

УДК 597-12:576.85.08

© 2017

Ю.П. Рудь,

Л.П. Драган,

П.К. Цапенко,

кандидати біологічних наук

І.І. Грициняк,

академік НААН,  
доктор сільсько-  
господарських наукІнститут рибного  
господарства НААН

Л.П. Буцацький,

доктор біологічних наук

Київський  
національний університет  
імені Тараса Шевченка

## МОЛЕКУЛЯРНА ДІАГНОСТИКА ПАТОГЕННИХ ТА УМОВНО- ПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ В ПОПУЛЯЦІЯХ ЦІННИХ ВИДІВ РИБ

**Мета.** Вивчити молекулярно-біологічні особливості збудників інфекційних захворювань риб бактеріальної етіології.

**Методи.** Мікробіологічні, молекулярно-біологічні, іхтіологічні. **Результати.** Проведено комплексний аналіз, визначено ряд умовно-патогенних і патогенних бактерій в популяціях райдужної форелі, стерляді, сома європейського та коропа звичайного, що вирощують в Україні. Проведено аналіз гена 16S рРНК виділених бактерій.

**Висновки.** Розроблено методи ідентифікації умовно-патогенних і патогенних бактерій на основі полімеразної ланцюгової реакції.

**Ключові слова:** молекулярна діагностика, полімеразна ланцюгова реакція, бактеріальні хвороби риб.

За даними Міжнародного Епізоотичного Бюро (ОІЕ), інфекційні захворювання об'єктів світової аквакультури призводять до щорічних збитків у розмірі 10–15% від загальної вартості виробленої продукції. Тому діагностика збудників інфекційних хвороб риб є актуальним питанням сучасної аквакультури і може гарантувати не тільки ефективну профілактику, а й успіхи в лікуванні інфекційних захворювань об'єктів аквакультури [1].

Використання ДНК-технологій, спрямованих на безпосереднє виявлення генетичного матеріалу збудників хвороб різної етіології, поступово витісняє трудомісткі культуральні, серологічні та гістологічні методи діагностики. Такі інфекційні захворювання риб, як фурункулез (*Aeromonas salmonicida*), хвороба «червоного рота» лососевих (*Yersinia ruckeri*), бактеріальна геморагічна септицемія (*Aeromonas hydrophila*), бактеріальна хвороба нирок (*Renibacterium salmoninarum*), колумнарна хвороба (*Flavobacterium columnare*), бактеріальна септицемія сома (*Edwardsiella*

*ictaluri*), псевдомоноз *Pseudomonas* sp. та хвороба «холодної води» (BCWD) (*Flavobacterium psychrophila*) дуже поширені в усьому світі і призводять до значних економічних збитків у рибному господарстві [2]. Тому виявлення хвороботворних мікроорганізмів у популяціях об'єктів рибництва — це важливий крок до запобігання інфекційним захворюванням [3].

Традиційно діагностику бактеріальних захворювань проводять за допомогою бактеріологічних посівів на щільні поживні середовища з наступною ідентифікацією фенотипових або серологічних властивостей досліджуваних штамів. Проте ці методи є трудомісткими та низькочутливими, до того ж вони потребують обов'язкового попереднього виділення патогена. Використання методів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та рестрикційного аналізу ампліфікованих продуктів (поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів, ПДРФ) гена 16S рРНК бактерій дає змогу ідентифікувати ці мікроорганізми до роду, а в деяких випадках і до виду. До того ж такий різновид

методу ПЛР-ПДРФ зменшує витрати на реагенти для реакцій та скорочує час на ідентифікацію кожного збудника [4].

**Мета досліджень** — вивчити молекулярно-біологічні особливості та філогенетичну спорідненість збудників інфекційних захворювань риб бактеріальної етіології та на основі отриманої генетичної інформації розробити методи для їх експрес-ідентифікації.

**Матеріали та методи.** Дослідження умовно-патогенних і патогенних бактерій проводили в популяціях райдужної форелі (Чернівецька обл.), стерляді (Київська обл.), сома європейського (Дніпропетровська обл.) та коропа звичайного (Донецька обл.), що вирощують в Україні. Первинний посів мікроорганізмів з патологічного матеріалу здійснювали на поживне середовище МПА. Для бактеріологічного аналізу використано черевну порожнину піддослідних риб. Дослідження морфології колоній та клітин, а також виділення чистої культури проведено за загальноприйнятими методиками [5].

Для проведення молекулярно-біологічних досліджень було виділено ДНК зі зразків, узятих безпосередньо від об'єктів досліджень. Також виділено ДНК з бактеріальних суспензій, отриманих від окремих колоній чистих культур. Для цього використано комерційний набір GeneJet DNA Purification Kit (ThermoScientific). ДНК розчиняли у деіонізованій воді, вільній від нуклеаз [6].

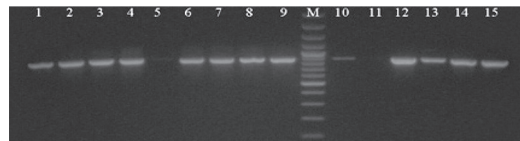
Для розробки праймерів, визначення їхньої специфічності та фізичних властивостей використано комп'ютерну програму Vector NTI 11. Крім того, специфічність праймерів перевіряли за допомогою онлайн-сервісу BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Ампліфікацію проведено на термощиклері 96 Universal Gradient PEQ STAR (PEQLAB, Німеччина). Результати електрофорезу спостерігали під ультрафіолетовим транслюмінатором [7]. Під час проведення рестрикційного аналізу використано ендонуклеази рестрикції *AvaI*, *VamHI*, *EcoRI*, *PstI*, *SmaI* та ін.

Виділення ДНК з гелю здійснено за допомогою набору Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas) відповідно до протоколу виробника. Нуклеотидні послідовності ДНК досліджено на автоматичному ДНК-секвенаторі «Genetic Analyser 3130»

(«Applied Biosystems», США) з використанням набору для секвенування («BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit»). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей ДНК проведено за допомогою алгоритмів ClustalW у програмному забезпеченні MEGA версії 6.0 та BLASTN. Для порівняння ДНК-послідовностей патогенних та умовно-патогенних бактерій використано інформацію з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації (NCBI, США).

**Результати досліджень.** З метою уникнення надлишкового мікробіологічного навантаження в експерименті ми не проводили бактеріологічні посіви зі шкіри та зябер, оскільки мікробіота з цих поверхонь здебільшого залежить від мікробіоти води. Відсутність патогенних та умовно-патогенних бактерій в черевній порожнині — ознака цілісності гомеостазу та клінічно здорової риби. За результатами мікробіологічних досліджень, зі зразків внутрішніх органів клінічно здорових і хворих видів райдужної форелі, стерляді, сома європейського та коропа звичайного було виділено на щільних поживних середовищах 26 штамів мікроорганізмів. Після проведення первинних посівів, виділення чистих культур і мікроскопічного аналізу виділені штами бактерій класифіковано до 4-х родів та 1-ї родини. Ще 7 видів бактерій зараховано до групи некласифікованих, оскільки морфологічні та фенотипові ознаки не давали чіткості в їхній ідентифікації. Отже, на підставі бактеріології ідентифіковано представників родів *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio* та родини *Enterobacteriaceae*.

У результаті молекулярно-біологічних



**Ампліфікація фрагментів гена 16S rDNA бактерій, виділених з:** 1–4 — черевної порожнини коропа (*Cyprinus carpio*); 5–8 — стерляді (*Acipenser ruthenus*); 9–11 — сома європейського (*Silurus glanis*); 12–15 — райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*); M — ДНК-маркера 100 п.н. (ThermoScientific)

досліджень підібрано олігонуклеотидні праймери, специфічні до фрагмента гена 16S рРНК. Для ампліфікації були обрані всі штами виділених патогенних та умовно-патогенних бактерій, які упродовж усього експерименту культивували в чистій культурі. Продукти ампліфікації, як і очікувалося, становили близько 950 п.н. (рисунок).

Електрофореграми гідролізів продуктів ПЛР фрагментів гена 16S рРНК виділених бактерій свідчать про відмінність у кількості фрагментів рестрикції для 9-ти видів бактерій та групи бактерій з родини *Enterobacteriaceae*. Так, для групи ентеробактерій в ампліфікованому фрагменті гена 16S рРНК виявлено сайти для рестриктаз *AvaI*, *EcoRI* та *SmaI*. Для іншого представника родини *Enterobacteriaceae* бактерії *Yersinia sp.* були характерні 2 сайти для рестриктази *EcoRI*. Отже, в результаті аналізу рестрикційних фрагментів виявлено представників родини *Enterobacteriaceae*, а саме: *Citrobacter freundii* (короп), *Edwardsiella ictaluri* і *E. tarda* (сом) та *Yersinia sp.* (форель). Останнім часом кількість ентеробактерій, які виділяються з клінічно хворих риб, постійно зростає. Основною причиною цього явища є

забруднення водою. З огляду на значний рівень мінливості фенотипових ознак ентеробактерій та їх резистентності до антибіотиків, цей вид умовно-патогенних бактерій характеризується високою інфекційністю та вірулентністю для багатьох видів риб.

У бактерій роду *Aeromonas* були наявні сайти для рестриктаз *AvaI*, *EcoRI*, *PstI* та *SmaI*. Слід зазначити, що всі представники роду *Aeromonas* є патогенними та умовно-патогенними для риб видами бактерій. Так, *Aeromonas caviae* спричиняє інфекційне захворювання у стерляді, *A. hydrophila* є причиною бактеріальної септицемії коропа та стерляді, а бактерії *A. salmonicida* є збудниками фурункульозу у лососевих видів риб. Для їх швидкої видової ідентифікації слід використовувати додатковий набір рестриктаз або специфічні олігонуклеотидні праймери. Також ці види бактерій можна діагностувати, використовуючи класичні бактеріологічні та біохімічні методи, але це довготривалі методики.

Бактерії *Shewanella sp.* ідентифіковано завдяки сайтам рестриктаз *AvaI* і *PstI* та *AvaI* і *EcoRI* відповідно (таблиця). У збудника псевдомонозу коропа, бактерії *P. fluorescens*, спостерігали сайти рестрикції для *AvaI*

**Сайти рестрикції фрагментів гена 16S рРНК патогенних та умовно-патогенних бактерій в популяціях коропа (*Syrpinus carpio*), стерляді (*Acipenser ruthenus*), райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) та сома європейського (*Silurus glanis*)**

| Мікроорганізм                   | Сайти рестрикції гена 16S рРНК                                       | Вид риби         |
|---------------------------------|--|------------------|
| <i>Aeromonas caviae</i>         | <i>SmaI</i> (328–333), <i>EcoRI</i> (390–395), <i>PstI</i> (724–729) | Стерлядь         |
| <i>A. hydrophila</i>            | <i>SmaI</i> (328–333), <i>EcoRI</i> (390–395), <i>PstI</i> (724–729) | Короп, стерлядь  |
| <i>A. salmonicida</i>           | <i>SmaI</i> (328–333), <i>EcoRI</i> (390–395), <i>PstI</i> (724–729) | Форель           |
| <i>Citrobacter freundii</i>     | <i>SmaI</i> (328–333), <i>EcoRI</i> (390–395)                        | Короп            |
| <i>Edwardsiella ictaluri</i>    | <i>SmaI</i> (328–333), <i>EcoRI</i> (390–395)                        | Сом європейський |
| <i>E. tarda</i>                 | <i>SmaI</i> (328–333), <i>EcoRI</i> (390–395)                        | » »              |
| <i>Flavobacterium columnare</i> | <i>BamHI</i> (64–69)   | Форель           |
| <i>F. psychrophilum</i>         | Відсутні   | »                |
| <i>Flexibacter sp.</i>          | <i>HindIII</i> (171–176)   | »                |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>  | <i>SmaI</i> (328–333), <i>AvaI</i> (327–332)                         | Короп            |
| <i>Shewanella sp.</i>           | <i>AvaI</i> (328–333), <i>EcoRI</i> (390–395)                        | Стерлядь         |
| <i>Vibrio salmonicida</i>       | <i>SmaI</i> (327–332), <i>EcoRI</i> (719–724)                        | Форель           |
| <i>Yersinia sp.</i>             | <i>EcoRI</i> (390–395, 719–724)                                      | »                |

Примітки: Специфічність праймерів і послідовність генів 16S рРНК бактерій перевіряли за допомогою онлайн-сервісу BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)); під час створення дегенеративних праймерів звертали увагу на 3'-кінець.

та *SmaI*. Представник роду *Vibrionaceae* бактерія *Vibrio salmonicida* містила у фрагментів гена 16S рРНК сайти рестрикції *EcoRI* та *SmaI*.

Для діагностики флавобактерій, патогенних мікроорганізмів для лососевих, використано всього один фермент. На відміну від інших груп бактерій флавобактерії містять лише сайт рестрикції *BamHI*, характерний саме для бактерії *Flavobacterium columnare*. У іншого представника роду бактерії *F. psychrophilum* сайтів рестрикції у фрагменті гена 16S рРНК взагалі немає. Ще один представник умовно-патогенної флори лососевих — бактерія *Flexibacter sp.*, яка раніше належала до роду *Flavobacterium*, характеризувалась унікальним сайтом *HindIII* та легко ідентифікувалася з-серед усіх інших досліджуваних видів бактерій (див. таблицю).

Так, виявлення та ідентифікація збудників бактеріальних і вірусних хвороб риб можуть бути прискорені від кількох днів до одного робочого дня, коли тестуватимуться безпосередньо клінічні зразки. Інші збудники інфекційних захворювань, які важко або неможливо ідентифікувати за допомогою культуральних методів, часто залишаються непоміченими, тому застосування ПЛР — єдина альтернатива, щоб їх виявити у патологічному матеріалі [8].

Результати проведених досліджень свідчать, що універсальні олігонуклеотидні

праймери, специфічні до гена 16S рРНК бактерій, ампліфікують фрагмент ДНК. Використовуючи цей фрагмент гена 16S рРНК, за допомогою ендонуклеаз рестрикції *AvaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *PstI* та *SmaI* можна ідентифікувати бактерії до роду або навіть виду.

Захист об'єктів аквакультури від бактеріальних інфекцій є актуальною проблемою в сучасному рибництві [9]. Незважаючи на певні успіхи, досягнуті останніми роками під час розроблення заходів профілактики та лікування інфекційних хвороб риб, бактеріальні захворювання залишаються досить поширеними і наносять значні економічні збитки рибницьким господарствам [10].

Патогенні бактерії — це економічно важливі інфекційні агенти, що спричиняють високу смертність у риб в умовах аквакультури. Попри високу значимість цих патогенів, нині недостатньо інформації про механізми патологічного процесу, передачу, ворота інфекції, поширення по організму, чинники вірулентності та імунної відповіді хазяїна. Для ефективної боротьби з цими захворюваннями потрібно більше експериментальних даних щодо імуногенності збудників. Тому заходи профілактики та попередження захворювання, до яких належить експрес-діагностика, є єдиним доступним та ефективним способом боротьби з бактеріальними інфекціями в умовах сучасної аквакультури.

## Висновки

У райдужної форелі ідентифіковано групи бактерій з родини *Enterobacteriaceae*, бактерії з роду *Flavobacterium*, бактерію *Yersinia sp.*, збудника вібріозу — бактерію *Vibrio salmonicida*, аеромонади *Aeromonas sp.*, що свідчить про значне бактеріальне навантаження та ризик інфекційного захворювання, спричинене умовно-патогенними та патогенними бактеріями. У стерляді ідентифіковано аеромонади *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, *Shewanella sp.* та встановлено, що найнебезпечнішим бактеріальним захворюванням в осетровій аквакультурі може бути бактеріальна септицемія, що спричиняється бактерією

*A. hydrophila*. У коропа ідентифіковано аеромонади *A. hydrophila*, *A. sobria*, які є найнебезпечнішими збудниками і можуть призводити до значних втрат в умовах аквакультури, а також бактерії *P. fluorescens* та *Acinetobacter sp.* Отже, розроблено та апробовано комплексний метод ПЛР-ПДРФ гена 16S рРНК для ідентифікації найпоширеніших бактерій — збудників інфекційних захворювань риб. Запропонований метод є точнішим, легким у використанні та економічним порівняно з традиційними бактеріологічними дослідженнями і дає змогу ідентифікувати бактеріальні патогени упродовж одного дня.

## Бібліографія

1. *Woo P.T.K.* Fish Diseases and Disorders. — V. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections/P.T.K. Woo, D.W. Bruno. — CABI, 2011. — 944 p.
2. *Cunningam C.O.* Molecular diagnosis of fish and shellfish disease: present status and potential use in disease control/C.O. Cunningham//Aquaculture. — 2002. — V. 206. — P. 19–55.
3. *Сучасні методи молекулярної діагностики захворювань риб (огляд)/О.В. Залоїло, Ю.П. Рудь, І.А. Залоїло, І.І. Грициняк//Рибогосподарська наука України. — 2016. — № 2. — С. 48–64.*
4. *Altinok I.* Molecular diagnosis of fish diseases: a review/I. Altinok, I. Kurt//Turkish J. of Fisheries and Aquatic Sciences. — 2003. — V. 3. — P. 131–138.
5. *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.*
6. *Sambrook J.F.* Molecular cloning: a laboratory manual/J.F. Sambrook, D.W. Russell. — 3rd ed. — New York: Cold Spring Harbour, 2001. — 2100 p.
7. *McPherson M.J.* PCR. The basics: from background to bench/M.J. McPherson, S.G. Moller. — New York: BIOS Scientific Publishers Ltd, 2000. — 276 p.
8. *Mata A.I.* Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish/A.I. Mata, A. Gibello, A. Casamayor//App. Environ. Microbiol. — 2004. — V. 70. — P. 3183–3187.
9. *Рудь Ю.П.* Молекулярне визначення інфекційних захворювань риб/Ю.П. Рудь, Л.П. Бучацький//Тваринництво України. — 2016. — № 4–5. — С. 28–31.
10. *Вовк Н.І.* Іхтіопатологічні дослідження — важлива складова біомоніторингу водойм/Н.І. Вовк//Рибогосподарська наука України. — 2009. — № 3. — С. 106–109.

Надійшла 15.05.2017.

### ВИПРАВЛЕННЯ

З технічних причин у статті **Г.В. Спаського, М.М. Русняка «Інвестиційне забезпечення розвитку аграрних підприємств Закарпаття»**, що вийшла друком у журналі «Вісник аграрної науки» № 9 за 2017 р., на сторінках 2, 63, 82 та 88 було допущено помилку у написанні прізвища автора (М.М. Руснак).

Правильне написання прізвища — М.М. Русняк.