

## МІКРОБІОЛОГІЯ ТВАРИН

УДК 597-12:576.85.08

### ЕКСПРЕС ДІАГНОСТИКА ФЛАВОБАКТЕРІОЗУ РИБ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

**Ю. П. Рудь**

Інститут рибного господарства НААН  
вул. Обухівська, 135; м. Київ, 03164, Україна  
e-mail: rud\_yuriy@ifr.com.ua

*Розроблено метод ідентифікації флавобактеріозу риб за використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Показано специфічність та ефективність підібраних олігонуклеотидних праймерів. Від клінічно здорової та хворої на флавобактеріоз райдужної форелі виділено дев'ять штамів флавобактерій. За допомогою розробленого методу ідентифіковано штам *Flavobacterium columnare* та шляхом філогенетичного аналізу встановлено його спорідненість з іншими представниками роду *Flavobacterium*. Інших збудників флавобактеріозу, таких як *F. psychrophylum* та *F. branchiophilum* не виявлено. Показана можливість видової ідентифікації флавобактерій методом рестрикційного аналізу гена 16S рРНК. Розроблений метод ПЛР може бути використаний для експрес-діагностики різних форм флавобактеріозу риб в рибогосподарських підприємствах України.*

*Ключові слова: флавобактеріоз, райдужна форель, ПЛР.*

До роду *Flavobacterium* належать грамнегативні, аеробні, оксидазо-позитивні, неферментуючі, жовто-пігментні та здебільшого ковзаючі бактерії, які не формують спор [1]. За останні 10 років рід *Flavobacterium* поповнився багатьма но-

вими видами і сьогодні включає 75 видів. Цим мікроорганізмам притаманні такі екологічні ніші як прісні та солонуваті водойми, а також ґрунти [2]. Значна кількість представників роду *Flavobacterium* є патогенами або збудниками опортуністичних захворювань, які спричиняють хвороби у великого кола організмів, що включає рослини, риб та людину [3–5]. Найбільш шкочинними представниками роду *Flavobacterium* у рибництві є бактерії *F. psychrophylum* та *F. columnare*, які призводять до масової загибелі риби в умовах аквакультури [6; 7].

Бактерії *F. psychrophylum* є збудником інфекційного захворювання у лососевих риб під назвою «хвороба холодної води» (з англ. bacterial cold water disease, BCWD) [8], а також спричиняють запалення печінки у мальків райдужної форелі (з англ. rainbow trout fry disease, RTFS) [9]. Ці захворювання поширені в країнах Скандинавії, але також зустрічається в холодноводних господарствах центральної та східної Європи [10]. Основною ознакою інфекції *F. psychrophylum* є утворення глибоких виразок на поверхні тіла ураженої риби.

Колумнарна хвороба (з англ. columnaris або cotton-wool disease), збудником якої є бактерії *F. columnare* — це інфекційне і висококонтагіозне захворювання, що спричиняє масову загибель прісноводних видів риб. За захворювання розвивається при температурі води 15 °С і вище та зустрічається у лососевих, каналного сома, коропа та ін. [11]. Часто колумнарна хвороба проявляється в результаті вторинної або опортуністичної інфекції [12]. Ознаками захворювання є поява на тілі риби блідо-білуватих осередків, які нагадують клубки шерсті або бавовни. Під час перебігу колумнарної хвороби зябра ураженої риби набувають блілого відтінку з проявами осередків некротичного запалення. У мальків це захворювання може проходити без характерної симптоматики. Раніше вважалося, що дане захворювання спричиняється змішаною бактеріальною інфекцією, яку формують *Flexibacter columnaris*, *Bacillus columnaris*, *Chondrococcus columnaris* та *Cy-*

*trophaga columnaris*. Також помилково вважали, що це захворювання грибної етіології [13].

Ще одним збудником флавобактеріозу є бактерії *F. branchiophilum*, які спричиняють бактеріальну хворобу зябер (з англ. bacterial gill disease, BGD) у форелі [14]. Окрім вище вказаних видів, флавобактеріоз та смертність у риб також пов'язують й з іншими представниками роду *Flavobacterium*, наприклад, *F. johnsoniae*, *F. aquatile*, *F. hydatis* та *F. succinicans* [2; 15; 16].

Одним із ключових факторів швидкого розвитку світової аквакультури є контроль інфекційних захворювань об'єктів рибництва. В Україні ситуація з розповсюдженням та походженням флавобактеріозу в природних водоймищах і рибогосподарських підприємствах досліджена недостатньо. До того ж дане бактеріальне захворювання визначено одним із найнебезпечніших для сучасної аквакультури. Тому метою нашої роботи було виділити представників роду *Flavobacterium* з хворої та клінічно здорової райдужної форелі *Onchorhynchus mykiss* та розробити метод експрес діагностики флавобактеріозу риб на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

**Матеріали й методи.** Первинний посів мікроорганізмів з одноліток райдужної форелі *O. mykiss* з підозрою на флавобактеріоз здійснювали на м'ясо-пептонний агар (МПА). Зразки для бактеріологічних посівів відбирали із зябер, шкіри та черевної порожнини. Аналогічні дослідження проводили також у клінічно здорових одноліток райдужної форелі. Виділення чистої культури, дослідження морфології колоній та клітин проводили за загальноприйнятими методами [17].

ДНК виділяли з колоній чистих культур. Для цього готували бактеріальні суспензії. У 100 мкл фосфатного буферу (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, рН 7,4) стерильною голкою вносили бактерії. Потім додавали 500 мкл лізуючого буферу (10 мМ TRIS-HCl рН 8,0, 0,1 М NaCl, 25 мМ ЕДТА, 0,5 % натрій додецилсульфат) та 3 мкл

протеїнази К (~600 од./мкл), ретельно перемішували та інкубували 1 годину при температурі 37 °С. ДНК екстрагували фенолом (рН 8,0) та центрифугували 5 хвилин при 13 400 об./хв. Надосадову рідину відбирали та проводили повторну екстракцію ДНК сумішшю хлороформ – ізоаміловий спирт (24 : 1). Суспензію центрифугували на мікроцентрифузі упродовж п'яти хвилин при 13 400 об./хв. До супернатанту додавали 0,1 об'єму 3 М натрій ацетату (рН 5,2) та 2,5 об'єму охолодженого до –20 °С етанолу. Преципітацію ДНК проводили за кімнатної температури впродовж 1 год. Після цього осаджували ДНК на мікроцентрифузі при 13 400 об./хв. упродовж 10 хвилин. Осад ДНК промивали 70 % етанолом. ДНК розчиняли у деіонізованій воді, вільній від нуклеаз [18].

Для розроблення олігонуклеотидних праймерів, специфічних до бактерій — збудників флавобактеріозу, визначення їхньої специфічності та фізичних властивостей використовували програмне забезпечення Vector NTI 10. Крім того, специфічність праймерів перевіряли за допомогою онлайн-сервісу BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Послідовність праймерів для *F. columnare* була такою:

FCF 5'-AAGGCAACGATGGGTAG-3' та

FCR 5'-GCACGGAGTTAGCCGATC-3'.

Для діагностики *F. psychrophylum* використовували напівгніздову ПЛР у два етапи і наступний набір праймерів:

FP1 5'-CTTAGTTGGCATCAACAC-3' і

FP3 5'-ACACTGGCAGTCTTGCTA-3' використовували на першому етапі напівгніздової ПЛР, а на другому етапі застосовували праймери PSY1 5'-GTTGGCATCAACACACT-3' та FP3.

Для видової ідентифікації бактерій роду *Flavobacterium* використовували метод поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів продуктів ПЛР (ПЛР-ПДРФ) [19]. Для ампліфікації гену 16S рРНК використовували наступні праймери: 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' та 1492R 5'-CCGYTACCTTGTTACGACTT-3'.

Ампліфікацію проводили на термоциклері «96 Universal Gradient PEQ STAR» (PEQLAB, Німеччина). До складу реакційної суміші входили такі компоненти: 12,5 мкл DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), олігонуклеотидні праймери (Metabion, Німеччина) по 1 мкл кожного (20 пмоль/мкл), 1 мкл ДНК та стерильна деіонізована вода до загального об'єму 25 мкл. Ампліфікація складалась з 1 циклу попередньої денатурації при 94 °С (3 хвилини) та 35 циклів денатурації при 94 °С (30 секунд), відпалу праймерів при температурі 64 °С (30 секунд), синтезу при 72 °С (1 хвилина) та додаткового останнього циклу синтезу при 72 °С (7 хвилин). Після ПЛР продукти аналізували у 2 %-му агарозному гелі в ТАЕ-буфері (40 мМ TRIS-НСl, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ ЕДТА). Результати електрофорезу спостерігали під ультрафіолетовим транслюмінатором.

Під час проведення рестрикційного аналізу гена 16S рРНК флавобактерій використовували ендонуклеази рестрикції *Hind*III та *Bam*HI (Fermentas). У мікропробірку вносили 10 мкл ампліфікованої ДНК, 2 мкл буфера та 1 мкл відповідної рестриктази. Сумарний об'єм доводили до 20 мкл стерильною деіонізованою водою. Суміш залишали для реакції на ніч у термостаті при температурі 37 °С. Продукти рестрикції аналізували в 2 %-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію в концентрації 0,5 мкг/см<sup>3</sup>. Електрофорез проводили в ТАЕ-буфері (40 мМ TRIS-НСl, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ ЕДТА) на приладі для горизонтального електрофорезу «Scie-Plus» у режимі 100 В упродовж двох годин з використанням 100 пар нуклеотидів (п. н.) ДНК-маркера (Fermentas). Результати фіксували фотографуванням в ультрафіолетовому випромінюванні на транслюмінаторі UVТ1 «Віокот». Аналіз електрофореграм проводили за допомогою програмного забезпечення TotalLab TL120 v2008.01.

Виділення ДНК з гелю здійснювали за допомогою набору Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas) відповідно з протоколом виробника. Ампліфіковані фрагменти досліджували на автоматичному ДНК-секвенаторі Genetic Analy-

ser 3130 (Applied Biosystems) з використанням набору для секвенування BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Аналіз послідовностей нуклеотидів проводили за допомогою алгоритмів ClustalW в програмному забезпеченні MEGA 5.2 та BLASTN.

**Результати та їх обговорення.** При проведенні мікробіологічних досліджень з організмів клінічно здорової та хворої на флавобактеріоз райдужної форелі *O. mykiss* нами виділено 9 штамів бактерій роду *Flavobacterium*. На МПА флавобактерії формували яскраво-жовті колонії різної морфології. При фарбуванні за Грамом усі виділені флавобактерії були грамнегативними. Клітини мали паличковидну форму із загостреними кінцями.

Як показали результати досліджень, обрані олігонуклеотидні праймери, специфічні до бактерій *F. columnarum*, ампліфікували очікуваний за розміром фрагмент ДНК. Розмір ампліконів становив близько 200 пар нуклеотидів (п. н.) (рис. 1). Олігонуклеотиди, специфічні до *F. columnarum* підбиралися для ампліфікації фрагменту гена 16S рРНК. Як виявилось, чотири з дев'яти виділених штамів флавобактерій відносилися до *F. columnarum*, про що свідчить специфічна ампліфікація в ПЛР (рис. 1). Дані зразки були відібрані від хворої риби з ознаками флавобактеріозу, а саме у вигляді колумнарної хвороби. Зябра інфікованої риби, з якої відбирали зразки для мікробіологічних посівів, характеризувалися некротичними запаленнями. Специфічність ампліфікації була перевірена за допомогою нуклеотидного аналізу продуктів ПЛР. Результати сіквенсу показали, що ампліфікований фрагмент відповідав ділянці гена 16S рРНК бактерії *F. columnarum*.

Використовуючи напівгніздову ПЛР, нам не вдалося діагностувати бактерії *F. psychrophylum*. З огляду на те, що симптоми флавобактеріозу вказували на інфекцію, спричинену *F. columnarum*, жоден із зразків, включно клінічно-здорові риби, не виявився враженим бактеріями *F. psychrophylum*. Цікаво відмітити, що *F. psychrophylum* часто діагнос-

тується і в безсимптомній риби, що свідчить про циркуляцію збудника в організмі риби [20].

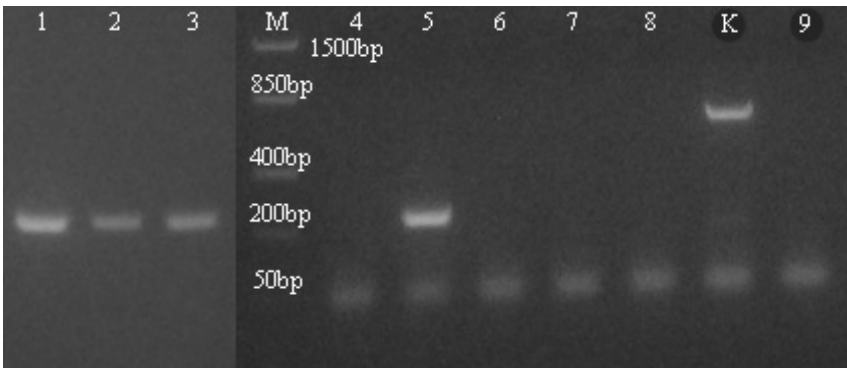


Рис. 1. Ампліфікація фрагменту гена 16S рРНК бактерій *F. columnarae*: 1–9 — зразки флавобактерій, виділених від райдужної форелі *O. mykiss*; К — контроль (ампліфікація фрагменту гена  $\beta$ -актину райдужної форелі); М — ДНК-маркер (*FastRuler Low Range DNA Ladder*).

Для встановлення видової належності інших виділених штамів флавобактерій використовували метод ПЛР-ПДРФ. Після ампліфікації фрагментів гена 16S рРНК (рис. 2), ПЛР продукти піддавали рестрикційному аналізу. Аналіз нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК флавобактерій показав, що за допомогою двох ендонуклеаз рестрикції *Hind*III та *Bam*HI існує можливість ідентифікувати бактерії *F. psychrophylum*, *F. branchiophilum* та *F. columnarae*. Послідовність гена 16S рРНК *F. psychrophylum* не містить сайтів рестрикції для *Hind*III та *Bam*HI, а от ген 16S рРНК *F. branchiophilum*, навпаки, гідролізується обома ферментами. У нуклеотидній послідовності гена 16S рРНК *F. columnarae* є сайт тільки для *Bam*HI.

Результати досліджень свідчать про те, що в нуклеотидній послідовності ампліконів повнорозмірного гена 16S рРНК виділених нами *F. columnarae* містилися сайти для рестриктази *Bam*HI. Амплікони гена 16S рРНК ще чотирьох

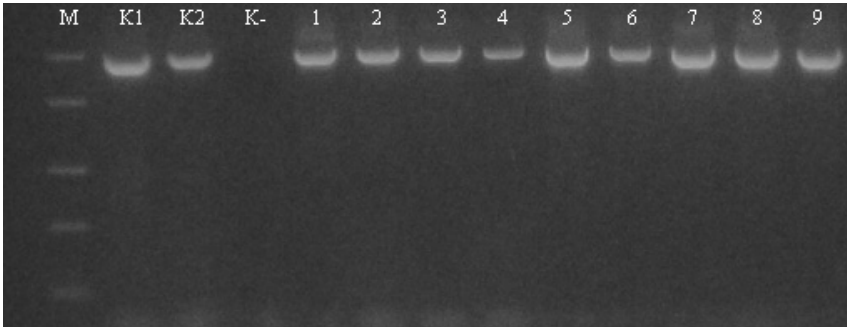


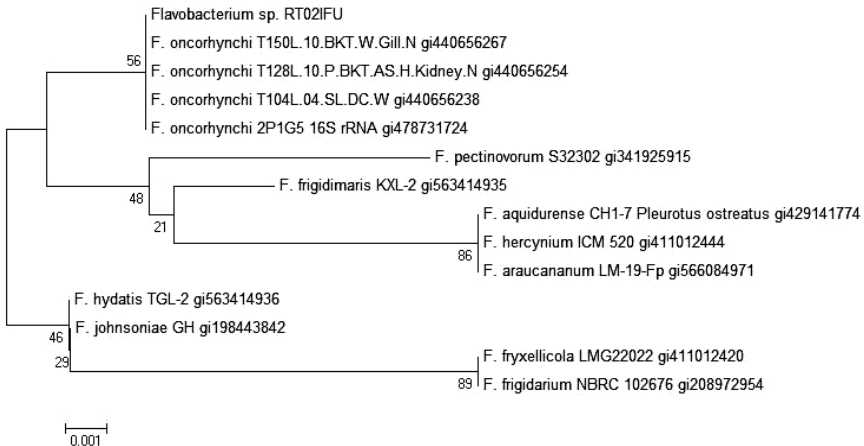
Рис. 2. Ампліфікація повнорозмірного гену 16S рРНК флавобактерій, виділених від райдужної форелі *O. mykiss*: 1–9 — зразки флавобактерій; K1 і K2 — позитивний контроль (ДНК бактерій *Aeromonas hydrophila* та *Yersinia ruckeri* відповідно); K- — контроль (всі компоненти реакції, окрім ДНК); M — ДНК-маркер (Fast-Ruler Low Range DNA Ladder).

штамів виділених флавобактерій також гідролізувалися рестриктазою *Vam*HI. Місце сайту рестрикції та розмір продуктів були ідентичними для всіх штамів *F. columnarae* та *Flavobacterium sp.* (табл. 1). Слід відмітити, що у більшості флавобактерій, як і в інших бактерій ген 16S рРНК дуже консервативний, а його ідентичність становить близько 99 %. Тож недоліком цього методу є те, що за його допомогою неможливо ідентифікувати інші види роду *Flavobacterium*, які містять тільки сайт рестрикції *Vam*HI. Як показав аналіз послідовності гену 16S рРНК представників роду *Flavobacterium*, до такої групи, окрім *F. columnarae*, належать й інші умовно-патогенні флавобактерії — *F. johnsoniae*, *F. aquatile*, *F. hydatitis* та *F. succinicans*. Лише один амплікон гена 16S рРНК досліджуваних флавобактерій містив сайт рестрикції *Hind*III (табл. 1). Дослідження нуклеотидної послідовності цього фрагменту ДНК показало, що даний штам *Flavobacterium sp.* RT021FU належить до виду *Flavobacterium oncorhynchi* (рис. 3). За літературними даними бактерії *F. oncorhynchi* є представниками нормофлори райдужної форелі *O. mykiss* [16].



**Таблиця 1. Рестрикційний аналіз гену 16S рРНК флавобактерій, виділених від райдужної форелі *O. mykiss*.**

№№ штамів	Види <i>Flavobacterium</i>	<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III
1	<i>F. columnare</i>	+	
2	<i>F. columnare</i>	+	
3	<i>F. columnare</i>	+	
4	<i>F. columnare</i>	+	
5	<i>F. oncorhynchi</i>		+
6	<i>Flavobacterium sp.</i>	+	
7	<i>Flavobacterium sp.</i>	+	
8	<i>Flavobacterium sp.</i>	+	
9	<i>Flavobacterium sp.</i>	+	



**Рис. 3. Філогенетичний аналіз гену 16S рРНК бактерії *Flavobacterium sp.* штам RT021FU, ізольованої від райдужної форелі *O. mykiss*. Дерево будувалося за допомогою алгоритму Neighbor-joining у програмі MEGA версії 5.2.**

Незважаючи на важливість флавобактеріозу для сучасного рибництва та багатогранні дослідження його збудників, лише невелика частка даних про взаємодію патоген-господар зустрічається в літературі. Досі не вирішеними залишаються

питання колонізації флавобактеріями шкіри і зябер, утворення некротичних виразок та спричинення високої смертності риби. Натомість методи діагностики цього захворювання швидко прогресують і ідентифікація збудника за наявності лише декількох мікробних клітин сьогодні цілком можлива. Поруч з діагностикою гостро виникає питання визначення вірулентності штамів флавобактерій. У вирішенні цієї проблеми може допомогти аналіз нуклеотидної послідовності генів бактерій роду *Flavobacterium*. Тільки за наявності послідовностей ДНК флавобактерій, їх генів, що відповідають за вірулентність, остаточно стане можливим вивчення патогенезу захворювання. Такі дослідження наразі проводяться, але їх ефективність збільшиться з розширенням співпраці референс-лабораторій [10].

З огляду на все більш поширене явище резистентності до антибіотиків, основним напрямом боротьби з флавобактеріозом має бути попередження захворювання і профілактика. Першими кроками в цьому є суворе виконання правил ведення аквакультури, а саме дотримання санітарно-епідеміологічних норм, щільності посадки риби та якості води. Вакцини, хіміотерапія та пробіотики — також багатообіцяючі напрями профілактики даного захворювання. Перспективним є культивування видів риб, стійких до флавобактеріозу. Інформація про патогенез флавобактерій дозволить розробляти нові методи боротьби з цим захворюванням, які будуть економічно вигідні та безпечні як для навколишнього середовища, так і для об'єктів аквакультури.

Таким чином, у результаті проведених досліджень виділено дев'ять штамів флавобактерій від клінічно здорової та хворої на флавобактеріоз райдужної форелі *O. mykiss*. Використовуючи розроблений метод експрес діагностики на основі ПЛР, ідентифіковано чотири штами *F. columnarae*. Специфічність ампліфікації перевірена за допомогою методу дослідження нуклеотидної послідовності ампліфікованих продуктів, а також методом рестрикційного аналізу фрагментів гену 16S рРНК. Отримані результати свідчать, що розробле-

ний метод ПЛР може бути використаний для експрес діагностики різних форм флавобактеріозу риб в рибогосподарських підприємствах України. Також, завдяки рестрикційному аналізу та секвенсу, виявлено штам бактерій *F. oncorhynchi*, який є представником нормофлори райдужної форелі *O. mykiss*. Використовуючи специфічні праймери, нам не вдалось ідентифікувати інших збудників флавобактеріозу, таких як *F. psychrophylum* та *F. branchiophilum*. Для їхньої діагностики слід розширити географію природних водойм та рибогосподарських підприємств, що буде предметом наших подальших досліджень.

1. Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium* *hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978) / [J. F. Bernardet, P. Segers, M. Vancanneyt et al.] // Int. J. syst. bacteriol. — 1996. — Vol. 46. — P. 128–148.

2. Bernardet J. F. The genus *Flavobacterium* / J. F. Bernardet, J. P. Bowman // The prokaryotes : a handbook on the biology of bacteria / [Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E. et al.] (eds.). — Vol. 7, 3<sup>rd</sup> ed. — New York : Springer-Verlag, 2006. — P. 481–531.

3. Antigenic characterization of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* / E. M. Crump, M. B. Perry, S. C. Clouthier, W. W. Kay // Appl. environ. microbiol. — 2001. — Vol. 67. — P. 750–759.

4. Chronic plasma cell osteomyelitis of the humerus associated with *Shigella* and *Flavobacterium* / L. Kang, P. J. Millett, K. Mezera, A. J. Weiland // J. shoulder elbow surg. — 2001. — Vol. 10. — P. 292–294.

5. *Flavobacterium* spp. organisms as opportunistic bacterial pathogens during advanced HIV disease / [R. Manfredi, A. Nanetti, M. Ferri et al.] // J. infect. — 1999. — Vol. 39. — P. 146–152.

6. Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* recovered from commercially raised rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and spawning coho salmon, *O. kisutch* (Walbaum) / [Y. C. Chen, M. A. Davis, S. E. Lapatra et al.] // J. fish dis. — 2008. — Vol. 31. — P. 765–773.

7. Identification of *Flavobacterium columnare* by a species-specific polymerase chain reaction and renaming of ATCC43622 strain to *Flavobacterium johnsoniae* / A. M. Darwish, A. A. Ismaiel, J. C. Newton, J. Tang // Mol. cell. probes. — 2004. — Vol. 18. — P. 421–427.

8. Del Cerro A. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Spain / A. Del Cerro, I. Marquez, J. M. Prieto // J. fish dis. — 2010. — Vol. 33. — P. 285–291.

9. Boyacioglu M. Isolation of *Flavobacterium psychrophilum* causing rainbow trout fry syndrome and determination of an effective antibacterial treatment in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry / M. Boyacioglu, F. Akar // Kafkas. univ. vet. fak. derg. — 2012. — Vol. 18, № 2. — P. 197–203.

10. Barnes M. E. A review of *Flavobacterium psychrophilum* biology, clinical signs, and bacterial cold water disease prevention and treatment / M. E. Barnes, M. L. Brown // The open fish science journal. — 2011. — Vol. 4. — P. 1–9.

11. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil / [H. C. P. Figueiredo, P. H. Klesius, C. R. Arias et al.] // J. fish dis. — 2005. — Vol. 28. — P. 199–204.

12. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions / [A. M. Declercq, F. Haesebrouck, W. V. Broeck et al.] // Veterinary research. — 2013. — Vol. 44, № 27. — P. 1–17.

13. Hawke J. P. Systemic isolation and antimicrobial susceptibility of *Cytophaga columnaris* from commercially reared channel catfish / J. P. Hawke, R. L. Thune // J. aquat. anim. health. — 1992. — Vol. 4. — P. 109–113.

14. Virulence of *Flavobacterium branchiophilum* in experimentally infected salmonids / V. E. Ostland, D. D. MacPhee, J. S. Lumsden, H. W. Ferguson // Journal of fish diseases. — 1995. — Vol. 18, № 3. — P. 249–262.

15. Flemming L. Phenotypic and molecular characterisation of fish-borne *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates from aquaculture systems in South Africa / L. Flemming, D. Rawlings, H. Chenia // Res. microbiol. — 2007. — Vol. 158. — P. 18–30.

16. *Flavobacterium oncorhynchi* sp. nov., a new species isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / [L. Zamora, J. F. Fernan-

dez-Garayzabal, L. A. Svensson-Stadler et al.] // Systematic and applied microbiology. — 2012. — Vol. 35. — P. 86–91.

17. Лабораторный практикум по болезням рыб / [В. А. Мусселиус, В. Ф. Ванятинский, А. А. Вихман и др.]. — М. : Легкая и пищевая пром-сть, 1983. — 296 с.

18. Sambrook J. Molecular cloning : a laboratory manual ; 3<sup>rd</sup> ed. / J. Sambrook, D. W. Russell. — New York : Cold Spring Harbour, 2001.

19. Рудь Ю. П. Ідентифікація грамнегативних бактерій у риби методом ПЛР-ПДРФ гену 16S рРНК / Ю. П. Рудь // Рибогосподарська наука України. — 2013. — № 1. — С. 80–86.

20. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by PCR amplification / T. Wiklund, L. Madsen, M. S. Bruun, I. Dalsgaard // J. appl. microbiol. — 2000. — Vol. 88. — P. 299–307.

## **ЭКСПРЕСС ДИАГНОСТИКА ФЛАВОБАКТЕРИОЗА РЫБ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

**Ю. П. Рудь**

Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев

*Разработан метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для идентификации флавобактериоза рыб. Показаны специфичность и эффективность подобранных олигонуклеотидных праймеров. От клинически здоровой и больной на флавобактериоз радужной форели выделено девять штаммов флавобактерий. С помощью разработанного метода идентифицирован штамм *Flavobacterium columnare* и путем филлогенетического анализа установлено родство выделенного штамма с другими представителями рода *Flavobacterium*. Других возбудителей флавобактериоза, таких как *F. psychrophilum* и *F. branchiophilum* не обнаружено. Показанная возможность видовой идентификации флавобактерий методом рестрикционного анализа гена 16S рРНК. разрабо-*

*танний метод ПЦР может быть использован для экспресс-диагностики разных форм флавобактериоза рыб в рыбохозяйственных предприятиях Украины.*

Ключевые слова: *флавобактериоз, радужная форель, ПЦР.*

## **RAPID DIAGNOSTIC OF FISH FLAVOBACTERIOSIS USING POLYMERASE CHAIN REACTION**

**Yu. P. Rud**

Institute of Fisheries, NAAS, Kyiv

*The method of rapid identification of fish flavobacteriosis by means of polymerase chain reaction (PCR) was developed. The specificity and the efficiency of selected oligonucleotide primers were shown. The bacteriological studies of clinically healthy and infected with flavobacteriosis rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) had revealed nine strains of *Flavobacterium* genera. Using developed method the strains of *Flavobacterium columnare* were identified. Their phylogenetic analysis had showed the relatedness of isolated strains to the *Flavobacterium* species. Neither *F. psychrophylum* or *F. branchiophilum* strains were found in the investigated samples. The possibility of species identification using the RFLP analysis of 16S rRNA gene was shown. The developed PCR method can be used for rapid identification of fish flavobacteriosis in fish-farms in Ukraine.*

Key words: *flavobacteriosis, rainbow trout, PCR.*