов, выделенных из ООС методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

4. Предложенная схема проведения исследований по выявлению парагемолитических вибрионов в пробах воды, гидробионтах, в том числе с учетом их способности к образованию биопленок на биотических поверхностях, с использованием набора реагентов «Тест-система для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR)» дает возможность сократить время исследования с 4-5 дней до 24-48 часов и повысить эффективность и точность лабораторной диагностики *V. parahaemolyticus*, а также позволяет в короткие сроки выявить источник заражения.

### **Личный вклад автора в исследования**

Личный вклад автора состоит в анализе источников литературы отечественных и зарубежных ученых по теме научно-исследовательской работы, обсуждении актуальности и

цели работы, выборе путей решения поставленных задач, реализации задач в соответствии с поставленной целью, направленной на совершенствование методов лабораторной диагностики параземолитических вибрионов, включая молекулярно-генетические, в подготовке публикаций; написании диссертации и автореферата. Основная часть экспериментальной работы (бактериологические, биохимические, биологические, молекулярно-генетические и серологические исследования) автором выполнена самостоятельно. Секвенирование и биоинформационный анализ штаммов *V. parahaemolyticus* 14810 и 14810/1 – продуцента прямого гемолизина TDH проводили совместно с ведущим научным сотрудником, и.о. зав. лабораторией диагностики ООИ, к. б. н. Писановым Р.В. и старшим научным сотрудником лаборатории диагностики ООИ, к. м. н. Водопьяновым А.С. Получение и характеристику препарата термостабильного прямого гемолизина TDH проводили совместно с ведущим научным сотрудником, и.о. зав. лабораторией диагностики ООИ, к. б. н. Писановым Р.В. Разработку и изучение эффективности набора реагентов для идентификации *V. parahaemolyticus* «Тест-система для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR)» проводили совместно с ведущим научным сотрудником, и.о. зав. лабораторией чумы и других иерсиниозов, к. м. н. Трухачевым А.Л. Экспериментальные результаты, представленные в диссертации, получены лично автором в соавторстве с Чемисовой О.С., Писановым Р.В., Трухачевым А.Л., Водопьяновым А.С. На защиту вынесены только те положения и результаты, в которых роль соискателя была определяющей.

Работа выполнена в Музее живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в рамках государственных тем: № 01201352136 от 30.01.2013 «Получение и характеристика термостабильного прямого гемолизина *Vibrio parahaemolyticus*»; № 115032660002 от 26.03.2015 «Изучение вибриопейзажа и санитарно-гигиенических характеристик поверхностных водоёмов города Ростова-на-Дону»; № АААА-А17-117041010027-6 от 10.04.2017 «Контроль качества лабораторной диагностики холеры»; № АААА-А18-118022690029-8 от 26.02.2018 «Экспериментальная оценка роли некоторых экологических факторов в адаптации и персистенции холерных вибрионов, выделяемых в процессе мониторинговых исследований»; Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015 - 2020 годы) в 2018-2020 году в рамках государственного контракта № 10-Д от 28.08.2018 (Лот 1. «Разработка и оптимизация средств и методов идентификации и дифференциации возбудителей особо опасных инфекций на основе данных о разнообразии геномов»).



**Степень достоверности и апробация результатов.** Экспериментальная часть исследования выполнена на прошедшем метрологическую поверку оборудовании. Степень достоверности результатов всех исследований подтверждена результатами трех независимых экспериментов. Использованные коммерческие сертифицированные диагностические препараты и тест-системы имели действующий срок годности.

Материалы диссертации представлены на научных конференциях и съездах:

1. Конференция молодых учёных ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, 2017 г., 2019 г.

2. Проблемная комиссия «Холера и патогенные для человека вибрионы» в рамках Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, 2016 г., 2017 г.

3. IX ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни», г. Москва, 2017 г.

4. IX Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены», г. Иркутск, 2017 г.

5. X Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены», г. Москва, 2018 г.

6. X ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни», г. Москва, 2018 г.

7. XIV Межгосударственная научно-практическая конференция «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ, в том числе на территории трансграничных природных очагов чумы», посвященная 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов, 2018 г.

8. Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2018», г. Минск, 2018 г.

9. II региональная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы медицинской микробиологии на современном этапе», ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, 2018 г.

10. On-line семинар-конференция «Масс-спектрометрия и перспективы ее применения в области микробиологии и эпидемиологии», 2019 г.

11. XII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены», г. Ростов-на-Дону, 2020 г.

**Публикации.** Материалы исследований отражены в 18 научных работах, из них 7 в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации». Получено 2 патента на изобретение.

**План диссертационной работы** утвержден на заседании Ученого совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол №12 от 14.12.2017 г.).

**Структура диссертации.** Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 165 страницах, состоит из введения, одной главы обзора литературы, материалов и методов, трех глав собственных исследований, заключения и выводов. Иллюстрирована 15 таблицами и 36 рисунками. Библиография включает ссылки на 296 публикаций, в том числе 73 отечественных и 223 зарубежных.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования.** В работе исследовано 363 штамма микроорганизмов рода *Vibrio*, полученных из Музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Штаммы были выделены в период с 1971 г. по 2020 г. Для культивирования *V. parahaemolyticus* использовали 2%; 0,3% агар Мартена, щелочной агар и 1%-ую пептонную воду или бульон Мартена с добавлением 2% NaCl. Для изучения гемолитической активности вибрионов применяли агар Вагатцума [МУК 4.2.2046-06], бульон Вагатцума.

Наличие гемолитической активности определяли в тесте Канагава [МУК 4.2.2046-06]. Реакцию гемолиза в планшете проводили с суточными агаровыми культурами штаммов и 1% взвесью эритроцитов в 96-луночных круглодонных планшетах. Для изучения биологической активности парегемолитических вибрионов использовали культуру клеток мышинных фибробластов L-929. О цитотоксической активности судили по изменению морфологии клеток по сравнению с контрольными образцами. Прямой термостабильный гемолизин *V. parahaemolyticus* вызывает деструкцию эукариотических клеток [Рыковская О.А., 2016].

Для получения препарата ТДН-токсина использовали штамм *V. parahaemolyticus* P-14810/1, депонированный в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора под номером КМ-2027. Штамм-продуцент культивировали при 37°C в

бульоне Вагатцума с дополнительным шуттелированием (160 качаний в минуту). Выделение и очистку препарата проводили методом хроматографии в обращенной фазе на FPLC BioLogic Pathfinder Duoflow Bio-Rad, используя колонки с матрицей Butyl Toyopaerl 650M и UNO-Q6 Bio-Rad. Электрофорез на наличие белков проводили в присутствии SDS по методике Laemmli U.K. (1970).

Для получения сывороток к TDH-токсину проводили четырехкратную иммунизацию кроликов подкожно; четырехкратную иммунизация подкожно со стимуляцией препаратами иммунофана или полиоксидония.

Постановку реакции дот-ИФА проводили согласно методу, предложенному Евдокимовой В.В. (2017).

В качестве субстрата для получения биопленки *V. parahaemolyticus* использовали хитиновый экзоскелет креветки и чешую рыбы. Исследования проводили по методике, предложенной Водопьяновым С.О. с соавт. (2019). Наличие сформировавшейся биопленки подтверждали с помощью световой микроскопии окрашивая 1% водным раствором Конго красного и карболовым фуксином.

Для постановки ПЦР использовали сконструированные праймеры и зонд к гену металлопротеазы (коллагеназы). ДНК-матрицы готовили в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

MALDI-ToF масс-спектрометрию проводили с использованием масс-спектрометра «Autoflex speed III Bruker Daltonics» (Германия) с программным обеспечением: FlexControl, Flex Analysis, Biotyper.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами [Ашмарин И.П. с соавт., 1962], путем вычисления средней арифметической, стандартной ошибки средней арифметической, среднеквадратического отклонения и коэффициента вариации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 1 Разработка способа идентификации *V. parahaemolyticus* с помощью ПЦР в режиме «реального времени»

Для поиска уникальных последовательностей специфического гена были использованы ресурсы GeneBank – on-line Blast. Для дизайна праймеров был выбран 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) и определен специфический фрагмент гена, который был использован в качестве мишени для конструирования специфического зонда. Зонд имеет следующую структуру: *vppC ProbaA ROX-CGTTTACAACCACCAACAGCAACGACTTG-BHQ2* и содержит в своем составе

флуоресцентную метку ROX, гаситель флуоресценции BHQ2. В соответствии с нуклеотидной последовательностью зонда, были сконструированы и синтезированы специфичные для вида *V. parahaemolyticus* праймеры: *vppC\_up* (CGGCAAGCGTGGTTTGTGAC); *vppC\_down* (CGTTGATGCAACTTGCACCTTG).

Для постановки Real-Time ПЦР использовали взвеси суточных агаровых культур, обеззараженных согласно МУ 1.3.2569-09. Реакцию проводили в 25 мкл смеси содержащей: 1x (в финальной концентрации) буферный раствор для ПЦР в реальном времени (Интерлабсервис, Москва); 0,25мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов (Thermo Scientific); 1ед. Taq-полимеразы с функцией «горячего старта» (Интерлабсервис, Москва); 2,5мМ хлористого магния (Интерлабсервис, Москва); 50пкМ каждого праймера; 50пкМ зонда и 20нг хромосомной ДНК одного из исследуемых штаммов. Для работы на амплификаторе роторного типа были подобраны следующие настройки прибора: Threshold / Порог – 0,02; More Settings / Outlier Removal / Устранение выбросов – 15 %.

Оптимальные условия амплификации:

- |    |                                    |             |
|----|------------------------------------|-------------|
| 1. | 95,0°C – 15 мин.                   | } 35 циклов |
| 2. | 94,0°C – 30 сек.                   |             |
|    | 55,0°C – 30 сек., учет результатов |             |
|    | 72,0°C – 30 сек.                   |             |
| 3. | 10,0°C – хранение                  |             |

Апробацию предложенного способа проводили на коллекционных штаммах *V. parahaemolyticus* с точно установленной видовой принадлежностью, штаммах вибрионов других видов, а также штаммах гетерологичных видов микроорганизмов. Разработанные праймеры и зонд обладали 100%-ой специфичностью в отношении штаммов *V. parahaemolyticus* и диагностической чувствительностью  $10^5$  м.кл./мл.

На основании проведенных исследований был разработан диагностический набор реагентов «Тест-система для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR)» (далее – Набор реагентов). Проверка диагностической чувствительности и специфичности Набора реагентов на коллекционных штаммах *V. parahaemolyticus*, а также штаммах гетерологичных видов показала, что он обладает 100% специфичностью по отношению к фрагменту гена *vppC* и чувствительностью  $10^5$  м.кл./мл. Ложноположительные реакции отсутствовали.

Таким образом, Набор реагентов является качественным, эффективным изделием для диагностики *in vitro* с достаточными диагностическими чувствительностью и специфичностью, что позволяет использовать его в лабораторной диагностике для детекции

*V. parahaemolyticus*, а также при эпидемиологическом мониторинге для выявления специфических участков нуклеиновых кислот *V. parahaemolyticus*, выделенных из ООС.

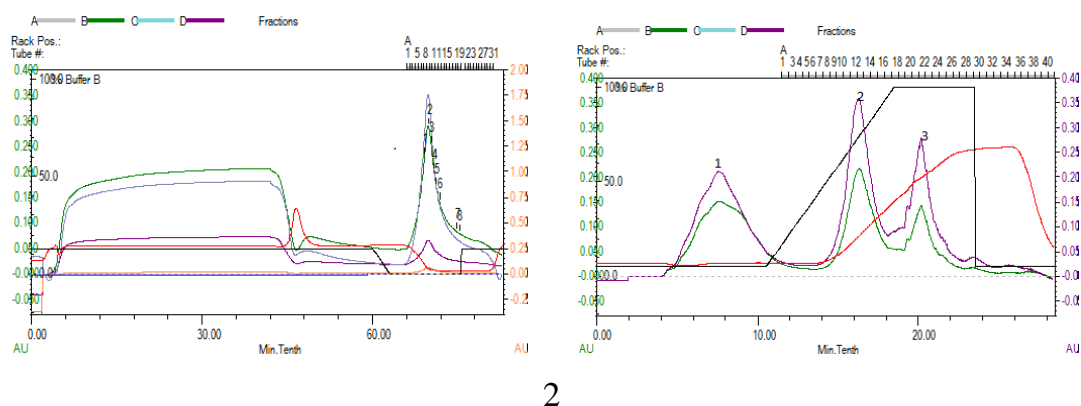
## **2 Получение и характеристика препарата термостабильного прямого гемолизина *V. parahaemolyticus***

Для поиска штамма-продуцента гемолизина TDH на первом этапе работы была изучена способность парегемолитических вибрионов продуцировать гемолизин *in vitro* в тесте Канагава у 100 *tdh+* коллекционных штаммов парегемолитических вибрионов. В результате 52% штамма были отнесены к Канагава-позитивным; 44% – Канагава-слабопозитивным; у 4 % гемолитическая активность полностью отсутствовала. Для дальнейшей работы были отобраны 7 штаммов, обладающие наиболее высокой гемолитической активностью, у которых для оценки продукции TDH дополнительно была использована экспериментальная модель монослойных перевиваемых клеточных культур. Термостабильность проверяли путем прогревания супернатантов в течение 15 минут при 100°C. Наибольшая цитотоксическая активность (в разведении 1:80) была выявлена у *tdh+trh-* штаммов *V. parahaemolyticus* 14800 и 14810, выделенных из клинического материала от больных. Эти штаммы были взяты проведения селекции. В результате многократных пассажей колоний данных штаммов, обладающих наибольшей гемолитической активностью, был получен клон *V. parahaemolyticus* P-14810/1, у которого величина зоны гемолиза составила 7 мм, а цитотоксическая активность на культуре тканей отмечалась в титре бесклеточного супернатанта 1/80-1/160. Штамм сохранял высокую гемолитическую активность после 7 пассажей на питательных средах, выдерживания в течение 6-ти месяцев на 0,3% агаре Мартена с 2%NaCl, а также после лиофилизации, что свидетельствует о стабильности приобретенного в результате селекции признака. Данный штамм депонирован в ГКПБ «Микроб» под номером КМ-2027 и может быть использован для получения препаратов термостабильного прямого гемолизина *V. parahaemolyticus*.

### **2.1 Получение и характеристика препарата термостабильного прямого гемолизина**

Для получения препарата токсина штамм-продуцент *V. parahaemolyticus* КМ-2027 культивировали в бульоне Вагатцума при 37°C в течение 24 часов с дополнительным шуттелированием. Выделение и очистку препарата гемолизина проводили методом хроматографии в обращенной фазе на FPLC BioLogic Pathfinder Duoflow Bio-Rad. В ходе элюции на колонке Butyl Toyoraerl 650M получили 31 фракцию, гемолитическую активность которых проверяли методом гемолиза в планшете. Фракции, вызывающие гемолиз, объединяли и наносили на анионообменную колонку UNO-Q6 Bio-Rad, профиль элюции на которой имел 3 пика (рисунок 1). Гемолизин содержался во втором пике, что подтверждалось положительным результатом в реакции гемолиза. Фракции второго пика объединяли и

диализовали против 0,9 % раствора хлорида натрия, измеряли количество белка. Выход очищенного гемолизина от общего количества белка в исходном препарате составил 0,3%.



1

2

Рисунок 1 – Профили элюции

1 – культуральной жидкости *V. parahaemolyticus* KM-2027 на колонке Butyl Toyopaerl 650M.

2 – препарата на колонке UNO-Q6.

Контроль чистоты и гомогенности препарата с помощью электрофореза в полиакриламидном геле показал, что в очищенном препарате обнаруживалась одна белковая полоса на уровне маркера молекулярной массы 25 кДа, что соответствует литературным данным, согласно которым молекулярная масса TDH составляет 23 кДа [Шалу О.А. с соавт., 2012]. В результате проведенной работы были получены три серии препарата TDH, обладающие гемолитической активностью до разведения 1:128. Количество белка составило 100 мкг/мл, 300 мкг/мл и 800 мкг/мл.

Для изучения и анализа препарата TDH *V. parahaemolyticus* использовали метод MALDI-ToF масс-спектрометрии и три различные серии препарата. Были выявлены специфичные масс-пики с  $m/z$  2452±5, 4911±7, 4946±5 (рисунок 2). Отсутствие большого количества пиков позволяет косвенно судить о хорошей степени очистки препарата. Повторные опыты с разными сериями препарата показали идентичность пиков. Изучение препарата в процессе хранения методом MALDI-ToF масс-спектрометрии с параллельным контролем гемолитической активности показало, что утрата последней коррелировала с отсутствием специфичных масс-спектров.

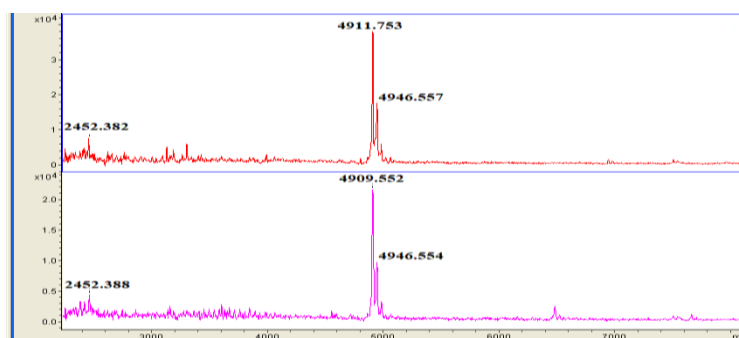


Рисунок 2 – MALDI-TOF масс-спектры, характерные для препарата токсина TDH

Таким образом показано, что метод MALDI-ToF-масс-спектрометрии позволяет проводить идентификацию TDH-токсина в препаратах посредством выявления специфических масс-пиков и оценивать степень очистки и стабильность препаратов при хранении.

## **2.2 Получение и оценка серологической активности иммунных сывороток к TDH**

### ***V. parahaemolyticus***

Экспериментальный препарат очищенного токсина TDH *V. parahaemolyticus* использовали для получения специфических иммунных сывороток, которые были охарактеризованы по специфичности и чувствительности в методе дот-ИФА и реакции преципитации. В реакции преципитации было установлено, что исследуемые сыворотки образовывали линии преципитации с препаратом TDH-токсина и штаммами *V. parahaemolyticus tdh+*. Активность полученных сывороток составила 1/2.

При постановке реакции дот-ИФА было показано, что все сыворотки давали положительную реакцию с супернатантами КР+*tdh+trh-* штаммов *V. parahaemolyticus* в титре 1:2500-1:5000, а также со штаммами КР-*tdh+trh+*; КР-*tdh+trh-*; КР-*tdh-trh+*. Штаммы других микроорганизмов рода *Vibrio* характеризовались отрицательной реакцией. Три штамма *V. parahaemolyticus* с генетической характеристикой *tdh+*, отрицательные в тесте Канагава, в реакции дот-ИФА показали положительный результат. Это дает возможность использовать данный метод для дополнительной характеристики штаммов, особенно в случае получения отрицательных результатов КР-теста при выделении культуры из клинического материала от больных. Также, исходя из высокого антигенного родства двух гемолизин, логичным представляется одновременное выявление обоих гемолизин, поскольку и TDH, и TRH являются факторами патогенности.

## **3 Разработка алгоритма исследований объектов окружающей среды на**

### ***V. parahaemolyticus* с учетом их биологических свойств**

#### **3.1 Изучение особенностей формирования парагемолитическими вибрионами**

##### **био пленки на поверхностях биотических объектов**

Изучение особенностей формирования био пленки бактериями вида *V. parahaemolyticus* на поверхностях биотических объектов проводили для дальнейшего совершенствования алгоритма исследования на этапе отбора проб. В качестве субстратов использовали нарезанные пластинами экзоскелет креветки (хитин) и чешую морской рыбы. Для подтверждения наличия био пленки использовали количественный метод Real-Time ПЦР с Набором реагентов.

Данные количественного ПЦР-анализа свидетельствовали о том, что образование био пленки на хитиновом панцире креветок шло активнее, чем на чешуе рыб. Через 27 суток

культивирования количество копий ДНК в контрольных пробах с морской водой стало менее  $10^5$  копий/мл. При этом в биопленочных пробах *V. parahaemolyticus* достигало  $10^6$  копий/мл, что свидетельствует о способности вибрионов длительное время переживать неблагоприятные условия окружающей среды, а также использовать биотический субстрат в качестве источника питательных веществ.

В результате идентификации планктонных культур и биопленочных форм *V. parahaemolyticus* масс-спектрометрическим методом всех исследуемых проб после первичного высева на твердые питательные среды все они были отнесены к виду *V. parahaemolyticus* с показателями Score выше 2,000, что свидетельствует о высокой достоверности определения вида независимо от материала, с которого был произведен посев. Сравнительный анализ белковых масс-спектров по величине масса/заряд ( $m/z$ ) и относительной интенсивности пиков опытных штаммов показал, что все штаммы независимо от планктонной или биопленочной формы имели общие пики, но отличающиеся по интенсивности. Так как метод масс-спектрометрии позволяет проводить анализ рибосомальных белков, специфичных для вида микроорганизмов, состав которых не зависит от условий существования, это объясняет сходство белковых масс-спектров.

Изучение возможности использования метода MALDI-ToF масс-спектрометрии для экспресс-идентификации биопленок *V. parahaemolyticus* путем проведения прямого масс-спектрометрического анализа с биотического субстрата без предварительного посева на питательные среды показало невозможность идентификации штаммов из планктонных и биопленочных проб, ввиду большого количества примесей белков, возникающих при распаде самих субстратов и дающих при масс-спектрометрии большое количество фоновых пиков.

Таким образом, изменения масс-спектров штаммов парагемолитических вибрионов в процессе перехода в биопленочную форму влияют на достоверность идентификации вибрионов методом MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа. Вероятно, это связано с наличием примесей пептидов – продуктов гидролиза самих субстратов, дающих при масс-спектрометрии фоновые пики. Также необходимо учитывать тот факт, что при внесении спектров в базы данных используются суточные культуры и более длительное культивирование в составе биопленок может приводить к изменениям белкового спектра, появлению продуктов автолиза клеток. При этом отмечено отсутствие корреляции между изменениями в масс-спектрах и формой существования микробных клеток, субстратом для образования биопленок.



### **3.3 Изучение возможности использования набора реагентов «Тест-система для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR)» в пробах, искусственно контаминированных *V. parahaemolyticus***

Для определения возможности использования, сконструированного Набора реагентов для выявления вибрионов в биологическом материале использовали пробы рыбы, искусственно контаминированные бактериями *V. parahaemolyticus* в концентрациях  $10^9$ - $10^3$  м.кл./мл. Проведенные исследования показали возможность использования полученных праймеров для индикации парегемолитических вибрионов в зараженных пробах рыбы. Чувствительность реакции составила  $10^5$  м.кл. в 1 г зараженного продукта

В связи с тем, что *V. parahaemolyticus* выявлялся нами в образцах рыбы в количестве  $10^5$  м.кл./г, была проведена оценка возможности использования среды обогащения (1% пептонная вода с 2% NaCl) для проб, содержащих  $10^1$  –  $10^4$  м.кл./мл. В питательную среду объемом 50 мл, добавляли по 1 мл исследуемых проб и культивировали в течение 8 часов. Постановку Real-Time ПЦР проводили через каждый час культивирования. Проведенный эксперимент показал, что использование среды обогащения для проб, содержащих *V. parahaemolyticus* в количестве  $10^1$ - $10^4$  м.кл./мл позволяет достигнуть количества колоний  $10^5$  м.кл./мл за период от 2-х часов (при исходной концентрации клеток  $10^4$  м.кл./мл) до 8 часов (при исходной концентрации клеток  $10^1$  м.кл./мл). Все пробы, в которых концентрация клеток достигла  $10^5$  м.кл./мл и выше через определенные промежутки времени выращивания характеризовались наличием флуоресценции по каналу ROX в пробах. Таким образом, предварительное обогащение проб в 1% пептонной воде с 2% NaCl в течение 8 часов позволяет выявлять бактерии *V. parahaemolyticus* при исходной концентрации их в пробе  $10^1$  м.кл./мл методом Real-Time PCR.

### **3.4 Использование сконструированных праймеров и зонда в коллекционной деятельности для подтверждения видовой принадлежности**

В Музей живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора ежегодно поступают штаммы парегемолитических и других вибрионов. Все штаммы *V. parahaemolyticus*, поступившие в МЖК с ЦПВ в период 2017-2020 гг исследовали в Real-Time ПЦР с разработанными праймерами. Из 77 штаммов удалось определить, что 3 штамма изначально поступившие, как *V. parahaemolyticus*, в реакции с Набором реагентов были отрицательны. При дальнейшей видовой идентификации масс-спектрометрическим методом все они были идентифицированы, как *V. alginolyticus*, что подтверждает высокую специфичность разработанного метода Real-Time ПЦР и возможность его использования при мониторинге объектов окружающей среды на этапе выделения культуры.

Таким образом, в ходе лабораторной оценки эффективности Набора реагентов, установлено, что он обладает достаточными чувствительностью и специфичностью и может использоваться в коллекционной деятельности для подтверждения видовой принадлежности микроорганизмов вида *V. parahaemolyticus* методом Real-Time ПЦР.

### 3.5 Разработка алгоритма исследований объектов окружающей среды на наличие *V. parahaemolyticus* с учетом их биологических свойств

Регламентированная на сегодняшний день схема исследования на наличие парегемолитических вибрионов не содержит молекулярно-генетических методов идентификации. Предлагаемая схема (рисунок 3) с использованием Набора реагентов позволит выдать предварительный положительный ответ через 24-48 часов от начала исследования (в зависимости от графика работы лаборатории). Пробоподготовку поступившего материала на наличие *V. parahaemolyticus* проводят согласно МУК 4.2.2046-06. При исследовании рыб и других обитателей водоемов необходимо учитывать тот факт, что на поверхности наружного скелета гидробионтов парегемолитические вибрионы способны формировать биопленку, количество жизнеспособных микроорганизмов в которой гораздо выше, чем во внутренних органах. В связи с чем необходимо брать в исследование не только кусочки с кожей и мышцами, но и чешую, хитиновый экзоскелет.

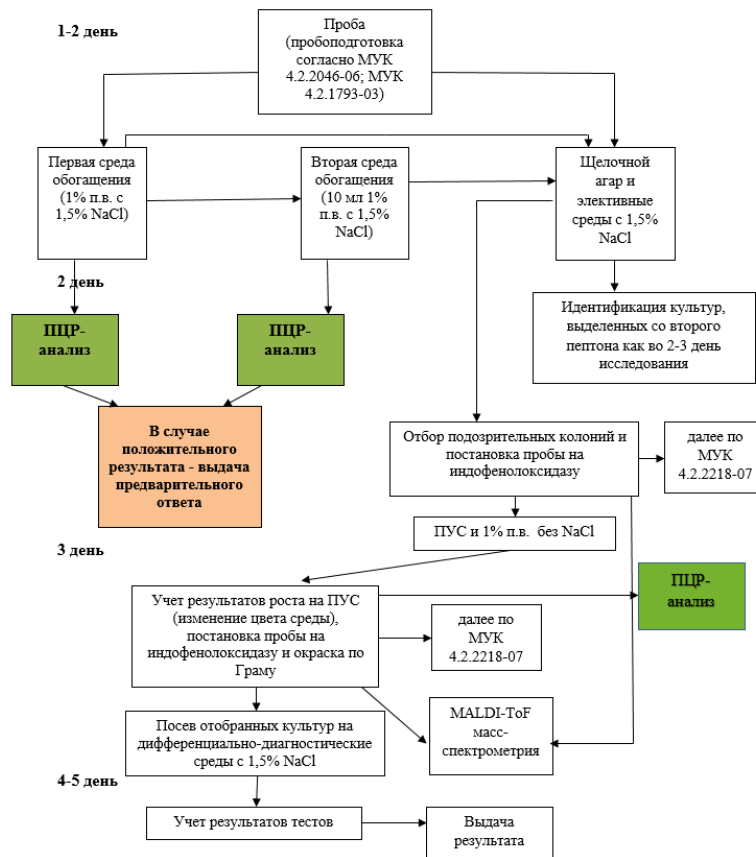


Рисунок 3 – Место ПЦР-анализа в схеме исследования материала из ООС на наличие парегемолитических вибрионов

Подготовленный необходимым образом материал засевают в первую среду обогащения (1% пептонная вода с 1,5% NaCl). Через 6-8 ч от начала исследования делают пересев во вторую среду обогащения (1% пептонная вода с 1,5% NaCl). Не менее чем через 8 ч от начала исследования проводят ПЦР с помощью Набора реагентов согласно прилагаемой инструкции из первой среды обогащения. Не менее чем через 8 ч после посева во вторую среду обогащения проводят ПЦР с помощью Набора реагентов. В случае наличия флуоресцентного свечения по каналу ROX возможна выдача предварительного положительного ответа для своевременного начала противоэпидемических и профилактических мероприятий. Остальные исследования из первой и второй сред обогащения проводят согласно МУК 4.2.2046-06. При наличии колоний на твердых питательных средах, подозрительных на *V. parahaemolyticus*, на этапе отбора колоний готовят взвеси не менее  $10^5$  м.кл./мл и проводят ПЦР с помощью Набора реагентов. В случае наличия флуоресцентного свечения по каналу ROX возможна выдача предварительного положительного ответа.

Таким образом применение Набора реагентов позволяет вовремя оценить эпидемиологическую ситуацию и определить объем необходимых противоэпидемических и профилактических мероприятий.

### Заключение

Таким образом, в результате настоящего исследования была усовершенствована схема выявления и ускоренной дифференциации парагемолитических вибрионов на основе ПЦР. Разработан набор реагентов для качественного выявления ДНК *V. parahaemolyticus* методом ПЦР в режиме реального времени – «Тест-система для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR)», позволяющий с высокой специфичностью и чувствительностью до  $10^5$  м.кл./мл обнаружить патогенные вибрионы *V. parahaemolyticus*, выделяемые из ООС.

Получен штамм-продуцент прямого термостабильного гемолизина – *V. parahaemolyticus* КМ-2027. Разработана схема получения и очистки препарата токсина гемолизина методом хроматографии в обращенной фазе на FPLC, которая позволяет получать препарат с концентрацией до 800 мкг/мл и стабильной гемолитической активностью. В результате масс-спектрометрии очищенного препарата ТДН *V. parahaemolyticus* выявлены масс-пики с  $m/z$   $2452 \pm 5$ ,  $4911 \pm 7$ ,  $4946 \pm 5$ . Получены антитоксические сыворотки с рабочим титром 1:2500-1:5000 в дот-ИФА.

Показано, что использование парагемолитическими вибрионами в качестве питательных веществ компонентов чешуи и хитина способствует образованию биопленки и интенсивному размножению вибрионов на биотических поверхностях. По результатам ПЦР исследований максимальное количество копий ДНК *V. parahaemolyticus*, образующих на поверхности

хитина и чешуи пленку приходилось на 3-6 сутки и составляло от  $77 \times 10^3$  (у штамма, содержащего ген *tdh*) до  $457000 \times 10^3$  (у штамма, не содержащего ген *tdh*). Высокую концентрацию жизнеспособных клеток парагемолитических вибрионов в биопленке на поверхности биотических субстратов следует учитывать при выборе объектов исследования на наличие *V. parahaemolyticus*, особенно в зонах рекреации.

Сконструированный Набор реагентов для выявления *V. parahaemolyticus* в ПЦР может использоваться для индикации штаммов в пробах рыбы с чувствительностью  $10^5$  м.кл./мл. Использование на первом этапе исследования среды обогащения для проб, содержащих  $10^1$  –  $10^4$  м.кл./мл приводит к накоплению культуры в течение 2-8 часов до  $10^5$  м.кл./мл, что позволяет выявлять бактерии *V. parahaemolyticus* при исходной концентрации их в пробе  $10^1$  м.кл./мл методом Real-Time PCR.

### **Практические рекомендации и перспективы дальнейших исследований**

Бактерии вида *V. parahaemolyticus* являются возбудителями пищевых токсикоинфекций, связанных с употреблением в пищу морепродуктов и способны вызывать вспышки. Поэтому важно быстро и достоверно определить источник возбудителя и его вирулентность. Набор реагентов «Тест-система для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR)» позволяет существенно повысить достоверность ПЦР-анализа, исключив возможность контаминации; сократить трудозатраты и время анализа; проводить ПЦР-анализ в одном помещении, что играет существенную роль для лабораторий, занимающихся исследованиями объектов рыбного промысла, а также региональных отделений ЦГиЭ, а также ускорить выдачу предварительного положительного ответа; вовремя оценить эпидемиологическую ситуацию и определить объем необходимых противоэпидемических и профилактических мероприятий.

В дальнейшем планируется совершенствование схемы лабораторной диагностики клинического материала с использованием ПЦР, а также изучение возможности создания набора реагентов для выявления *V. parahaemolyticus* в изотермической ПЦР.

### **ВЫВОДЫ:**

1. Предложен способ выявления микроорганизмов *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в «режиме реального времени», основанный на обнаружении видоспецифичного гена металлопротеазы (коллагеназы) (*vpp C*-ген), который обеспечивает специфичную детекцию парагемолитических вибрионов в ООС. Сконструированы видоспецифичные праймеры и флуоресцентно-меченый зонд к гену металлопротеазы (коллагеназы) *V. parahaemolyticus*.

2. На основе разработанных праймеров создан набор реагентов «Тест-система для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в

режиме реального времени (Real-Time PCR)», который характеризуется высокой чувствительностью ( $10^5$  м.кл./мл) и специфичностью (100%) при исследовании чистых культур микроорганизмов, проб биологического материала и объектов окружающей среды.

3. Путем селекции отобран штамм *V. parahaemolyticus* 14810/1 (КМ 2027) – продуцент прямого термостабильного гемолизина (TDH) парагемолитических вибрионов. Разработан способ выделения и очистки препарата методом высокоаффинной хроматографии, получены специфические кроличьи сыворотки, позволяющие выявлять TDH-гемолизин в иммунологических реакциях с рабочим титром 1:2500-1:5000.

4. При выборе объектов исследования на наличие *V. parahaemolyticus*, особенно в зонах рекреации, следует учитывать способность парагемолитических вибрионов использовать в качестве питательных веществ компоненты чешуи и хитина, что приводит к их интенсивному размножению, образованию биопленки и накоплению жизнеспособных клеток в высокой концентрации на поверхности биотических субстратов.

5. По результатам ретроспективного анализа коллекционных и свежевыделенных штаммов проведена видовая идентификация штаммов с использованием набора реагентов «Тест-система для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR)». Показано, что использование набора реагентов позволяет ускорить сроки выдачи положительного ответа на наличие в пробе микроорганизмов *V. parahaemolyticus*.

6. Показана специфичность и эффективность набора реагентов «Тест-система для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR)» при исследовании культур парагемолитических вибрионов, выделяющихся в ходе мониторинга водных объектов на территории Российской Федерации.

7. Разработан алгоритм выявления и идентификации *V. parahaemolyticus* в объектах окружающей среды после накопления культуры в 1% пептонной воде в течение 8 часов с последующим проведением ПЦР на основе набора реагентов «Тест-система для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR)», что позволяет сократить сроки выдачи предварительного положительного ответа.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

TDH – thermostable direct hemolysin / прямой термостабильный гемолизин *V. parahaemolyticus*; ПЦР/PCR- полимеразная цепная реакция; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; MALDI-ToF – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization / времяпролентная матрично активированная лазерная десорбция/ионизация; м.кл./мл – микробных клеток в миллилитре;

ГКПБ – Государственная коллекция патогенных бактерий ФКУЗ «Микроб»; *vppC* – ген металлопротеазы (коллагеназы); ООС – объекты окружающей среды; FPLS – fast protein liquid chromatography / быстрая жидкостная хроматография белков; дот-ИФА – точечный иммуноферментный анализ; КР / КП – феномен Канагава.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Полеева, М.В.** Использование масс-спектрометрического анализа для детекции бактериальных токсинов (лит. обзор) / **М.В. Полеева, О.С. Чемисова** // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2018. – №1. – с. 93-101 (**из перечня ВАК**).
2. Рыковская, О.А. Штаммы-продуценты термостабильного прямого гемолизина (TDH) и TDH-родственного гемолизина (TRH) *Vibrio parahaemolyticus* / О.А. Рыковская, **М.В. Полеева, О.С. Чемисова, Е.М. Санамянц** // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – Т.14. - №1. – 2018. – с.43-48 (**из перечня ВАК**).
3. **Полеева, М.В.** Способ получения препарата прямого термостабильного гемолизина (TDH) *Vibrio parahaemolyticus* / **М.В. Полеева, О.С. Чемисова, Р.В. Писанов, О.А. Цырулина** // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – Т.14. - №4. – 2018. – с. 27-32 (**из перечня ВАК**).
4. **Полеева, М.В.** Разработка способа индикации и идентификации *Vibrio parahaemolyticus* с помощью Real-Time ПЦР / **М.В. Полеева, О.С. Чемисова, А.Л. Трухачев** Вестник Пермского университета. Серия «Биология». – 2019. – Вып. 2. – с. 175-181 (**из перечня ВАК**).
5. **Полеева, М.В.** Экспериментальное изучение особенностей формирования парагемолитическими вибрионами биопленки на поверхностях биотических объектов / **М.В. Полеева, О.С. Чемисова, С.О. Водопьянов, Е.А. Меньшикова, Е.М. Курбатова** // Вестник Пермского университета. Серия «Биология», 2019. – № 4. – с. 417-425 (**из перечня ВАК**).
6. Чемисова, О.С. Метод MALDI-ToF масс-спектрометрии для изучения биопленок парагемолитических вибрионов / О.С. Чемисова, **М.В. Полеева** // Вестник биотехнологии им. Овчинникова. Серия «Биология». – Т. 17, №1. – с. 40-47 (**из перечня ВАК**).
7. **Полеева, М.В.** Изучение эффективности набора реагентов для идентификации *Vibrio cholerae* и *Vibrio parahaemolyticus* методом мультилокусной Real-Time ПЦР в ходе мониторинга объектов окружающей среды / **М.В. Полеева, С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, А.В. Алленов, В.П. Борзов, О.С. Чемисова** // Клиническая лабораторная диагностика. – 2021. – Т. 66. – № S4. – С. 54-55 (**из перечня ВАК**).
8. Рыковская, О.А. Поиск штамма-продуцента термостабильного прямого гемолизина (TDH) *Vibrio parahaemolyticus* / О.А.Рыковская, О.С. Чемисова, **М.В. Полеева,**

Е.М. Санамянц // Холера и патогенные для человека вибрионы: Сб. статей пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону, 2016. – Вып.29. – с.202-205.

9. Рыковская, О.А. Идентификация *V. parahaemolyticus* методом ПЦР в режиме реального времени тезисы / О.А. Рыковская, **М.В. Полеева**, О.С. Чемисова, А.Л.Трухачев // Инфекционные болезни: материалы IX ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием – Москва, 2017. – Т. 15. – приложение 1. – с. 242.

10. Чемисова, О.С. Характеристика бактериальных антигенов белковой природы с помощью MALDI-ToF масс-спектрометрии / О.С. Чемисова, **М.В. Полеева**, О.А. Рыковская, Р.В. Писанов // Инфекционные болезни: материалы IX ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием – Москва, 2017. – Т. 15. – приложение 1. – с. 307.

11. Чемисова, О.С. Идентификация и типирование штаммов парегемолитических вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды в 2016 году в Приморском крае / О.С. Чемисова, О.А. Рыковская, **М.В. Полеева**, Е.Н. Голенищева, Е.М. Санамянц, А.В. Алленов // Холера и патогенные для человека вибрионы: Сб. статей пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону. – 2017. – Вып. 30. – с. 92-95.

12. Рыковская, О.А. Изучение препарата прямого термостабильного гемолизина *V. parahaemolyticus* методом MALDI-ToF масс-спектрометрии / О.А. Рыковская, **М.В. Полеева**, О.С. Чемисова // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: Матер. IX Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых и спец-в Роспотребнадзора. – Иркутск, 2017. – с. 110-111.

13. Рыковская, О.А. Разработка способа идентификации *V. parahaemolyticus* с помощью ПЦР в режиме реального времени / О.А. Рыковская, **М.В. Полеева**, О.С. Чемисова, А.Л. Трухачев // Здоровье населения и среда обитания. – 2018. - №3 (300). – с. 48-50.

14. **Полеева, М.В.** Выделение парегемолитических вибрионов методом ПЦР из проб рыбы // **М.В. Полеева**, О.С. Чемисова, А.Л. Трухачев // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: Матер. X Всерос. науч.- практ. конф. молодых ученых и спец-в Роспотребнадзора. – Москва, 2018. – с.251-254.

15. **Полеева, М.В.** Получение и очистка препарата прямого термостабильного гемолизина (ТДН) *Vibrio parahaemolyticus* / **М.В. Полеева**, О.С. Чемисова, Р.В. Писанов, О.А. Цырулина // Сборник материалов X Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. – Москва. – 2018. – с. 175.

16. Чемисова, О.С. Оценка эффективности тест-системы на основе ПЦР в режиме реального времени для идентификации *V. parahaemolyticus* / О.С. Чемисова, **М.В. Полеева**,

А.Л.Трухачев, О.А. Цырулина // Сборник материалов X Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. – Москва. – 2018. – с. 247.

17. **Полеева, М.В.** Real-time ПЦР для идентификации *Vibrio parahaemolyticus* / **М.В. Полеева**, О.С. Чемисова, А.Л. Трухачев // Молекулярная диагностика – 2018: Сборник трудов международной научно-практической конференции. – Минск, 2018. – с.316-318.

18. **Полеева, М.В.** Использование метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для изучения биопленок парагемолитических вибрионов / **М.В. Полеева**, О.С. Чемисова // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены. Материалы XII Всеросс. науч.-практ. конф. молодых ученых и спец-в Роспотребнадзора. – Ростов-на-Дону, 2020. – с. 389-393.