

На даному рисунку 2 відображено, що виділення культур було максимальним у травні – 23,5 %, березні – 20,5 %, жовтні – 17,6 %, що можливо пов'язане із більш сприятливими температурними умовами. За підсумками проведеної роботи можна зробити наступні висновки.

Висновки. 1. За період роботи виділено 34 культури мікроорганізмів роду *Aeromonas*, які є постійними мешканцями прісних водоймищ і спричиняють захворювання риб, відомі як аеромоноз (краснуха, геморагічна септицемія). Ізоляція *Aeromonas spp.* в морській воді і гідробіонтах може свідчити про екологічне неблагополуччя цих екосистем.

2. Аналізуючи динаміку ізоляції культур аеромонад по роках, можна відзначити, що максимальна кількість культур була в 2007-2008 рр. Виділення аеромонад з різних джерел свідчить про те, що проведення бактеріологічного моніторингу морських і прісноводних гідробіонтів є актуальним.

Список літератури

1. О.Н. Давыдов, Ю.Д. Темниханов. Болезни пресноводных рыб./Киев, 2004.-С.73-82.
2. Иктиопатология. Учебник под ред. Н.А. Головиной, О.Н. Брауэра /М. «Мир», 2007.- С.3, 132-137, 139, 143.
3. М.Г. Наконечна, Н.Г. Сорокіна та ін. Вивчення впливу інфекційних хвороб прісноводних риб на якість і безпеку рибної продукції / Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний науковий збірник, випуск 85, Харків.- 2005. – С. 811-815.

THE DYNAMICS OF ISOLATION OF PATHOGENS AEROMONAS GENUS FROM AQUATIC ORGANISMS AND WATER OF MARINE WATERS AND FRESH WATERS OF CRIMEA

Gurina L. M.

National scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary medicine", Kharkiv

The article contains data of bacteriological monitoring and species composition of microorganisms of genus *Aeromonas* from the main commercial marine and freshwater fish and other aquatic organisms, widely-spread in the fresh waters of Crimea and in the Azov and the Black Seas. Their role in the emergence of infectious diseases of fish has been studied. Samples of marine and fresh water, as well as the bottom deposits have been studied. The results of the seasonal dynamics of *Aeromonas* are presented.

УДК 619:639.3.091:616-076

ДІАГНОСТИКА АЕРОМОНОЗУ РИБ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Євтушенко А.В., Безкровна Н.В., Герілович А.П., Солодянкін О.С.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Важливе епізоотичне значення для аквакультури України мають інфекційні захворювання аеромонадної етіології – аеромоноз та фурункулез, які спричинені представниками родини *Aeromonadoceae* (*Vibrionaceae*), роду *Aeromonas*. Аеромоноз спричиняється патогенними штамми мікроорганізму *Aeromonas hydrophila* та характеризується запаленням шкіри, вогнищевими крововиливами, водяною, куйовдженням луски, екзофтальмією, гідратацією м'язів і внутрішніх органів. Фурункулез характеризується генералізованою септицемією, утворенням локальних ушкоджень (фурункулів, виразок), значними патологічними змінами у внутрішніх органах, швидким і коротким перебігом та супроводжується масовою загибеллю риб. Специфічним збудником фурункулезу є мікроорганізм *Aeromonas salmonicida* [1].

Діагностика захворювань проводиться комплексно, враховуючи епізоотологічні дані, клінічні ознаки, патологоанатомічні зміни, та засновується на результатах лабораторних досліджень. Для підтвердження етіології захворювання необхідно виділити збудника із організму риб, ідентифікувати його за культурально-морфологічними, антигенними та біологічними властивостями, відтворити захворювання в експерименті на рибках з подальшою реізоляцією збудника. Мікроорганізмам роду *Aeromonas* властива фенотипова гетерогенність, тому визначення видової належності виділених ізолятів є достатньо складним процесом. Помилка при постановці діагнозу стає причиною неправильного вибору комплексу лікувально-профілактичних заходів і, як наслідок, призводить до погіршення епізоотичної ситуації. На даний час проблема щодо розробки нових методів експрес-діагностики бактеріальних захворювань риб постає особливо гостро.

Основною перевагою ПЛР є можливість ідентифікації біологічних об'єктів з достовірністю до 99 %, внаслідок видової унікальності нуклеотидних послідовностей. В останні роки, у зв'язку з розвитком технологій секвенування ДНК та біотехнологій отримання рекомбінантної полімерази, ПЛР стала рутинним та широко розповсюдженим методом лабораторних досліджень [2, 3].

Для діагностики інфекцій аеромонадної етіології за допомогою ПЛР як мішень використовують специфічні локуси 16S рибосомної ДНК мікроорганізмів роду *Aeromonas*. Факторами вірулентності мікроорганізмів даного роду є пілі, гемаглютиніни, ліпополісахариди і протеїни зовнішньої мембрани, а також гемолизин, цитотоксин, ентеротоксин, еластаза, ліпаза, ацетілхолінестераза, які продукуються мікроорганізмами. За допомогою молекулярно-генетичних методів усі гени вірулентності *Aeromonas spp.* об'єднані в три групи – гени, що детермінують синтез аеролізину-гемолізину, гени, які детермінують синтез цитолітичних ентеротоксинів та гени, що детермінують синтез цитотонічних ентеротоксинів. Детекція детермінант вірулентності робить можливим диференціацію саме патогенних ізолятів *Aeromonas spp.* [4-7].

Метою нашої роботи було проведення детекції мікроорганізмів роду *Aeromonas* та диференціація патогенних ізолятів *Aeromonas spp.* на основі молекулярно-генетичних маркерів.

Матеріали і методи. Екстракцію сумарної ДНК з референтних штамів мікроорганізмів роду *Aeromonas* та музейних ізолятів проводили за розробленим нами протоколом із застосуванням розчину гуанідину тіоціонату.

Вибір оптимального протоколу ампліфікації здійснювали шляхом варіювання температури відпалу праймерів в межах (52-62) °C, концентрації іонів магнію, кількості циклів ампліфікації.

Результати ампліфікації візуалізували у 1,5 % агарозному гелі в ультрафіолетовому світлі.

Результати досліджень. У результаті ретельного аналізу значного масиву літературних даних для детекції загальнородової,

Розділ 3. Ветеринарна мікробіологія та вірусологія

для мікроорганізмів роду *Aeromonas*, ділянки гена ядерного рибосомального кластеру 16S були обрані праймери A16SF та A16SR, розраховані Wang (2003) (табл. 1) [8-9]. Фрагмент, що накопичується при проведенні реакції, має довжину 355 пар нуклеотидів.

Таблиця 1 – Послідовності специфічних олігонуклеотидів (праймерів) для ідентифікації представників роду *Aeromonas* за допомогою ПЛР

Маркерна послідовність	Послідовності олігонуклеотидів (праймерів), 5'3'
16S rRNA	GGGAGTGCCTTCGGGAATCAGA (A16SF) TCACCGCAACATTCTGATTG (A16SR)

Оптимальною температурою відпалу праймерів виявилась 55 °С. Підбір концентрацій іонів магнію у складі реакційної суміші для ампліфікації показав доцільність застосування 2,5 мМ/мл реакцію у вигляді магнію сульфату. За дослідженнями щодо підбору робочого об'єму реакції встановлено доцільність ампліфікації в об'ємі 20-30 мкл за умов вмісту праймерів на рівні 10-15 пМ/реакцію. Мінімальна кількість циклів ампліфікації, необхідна для виявлення генетичного матеріалу мікроорганізмів роду *Aeromonas* у досліджуваному зразку, становить 35. Оптимізована програма ампліфікації фрагментів ДНК представників роду *Aeromonas* із використанням праймерів A16SF і A16SR наведена у таблиці 2.

Таблиця 2 – Програма ампліфікації фрагментів ДНК представників роду *Aeromonas* із використанням праймерів A16SF і A16SR

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	95 °С	5 хв.	1
2	95 °С	45 сек.	40
	55 °С	45 сек.	
	72 °С	45 сек.	
3	72 °С	5 хв.	1
4	10 °С	Зберігання	

Результати проведеної ампліфікації ДНК мікроорганізмів роду *Aeromonas*, проведеної у відповідності за розробленим протоколом реакції, наведені на рисунку 1.

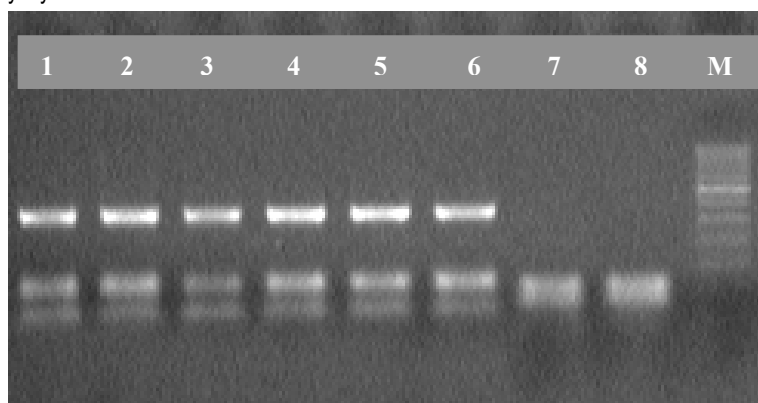


Рис. 1 Результати ампліфікації ДНК мікроорганізмів роду *Aeromonas* з використанням загальнородових праймерів A16SF та A16SR

1 – *Aeromonas hydrophila* K5-06; 2 – *Aeromonas hydrophila* T1C-767; 3 – *Aeromonas* sp.15-1; 4 – *Aeromonas salmonicida* A11; 5 – *Aeromonas sobria* 4S; 6 – *Aeromonas bestiarum* CECT 4227; 7 – *Aeromonas veronii* bt. *sobria* CECT 4246; 8 – деіонізована вода; M – маркер мол. маси 100 bp Ladder (Fermentas™, Латвія)

У результаті проведених досліджень семи проб ДНК, виділених з різних мікроорганізмів, які за біохімічними властивостями віднесені до роду *Aeromonas*, в шести пробах виявлено специфічні ДНК-продукти. Отримані результати свідчать про задовільну чутливість та виражену специфічність зазначеної системи праймерів. У той же час результати аналізу свідчать, що штам *Aeromonas veronii* bt. *sobria* CECT 4246 не містив специфічних для роду *Aeromonas* ДНК-фрагментів. Це свідчить про можливе помилкове віднесення даного мікроорганізму до відповідного роду та виду, що вимагає додаткових біохімічних та серологічних досліджень.

Отже, отримані переконливі результати щодо задовільної чутливості та вираженої специфічності пари праймерів A16SF та A16SR, що свідчить про можливість їх використання у складі молекулярно-генетичної тест-системи для коректного визначення родової належності польових ізолятів мікроорганізмів.

Одними із основних ознак патогенності мікроорганізмів роду *Aeromonas* є їх гемолітична та протеолітична властивості. В основі визначення гемолітичних властивостей збудників мікробіологічними методами полягає їх спроможність спричинити гемоліз еритроцитів у поживному середовищі, що вимагає достатньо тривалого терміну досліджень. Визначення ж протеолітичних властивостей збудників достатньо ускладнено. С цієї точки зору значний інтерес представляє молекулярно-генетичний аналіз, який може бути заснований на детекції фрагментів гена, що відповідають за синтез аеролізіну та гемолізіну, за допомогою ПЛР.

Враховуючи вищевикладене, було проаналізовано значний масив літературного матеріалу, в результаті якого були обрані дві пари праймерів – АНН1F – АНН1R та АН-аегAAF – АН-аегAR, розраховані Wang (2003) [8-9], що фланкують, відповідно, ген гемолізіну (ahh1-ген) та ген аеролізіну (aegA-ген). Фрагмент, що накопичується при проведенні реакції із застосуванням пари праймерів

АНН1F і АНН1R, має довжину 132 пари нуклеотидів, із застосуванням пари праймерів АН-аerAAF і АН-аerAR – 331 пару нуклеотидів (табл. 3).

Таблиця 3 – Послідовності специфічних олігонуклеотидів (праймерів) для детекції генів, що кодують синтез АНН1-гемолізіну (hlyA) і аеролізіну мікроорганізмів роду *Aeromonas* за допомогою ПЛР

Маркерна послідовність	Послідовності олігонуклеотидів (праймерів), 5'3'
ahh1-ген (ген гемолізіну)	GCCGAGCGCCCAGAAGGTGAGTT (АНН1F) GAGCGGCTGGATGCGGTTGT (АНН1R)
aerA-ген (ген аеролізіну)	CAAGAACAAGTTCAAGTGGCCA (АН-aerAAF) ACGAAGGTGTGGTTCCAGT (АН-aerAR)

Оптимізований протокол реакції для пари праймерів АН-аerAAF та АН-аerAR був аналогічним до вищезазначеного протоколу до загальнородової пари праймерів А16SF та А16SR. Для пари АНН1F – АНН1R було підвищено температуру відпалу на 5 ° С.

Оптимізована програма ампліфікації фрагментів ДНК представників роду *Aeromonas* із використанням праймерів АНН1F – АНН1R та АН-аerAAF – АН-аerAR наведена у таблиці 4.

Таблиця 4 –Програма ампліфікації фрагментів ДНК представників роду *Aeromonas* із використанням праймерів АНН1F – АНН1R та АН-аerAAF – АН-аerAR

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	95 °С	5 хв.	1
2	95 °С	45 сек.	40
	60 °С (для АНН1F і АНН1R) 55 °С (для АН-аerAAF і АН-аerAR)	45 сек.	
	72 °С	45 сек.	
3	72 °С	5 хв.	1
4	10 °С	Зберігання	

Результати ампліфікації ДНК мікроорганізмів роду *Aeromonas* з використанням пари праймерів АН-аerAAF та АН-аerAR, що дозволяють детектувати фрагменти генів, відповідальних за синтез аеролізіну, проведеної у відповідності з розробленим протоколом реакції, наведені на рисунку 2.

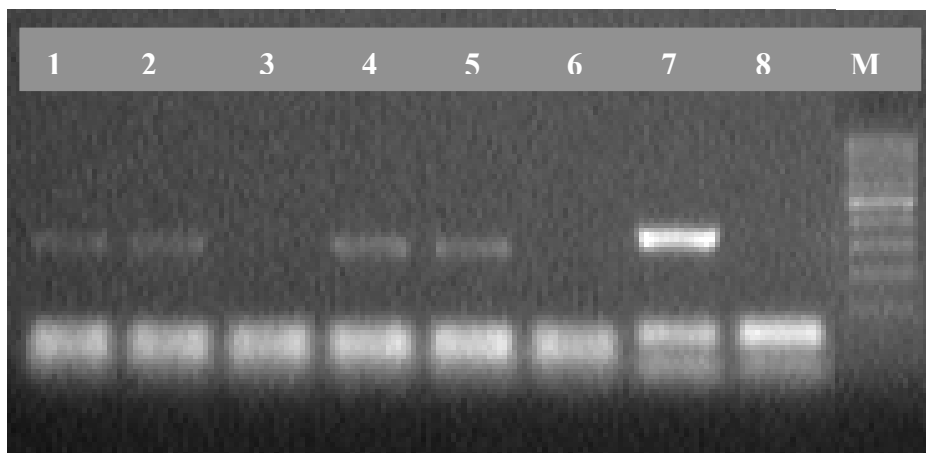


Рис. 2 Результати ампліфікації ДНК мікроорганізмів роду *Aeromonas* з використанням праймерів АН-аerAAF та АН-аerAR, що фланкують ген, відповідальний за синтез аеролізіну

1 – *Aeromonas hydrophila* K5-06; 2 – *Aeromonas hydrophila* T1C-767; 3 – *Aeromonas* sp.15-1; 4 – *Aeromonas salmonicida* A11; 5 – *Aeromonas sobria* 4S; 6 – *Aeromonas bestiarum* СЕСТ 4227; 7 – *Aeromonas veronii* bt. *sobria* СЕСТ 4246; 8 – деіонізована вода; М – маркер мол. маси 100 bp Ladder (Fermentas™, Латвія)

У результаті проведених досліджень семи проб ДНК, виділених з різних штамів мікроорганізмів роду *Aeromonas*, в п'яти пробах виявлено специфічні ДНК-фрагменти. Отримані результати свідчать, що штами *Aeromonas hydrophila* – K5-06, T1C-767, *Aeromonas salmonicida* A11, *Aeromonas sobria* 4S, *Aeromonas veronii* bt. *sobria* СЕСТ 4246 є патогенними. При цьому, слід зазначити, що штам *Aeromonas veronii* bt. *sobria* СЕСТ 4246, який за результатами попередніх досліджень викликає сумнів щодо своєї родової та видової належності, проявив більшу контрастність амплікону та більш високу його молекулярну масу, що може бути пов'язано або із більшою кількістю копій плазмід, які, можливо, несуть ген, відповідний за синтез аеролізіну, або наявності додаткової вставки в досліджуваному фрагменті гена. Отримані результати вимагають продовження досліджень з вивчення властивостей саме штаму *Aeromonas veronii* bt. *sobria* СЕСТ 4246.

Отже, отримані результати досліджень свідчать про задовільну чутливість та специфічність пари праймерів АН-аerAAF та АН-аerAR, яка фланкує ділянку гена, відповідальну за протеолітичні властивості мікроорганізму, що свідчить про можливість її використання при виготовленні експрес тест-системи для визначення протеолітичної активності польових ізолятів та музейних штамів аеромонад.

Результати проведеної ампліфікації ДНК мікроорганізмів роду *Aeromonas* з використанням пари праймерів АНН1F та АНН1R свідчили про те, що обрана пара праймерів є некоректно сформованою та не дозволяє визначити специфічні ДНК-продукти для детекції фрагмента гена, відповідального за синтез гемолізіну.

Висновки. Таким чином, було оптимізовано метод молекулярно-генетичної діагностики аеромонозу риб, який заснований на індикації специфічних локусів 16S рибосомної ДНК мікроорганізмів роду *Aeromonas*; оптимізовано метод визначення патогенності аеромонад, заснований на індикації гена, що кодує синтез аеролізіну (*aerA*). Отримані результати свідчать про можливість використання пар праймерів А16SF – А16SR та АН-*aerAA*F – АН-*aerAR* для розробки ПЛР тест-системи для діагностики аеромонозу риб.

Список літератури

1. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2009. OIE, World Organization for Animal Health, Paris, 2010. – 383 pp.
2. ПЛР-діагностика бактеріальних захворювань риб аеромонадної етіології [Текст] / Б. Т. Стегній [та ін.] // Вет. медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2008. – Вип. 90. – С. 413-420.
3. Полімеразно-ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини [Текст] / Б. Т. Стегній [та ін.]. – Х.: ННЦ «ІЕКВМ», 2006. – 110 с.
4. Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays [Text] / A. Cascon [et al.] // Appl. and Environ. Microbiology. – 1996. – Vol. 62, № 4. – P. 1167-1170.
5. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences [Text] / E. Dams [et al.] // Nucleic Acids Res. – 1988. – Vol. 16. – P. 87-175.
6. PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. [Text] / C.I.B. Kingombe [et al.] // Appl. Environ. Microbiology. – 1999. – Vol. 65, № 12. – P. 5293-5302.
7. Molecular cloning and characterization of an extracellular protease gene from *Aeromonas hydrophila* [Text] / O. Rivero [et al.] // Journ. of Bacteriology. – 1990. – Vol. 172, № 7. – P. 3905-3908.
8. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR [Text] / G. Wang [et al.] // Journ. of Clinical Microbiology. – 2003. – Vol. 41, № 3. – P. 1048-1054.
9. Characterization of cytotoxic, hemolytic *Aeromonas caviae* clinical isolates and their identification by determining presence of a unique hemolysin gene [Text] / G. Wang [et al.] // J. of Clin. Microbiology. – 1996. – Vol. 34, № 12. – P. 3203-3205.

DIAGNOSIS of fish aeromonosis using the polymerase chain reaction

Yevtushenko A.V., Bezkravna N.V., Gerilovych A.P., Solodyankin O.S.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

There has been optimized the method of molecular-genetic diagnosis of fish aeromonosis, which is based on the indication of specific loci of 16S ribosomal DNA of microorganisms genus Aeromonas, and method of determining their pathogenicity, based on the indication of a gene that encodes the aerolizin synthesis (aerA).

УДК 619:614.48:579.873.21

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ АТИПОВИХ МІКОБАКТЕРІЙ ПІСЛЯ ДІЇ «ХЛОРАНТОЇНУ»

Заггородній А.І., Палій А.П.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Загребельний В.О.

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

Репін М.В.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

На сьогодні в практичній ветеринарній дезінфектології накопичений великий досвід, який широко використовується в сільському господарстві. Розвиток агропромислового комплексу нашої країни змінює вимоги до практичних і теоретичних аспектів в дезінфектології, що полягає в пошуку нових високоєфективних нетоксичних препаратів, перегляд багатьох існуючих режимів і технологій санації об'єктів ветеринарного нагляду. Вирішення поставлених задач вимагає проведення глибоких теоретичних досліджень щодо закономірності загибелі бактерій та основ їх природної стійкості, механізму дії хімічних чинників, що тісно пов'язано з вивченням біології збудників інфекційних хвороб тварин.

Не дивлячись на досягнутий успіх у боротьбі з інфекційними захворюваннями в господарствах України щорічно виділяються збудники зооантропонозних інфекцій, до яких належить і туберкульоз. Поряд з персистенцією в навколишньому середовищі збудника *M. bovis* виділяють атипіві мікобактерії, які зумовлюють параалергічні реакції на туберкулін (ППД) для ссавців у сільськогосподарських тварин [1].

Проведеними дослідженнями встановлено, що збудники туберкульозу *M. bovis* та *M. avium* мають подібну субмікроскопічну будову і містять клітинну стінку, покриту мікрокапсулою, трьохшарову цитоплазматичну мембрану і добре розвинені мембранні структури (мезосоми), рибосоми, нуклеоїд, вакуолі та осміофільні гранули [2, 3]. Атипіві мікобактерії мають багато спільного з субмікроскопічною організацією збудників туберкульозу, що полягає в різних включеннях, вакуолях, мембранних структурах. Товщина клітинних стінок різних видів мікобактерій також приблизно однакова, за винятком деяких поліморфних форм [4].

Для знищення мікобактерій в навколишньому середовищі застосовують велику кількість дезінфікуючих препаратів, основний перелік яких складається з хлорорганічних засобів.

Біохімічними дослідженнями встановлено, що загибель спорових форм мікроорганізмів від дії гіпохлориту натрію пов'язана з порушенням бар'єру їх проникності, що призводить до виходу з клітин РНК та ДНК, а найважливішу захисну функцію виконують одночасно спорова оболонка і наявність в клітинах дипіколінової кислоти [5].

Літературні дані з електронно-мікроскопічних досліджень мікобактерій після дії хлорорганічних препаратів доволі обмежена, що і дало нам підставу для вибору відповідного наукового напрямку досліджень.

Мета роботи. Вивчити ультраструктурні зміни атипівіх мікобактерій після дії хлорорганічного дезінфікуючого препарату.

Матеріали і методи. У роботі були використані атипівіх мікобактерії видів *M. kansasii*, *M. goodii*, *M. xenopi*, *M. flavescens* після дії на них хлорорганічного дезінфікуючого препарату «Хлорантоїн» в концентрації 0,5% за експозиції 3 години.