

СЕЛЕКЦІЯ, ГЕНЕТИКА ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК: 597-12:576.85.08

МОЛЕКУЛЯРНА ДІАГНОСТИКА *YERSINIA RUCKERI*

Ю. П. Рудь, rud_yuriy@ifr.com.ua, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ

І. О. Циганок, bykoffka@mail.ru, ННЦ Інститут біології, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ

Мета. Проаналізувати нуклеотидні послідовності гену 16S рРНК вірулентних штамів *Yersinia ruckeri* та розробити метод молекулярної експрес-діагностики збудника ерсиніозу.

Методика. За допомогою алгоритму ClustalW у програмному забезпеченні MEGA версії 6.0 було проаналізовано нуклеотидні послідовності гену 16S рРНК вірулентних штамів *Y. ruckeri*. Для розроблення молекулярної експрес-діагностики *Y. ruckeri* використовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Підбір олігонуклеотидних праймерів здійснювали у програмному забезпеченні VectorNT11 та онлайн-сервісі BLAST. Продукти ампліфікації були досліджені за допомогою методів секвенування та аналізу нуклеотидних послідовностей.

Результати. На основі ПЛР розроблено метод молекулярної експрес-діагностики збудника ерсиніозу, бактерії *Y. ruckeri*. Показано, що специфічні олігонуклеотидні праймери продукують амплікони розміром 600 пар нуклетидів. Продукти ПЛР досліджено секвенуванням та показано, що праймери фланкують ділянку мішені ампліфікації.

Наукова новизна. В межах висококонсервативного гену 16S рРНК бактерій *Yersinia* виділено локус ДНК, до якого підібрано олігонуклеотидні праймери для експрес-діагностики вірулентного штаму *Y. ruckeri*.

Практична значимість. Експрес-діагностика ерсиніозу дозволить ідентифікувати збудника цього інфекційного захворювання, бактерію *Y. ruckeri*, та здійснювати профілактичні або лікувальні заходи в рибогосподарських підприємствах України.

Ключові слова: *Y. ruckeri*, експрес-діагностика, ПЛР.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ ТА АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Y. ruckeri – це збудник ерсиніозу або ентеричної хвороби «червоного рота» (enteric redmouth disease, ERM), що спричиняє значні економічні збитки в аквакультурі лососевих риб. Вперше збудник цього інфекційного захворювання був виділений у США в 1950 роках [1]. До теперішнього часу ерсиніоз діагностовано в країнах Північної Америки, Австралії, Південної Африки та Європи. І хоч даний збудник було виділено від багатьох видів риб, найбільш уразливими є представники лососевих, а саме райдужна форель *Oncorhynchus mykiss* [2 – 7].

Бактерії *Y. ruckeri* є представником родини *Enterobacteriaceae*. Це грам-негативні короткі палички з заокругленими кінцями. Їхній розмір становить близько 0,75 мкм у товщину та 1 – 3 мкм у довжину. Ці бактерії не утворюють спори та не капсулюються, але інколи можуть мати джгутик і від цього залежить їх рухливість. Як й інші представники *Enterobacteriaceae*, бактерії *Y. ruckeri* ферментують глюкозу, є оксидазо-позитивними та нітрат-відновлюючими. Біохімічно ерсинії можна ідентифікувати за допомогою тестів на присутність β-галактозидази, лізин- та орнітин- декарбоксилаз, натомість реакції на індол та



H₂S – негативні. З цукрів *Y. ruckeri* утилізує глюкозу, манітол, інозитол, рамнозу, цукрозу, мелітозу та арабінозу [8]. Використовуючи вищенаведені біохімічні тести, бактерії *Y. ruckeri* можуть бути ідентифіковані в лабораторних умовах, але така діагностика трудомістка та потребує багато часу. Альтернативою класичній бактеріологічно-біохімічній ідентифікації можуть бути комерційні набори API-20E [9], які, в свою чергу, не здатні ідентифікувати збудника безпосередньо з патологічного матеріалу.

Збудник захворювання передається горизонтально. Причому за стресових умов, таких як підвищення температури води до 25 °С, інфікування клінічно здорової форелі бактеріями *Y. ruckeri* відбувається у 100 % випадків [10]. До того ж, риба, яка перехворіла на ерсиніоз, стає джерелом поширення збудника, а бактерії *Y. ruckeri* досить стабільні у воді і, завдяки своїм адгезивним властивостям, не втрачають інфекційності упродовж декількох місяців [11]. Вміст неорганічних солей сприяє виживанню бактерії *Y. ruckeri* у навколишньому середовищі, тому якість води, як і температура – це головні чинники стримування розвитку ерсиніозу [12].

Серед вікових груп найбільш уразливими є цьоголітки. У старших особин хвороба протікає у хронічній формі. Візуальні симптоми захворювання проявляються як у поведінці риби, так і на її шкіряних покривах. Так, під час захворювання риба характеризується уповільненим рухом, летаргією та тримається поверхні води у місцині з низьким потоком. Біля плавців, на шкірі голови та бічній лінії спостерігаються типові крововиливи. Навколо ротової порожнини виникає геморагічна септицемія, яка складає враження «червоного рота», від чого й виникла назва відповідного захворювання.

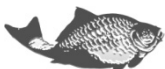
Але слід відмітити, що не в усіх випадках ERM спостерігаються ознаки «червоного рота», тому часто це захворювання називають ерсиніоз.

Колонізація внутрішніх органів бактеріями *Y. ruckeri* відбувається одразу після інфікування, тому характерні виразки та некротичні запалення спостерігаються у нирках, селезінці, печінці, серці та зябрах. Зазвичай захворювання починається з низької смертності, але без відповідного лікування відбувається розвиток хвороби, що призводить до значних втрат. Поширенню та розвитку інфекції сприяють висока густина посадки риби та неналежна якість води [13].

Для експрес-діагностики *Y. ruckeri* використовують молекулярно-біологічні методи, одним з яких є ПЛР [14 – 16]. Серед штамів *Y. ruckeri* є як вірулентні – ті з якими пов'язана висока смертність та хворобливість риби, так і невірулентні, які вважаються умовно-патогенними і не призводять до загибелі об'єктів аквакультури.

Для диференціації вірулентних та невірулентних штамів *Y. ruckeri* використовують штамотипування на підставі біотопів, серотипів та зовнішньо-мембранного білка.

Найефективнішим способом ідентифікації вірулентних штамів бактерії *Y. ruckeri* є аналіз нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК і генів, що кодують білки, на основі функцій яких відбувається штамотипування. Це білки джгутіка, зовнішньої цитоплазматичної мембрани та ферменту, що гідролізує сорбітол [17 – 19].



ВИДІЛЕННЯ НЕВИРШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ. МЕТА РОБОТИ

Єрсиніоз – це інфекційне захворювання лососевих риб, що супроводжується септицемією та крововиливами на тілі і у внутрішніх органах інфікованої риби. В Україні смертність риби з ознаками даного захворювання реєструвалась, а збудника єрсиніозу було ідентифіковано [20]. Незважаючи на загрозу даного захворювання, досі бракує інформації стосовно патогенезу та ефективних профілактичних дій та лікування. Оскільки найкраща профілактика інфекційних захворювань – це своєчасна ідентифікація збудника, методи експрес-діагностики єрсиніозу конче потрібні у вітчизняному рибництві.

Тому метою даної роботи було проаналізувати нуклеотидні послідовності генів, які використовують у штамотипуванні вірулентних та невірулентних бактерій *Y. ruckeri*; підібрати олігонуклеотидні праймери, специфічні до вірулентних штамів *Y. ruckeri* та на їх основі розробити метод експрес-діагностики єрсиніозу з використанням ПЛР.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводились в Інституті рибного господарства НААН України.

Мікробіологія. Первинний посів мікроорганізмів з цьогорічок райдужної форелі *O. mykiss* (n = 4) з підозрою на єрсиніоз здійснювали на м'ясо-пептонний агар (МПА). Бактеріологічні посіви були відібрані із зябер, шкіри та черевної порожнини. Аналогічні дослідження проводили також у клінічно здорових однорічок райдужної форелі. Виділення чистої культури, дослідження морфології колоній та клітин проводили за загальноприйнятими методиками [13].

Виділення ДНК. 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 Na₂HPO₄; 2 мМ KH₂PO₄; 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 EDTA; 0,5 % натрій додецилсульфат) і 3 мкл протеїнази К (~600 од./мкл), ретельно перемішували та інкубували 1 годину за температури 37 °С. ДНК екстрагували фенолом (рН 8,0) та центрифугували 5 хвилин за 13 400 об./хв. Надосадову рідину відбирали та проводили повторну екстракцію ДНК сумішню хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1). Суспензію центрифугували на мікроцентрифузі упродовж п'яти хвилин за 13 400 об./хв. До супернатанту додавали 0,1 об'єму 3 М натрій ацетату (рН 5,2) та 2,5 об'єму охоложеного до -20 °С етанолу. Преципітацію ДНК проводили за кімнатної температури упродовж 1 години. Після цього осаджували ДНК на мікроцентрифузі за 13 400 об./хв. упродовж 10 хвилин. Осад ДНК промивали 70 %-им етанолом. ДНК розчиняли у деіонізованій воді, вільній від нуклеаз.

Підбір олігонуклеотидних праймерів. Для розроблення олігонуклеотидних праймерів, специфічних до бактерій *Y. ruckeri*, визначення їхньої специфічності та фізичних властивостей використовували програмне забезпечення Vector NTI 11. Крім того, специфічність праймерів перевіряли за допомогою онлайн-сервісу BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

ПЛР. 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 за температури 94 °С (3 хвилини) та 35 циклів денатурації за 94 °С (30 секунд), відпалу праймерів за температури 64 °С (30 секунд), синтезу за 72 °С (1 хвилини) та додаткового останнього циклу синтезу за 72 °С (7 хвилин). Після ПЛР продукти аналізували у 2 %-му агарозному гелі в ТАЕ-буфері (40 мМ TRIS-HCl, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ ЕДТА). Результати електрофорезу спостерігали під ультрафіолетовим транслюмінатором.

Визначення нуклеотидної послідовності. Виділення ДНК з гелю здійснювали за допомогою набору Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas) відповідно до протоколу виробника. Ампліфіковані фрагменти досліджували в Інституті молекулярної біології і генетики НААН України, на автоматичному ДНК-секвенаторі Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems) з використанням набору для секвенування BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

Аналіз послідовностей нуклеотидів проводили за допомогою алгоритмів ClustalW в програмному забезпеченні MEGA 6.0 та BLASTN. Послідовності генів 16S рРНК бактерій *Y. ruckeri* були отримані з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Внаслідок проведених мікробіологічних досліджень, з організму хворої на єрсиніоз райдужної форелі *O. mykiss* було виділено один штам бактерій *Y. ruckeri*. На МПА бактерії *Y. ruckeri* формували білуваті, непрозорі колонії розміром 2 – 3 мм. При фарбуванні за Граммом виділені бактерії *Y. ruckeri* були грамнегативними. Клітини були паличковидної форми (короткі палички) із заокругленими кінцями.

Як показали результати наших досліджень, обрані олігонуклеотидні праймери, специфічні до бактерій *Y. ruckeri*, ампліфікували очікуваний за розміром фрагмент ДНК. Розмір ампліконів становив 600 пар нуклеотидів (п. н.) (рис. 1).

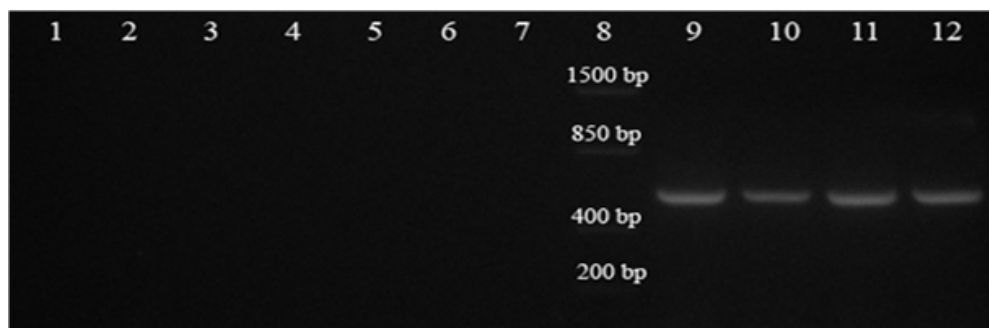


Рисунок 1. Ампліфікація фрагменту гена 16S рРНК бактерії *Y. ruckeri*: 1 — *A. salmonicida*; 2 — *A. hydrophila*; 3 — *P. fluorescens*; 4 — *S. putrefaciens*; 5 — *F. oncorynchi*; 6 — *F. chungangence*; 7 — контроль (всі компоненти реакції, окрім ДНК); 8 — ДНК маркер (FastRuler Low Range DNA Ladder); 9 – 12 — зразки бактерій *Y. ruckeri*, виділених від райдужної форелі *O. mykiss*.



Для визначення специфічності підібраних олігонуклеотидних праймерів, проводили ПЛР та з іншими патогенними та умовно-патогенними бактеріями. Так, у реакції з ДНК *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium oncorynchi* та *F. chungangense* специфічні до *Y. ruckeri* праймери не реагували, що свідчить про специфічність та чутливість розроблених олігонуклеотидів саме до збудника єрсиніозу (рис. 1).

Олігонуклеотиди, специфічні до *Y. Ruckeri*, підбиралися для ампліфікації фрагменту гена 16S рРНК з метою підвищення чутливості ПЛР, оскільки геном бактерій *Y. ruckeri* містить декілька копій цього гена. Тому ампліфікація фрагменту гена 16S рРНК *Y. ruckeri* дозволяє ідентифікувати ці бактерії безпосередньо зі зразків тканин ураженої риби, або ж із зразків крові, взятих зажиттєво для виявлення хронічної інфекції.

Позитивні на *Y. ruckeri* зразки були відібрані від хворої риби з ознаками єрсиніозу. Зябра інфікованої риби, з якої робили мікробіологічні посіви, характеризувались некротичними запаленнями, на шкірі та біля плавців спостерігались крововиливи.

Специфічність ампліфікації була перевірена за допомогою нуклеотидного аналізу продуктів ПЛР. Результати сіквенса показали, що ампліфікований фрагмент відповідав ділянці гена 16S рРНК бактерії *Y. ruckeri*.

Отримані результати свідчать, що розроблений метод ПЛР може бути використаний для експрес-діагностики вірулентних штамів *Y. ruckeri* в рибогосподарських підприємствах України. Використовуючи чутливість розробленого методу, бактерії *Y. ruckeri* можуть бути діагностовані і при безсимптомному протіканні захворювання у риби, адже з літературних даних відомо, що 25 % популяції райдужної форелі хронічно містять *Y. ruckeri* на поверхні шкіри, зябрах та навіть у деяких внутрішніх органах [21].

Незважаючи на важливість визначення єрсиніозу для сучасного рибництва та багатогранні дослідження його збудників, лише невелика частка даних про взаємодію патоген-господар трапляється в літературі. Досі невіршеними залишаються питання колонізації бактеріями *Y. ruckeri* шкіри, зябер і внутрішніх органів та утворення геморагічної септицемії. Поруч з діагностикою, гостро виникає питання визначення вірулентності штамів [22]. У вирішенні цієї проблеми допоможе аналіз нуклеотидної послідовності геномів бактерій роду *Yersinia*. Тільки за наявності послідовностей ДНК єрсиній, 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.

З огляду на все більш поширене явище резистентності до антибіотиків, основним напрямом боротьби з єрсиніозом має бути профілактика [23]. Першими кроками в цьому мають бути суворе виконання правил ведення аквакультури, а саме дотримання санітарно-епідеміологічних норм, густоти посадки риби та якостей води. Вакцини, хімотерапія та пробіотики – також багатообіцяючі напрями профілактики даного захворювання [24 – 25]. Перспективним є культивування видів риб, стійких до бактерій *Y. Ruckeri*, яке може бути використане у якості альтернативи. Інформація про патогенез дозволить розробляти нові методи боротьби з цим захворюванням, які будуть економічно



вигідні та безпечні як для навколишнього середовища, так і для об'єктів аквакультури.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ

Y. ruckeri – це економічно важливий інфекційний агент, що спричиняє високу смертність у лососевих риб. Попри високу значимість цього патогена, на сьогодні недостатньо інформації про механізми патологічного процесу, передачу інфекції, поширення в організмі, чинники вірулентності та імунної відповіді хазяїна.

Для ефективної боротьби з цим захворюванням необхідно мати більше експериментальних даних стосовно імуногенності цього збудника. Тому заходи профілактики та запобігання захворюванню, до яких відноситься експрес-діагностики, є єдиним доступним та актуальним способом боротьби з ерсиніозом в умовах сучасної аквакультури. Розроблений нами метод експрес-діагностики ерсиніозу дозволить ідентифікувати збудника – бактерію *Y. ruckeri* – та здійснювати профілактичні або лікувальні заходи в рибогосподарських підприємствах України. Для подальшого моніторингу вірулентних штамів *Y. ruckeri* слід розширити географію природних водойм та рибогосподарських підприємств, що буде предметом наших наступних досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Rucker R. Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) / R. Rucker // Bulletin de L' Office International des Epizooties. — 1966. — Vol. 65. — P. 825—830.
2. Akhlaghi M. Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri*: the causative agent of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran / M. Akhlaghi, H. Sharifi Yazdi // Iranian Journal of Veterinary Research. — 2008. — Vol. 9. — P. 347—352.
3. Bravo S. First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru / S. Bravo, V. Kojagura // Bulletin of European Association of Fish Pathologists. — 2004. — Vol. 24. — P. 104—108.
4. Karatas S. Enteric red mouth disease in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on the Black Sea coast of Turkey / S. Karatas, A. Candan, D. Demircan // The Israeli Journal of Aquaculture — Bamidgeh. — 2004. — Vol. 56. — P. 226—231.
5. Occurrence of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on farms in Croatia / D. Oraic, S. Zrncic, B. Sostaric [et al.] // Acta Veterinaria Hungarica. — 2002. — Vol. 50. — P. 282—291.
6. First description of *Yersinia ruckeri* serotype O2 in Spain / J. Romalde, E. Planas, J. M. Sotelo [et al.] // Bulletin of European Association of Fish Pathologists. — 2003. — Vol. 23. — P. 135—138.
7. Molecular characterization of Portuguese strains of *Yersinia ruckeri* isolated from fish culture systems / J.A. Sousa, B. Magarinos, J. C. Eiras [et al.] // Journal of Fish Diseases — 2001. — Vol. 24. — P. 151—159.
8. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish / E. Tobback, A. Decostere, K. Hermans [et al.] // Journal of Fish Diseases. — 2007. — Vol. 30. — P. 257—268.
9. Austin D. A. Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) / D. A. Austin, P. A. W. Robertson, B. Austin // Systematic and Applied Microbiology. — 2003. — Vol. 26. — P. 127—131.



10. Altinok I. Effects of salinity on *Yersinia ruckeri* infection of rainbow trout and brown trout // I. Altinok, J. M. Grizzle // Journal of Aquatic Animal Health. — 2001. — Vol. 13. — P. 334—339.
11. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties / L. Coquet, P. Cosette, G. A. Junter [et al.] // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. — 2002. — Vol. 26. — P. 373—378.
12. Altinok I. The infectious route of *Yersinia ruckeri* is affected by salinity // I. Altinok // Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. — 2004. — Vol. 24. — P. 253—259.
13. Horne M. T. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*) / M. T. Horne, A. C. Barnes // Fish diseases and disorders-viral, bacterial and fungal infections. [Woo P.T.K., Bruno D.W. Eds.]. — 1999. — Vol. 3. — P. 455—477.
14. PCR-based detection of *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout fish / M. R. Roozbahani, M. Bandehpour, A. Haghighi-Khiabani-Asi [et al.] // Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. — 2009. — Vol. 4. — P. 258—262.
15. Glenn R. A. The use of a real-time PCR primer/probe set to observe infectivity of *Yersinia ruckeri* in Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), and steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) / R. A. Glenn, P. W. Taylor, K. C. Hanson // Journal of Fish Diseases. — 2001. — Vol. 34. — P. 783—791.
16. Molecular identification of *Yersinia ruckeri* isolates by polymerase chain reaction test in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* / F. Fadaeifard, A. Sharifzadeh, M. Raissy [et al.] // European Journal of Experimental Biology. — 2014. — Vol. 4(1). — P. 1—4.
17. Fernandez L. Identification of specific in vivo-induced (ivi) genes in *Yersinia ruckeri* and analysis of ruckerbactin, a catecholate siderophore iron acquisition system / L. Fernandez, I. Marquez, J. A. Guijarro // Applied and Environmental Microbiology. — 2004. — Vol. 70. — P. 5199—5207.
18. Identification of novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) chemokines, CXCD1 and CXCD2: mRNA expression after *Yersinia ruckeri* vaccination and challenge / G. D. Wiens, G. W. Glenney, S. E. LaPatra [et al.] // Immunogenetics. — 2006. — Vol. 58. — P. 308—323.
19. Identification of flagellar motility genes in *Yersinia ruckeri* by transposon mutagenesis / J. P. Evenhuis, S. E. LaPatra, D. W. Verner-Jeffreys [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. — 2009. — Vol. 75. — P. 6630—6633.
20. Рудь Ю. П. Використання мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції в експрес діагностиці інфекційних захворювань риб / Ю. П. Рудь, Л. В. Жук, І. Б. Владимирський // Рибогосподарська наука України. — 2012. — №. 3-4. — С. 59—62.
21. Avci H. Pathological findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) experimentally infected with *Yersinia ruckeri* / H. Avci, S. S. Birincioglu // Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. — 2005. — Vol. 29. — P. 1321—1328.
22. Revell P. A. *Yersinia* virulence: more than a plasmid / P. A. Revell, V. L. Miller // FEMS Microbiology Letters. — 2001. — Vol. 205. — P. 159—164.
23. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B) / M. K. Raida, J. L. Larsen, M. E. Nielsen [et al.] // Journal of Fish Diseases. — 2003. — Vol. 26. — P. 495—498.



24. Kim D. H. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) induced by probiotics / D. H. Kim, B. Austin // *Fish and Shellfish Immunology*. — 2006. — Vol. 21. — P. 513—524.
25. Potential use of a *Yersinia ruckeri* O1 auxotrophic aroA mutant as a live attenuated vaccine / A. Temprano, J. Riano, J. Yugueros [et al.] // *Journal of Fish Diseases*. — 2005. — Vol. 28. — P. 419—427.

REFERENCES

1. Rucker, R. (1966). Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin de L'Office International des Epizooties*, 65, 825-830.
2. Akhlaghi, M. & Sharifi Yazdi, H. (2008). Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri*: the causative agent of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 9, 347-352.
3. Bravo, S., & Kojagura, V. (2004). First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 24, 104-108.
4. Karatas, S., Candan, A., & Demircan, D. (2004). Enteric red mouth disease in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on the Black Sea coast of Turkey. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 56, 226-231.
5. Oraic, D., Zrnčić, S., Sostaric, B., Bazulic, D., & Lipej, Z. (2002). Occurrence of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on farms in Croatia. *Acta Veterinaria Hungarica*, 50, 282-291.
6. Romalde, J., Planas, E., Sotelo, J. M., & Toranzo, A. E. (2003). First description of *Yersinia ruckeri* serotype O2 in Spain. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 23, 135-138.
7. Sousa, J. A., Magarinos, B., Eiras, J. C., Toranzo, A. E. & Romalde J. L. (2001) Molecular characterization of Portuguese strains of *Yersinia ruckeri* isolated from fish culture systems. *Journal of Fish Diseases*, 24, 151-159.
8. Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., & Chiers, K. (2007). *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 30, 257-268.
9. Austin, D. A., Robertson, P. A. W., & Austin, B. (2003). Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 127-131.
10. Altinok, I., & Grizzle, J. M. (2001). Effects of salinity on *Yersinia ruckeri* infection of rainbow trout and brown trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13, 334-339.
11. Coquet, L., Cosette, P., Junter, G. A., Beucher, E., Saiter, J. M., & Jouenne, T. (2002). Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26, 373-378.
12. Altinok, I. (2004). The infectious route of *Yersinia ruckeri* is affected by salinity. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 24, 253-259.
13. Horne, M. T., & Barnes, A. C. (1999). Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). *Fish diseases and disorders-viral, bacterial and fungal infections*, 3, 455-477.
14. Roozbahani, M. R., Bandehpour, M., Haghghi-Khiabani-Asi, A., Abdollahi, H., & Kazemi, B. (2009). PCR-based detection of *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout fish. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4, 258-262.
15. Glenn, R. A., Taylor, P. W., & Hanson, K. C. (2011). The use of a real-time PCR primer/probe set to observe infectivity of *Yersinia ruckeri* in Chinook salmon,



- Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), and steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 34, 783-791.
16. Fadaeifard, F., Sharifzadeh, A., Raissy, M., Mazrooi, M., Safari, S., & Moumeni, M. (2014). Molecular identification of *Yersinia ruckeri* isolates by polymerase chain reaction test in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *European Journal of Experimental Biology*, 4(1), 1-4.
 17. Fernandez, L., Marquez, I., & Guijarro, J. A. (2004). Identification of specific in vivo-induced (ivi) genes in *Yersinia ruckeri* and analysis of ruckerbactin, a catecholate siderophore iron acquisition system. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5199-5207.
 18. Wiens, G. D., Glenney, G. W., LaPatra, S. E., & Welch, T. J. (2006). Identification of novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) chemokines, CXCD1 and CXCD2: mRNA expression after *Yersinia ruckeri* vaccination and challenge. *Immunogenetics*, 58, 308-323.
 19. Evenhuis, J. P., LaPatra, S. E., Verner-Jeffreys, D. W., Dalsgaard, I., & Welch, T. J. (2009). Identification of flagellar motility genes in *Yersinia ruckeri* by transposon mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 6630-6633.
 20. Rud, Yu. P., Zhuk, L. V., & Vladimirovsky, I. B. (2012). Use of multiplex polymerase chain reaction in rapid diagnostics of infectious diseases of fish. *Fisheries science of Ukraine*, 3-4, 59-62.
 21. Avci, H. & Birincioglu, S. S. (2005). Pathological findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) experimentally infected with *Yersinia ruckeri*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29, 1321-1328.
 22. Revell, P. A. & Miller, V. L. (2001). *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 159-164.
 23. Raida, M. K., Larsen, J. L., Nielsen, M. E., & Buchmann, K. (2003). Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *Journal of Fish Diseases*, 26, 495-498.
 24. Kim, D. H., & Austin, B. (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) induced by probiotics. *Fish and Shellfish Immunology*, 21, 513-524.
 25. Temprano, A., Riano, J., Yugueros, J., Gonzalez, P., de Castro, L., Villena, A., Luengo, J. M., & Naharro, G. (2005). Potential use of a *Yersinia ruckeri* O1 auxotrophic *aroA* mutant as a live attenuated vaccine. *Journal of Fish Diseases*, 28, 419-427.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА *YERSINIA RUCKERI*

Ю. П. Рудь, rud_yuriy@ifr.com.ua, Інститут рибного господарства НААН, г. Київ
 І. О. Цыганок, bykoffka@mail.ru, ННЦ Інститут біології, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, г. Київ

Цель. Проаналізувати нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК вірулентних штамів *Yersinia ruckeri* і розробити метод молекулярної експресс-діагностики збудителя ієрсиніоза.

Методика. С допомогою алгоритма ClustalW в програмному забезпеченні MEGA версії 6.0 були проаналізовані нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК вірулентних штамів *Y. ruckeri*. Для розробки молекулярної експресс-діагностики *Y. ruckeri* використовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Підбір олигонуклеотидних



праймеров здійснювали в програмному забезпеченні VectorNTI11 і на онлайн-сервісі BLAST. Продукти ампліфікації були досліджені з допомогою методів секвенування і аналізу нуклеотидних послідовностей.

Результати. На основі ПЦР розроблено метод молекулярної експрес-діагностики збудителя ієрсиніозу, бактерії *Y. ruckeri*. Показано, що специфічні олигонуклеотидні праймери продуцують амплікони розміром 600 пар нуклеотидів. Продукти ПЦР досліджено секвенуванням і показано, що праймери фланкують участок мішені ампліфікації.

Научна новизна. В межах висококонсервативного гена 16S рРНК бактерій *Yersinia* виділено локус ДНК, к которому подобрано олигонуклеотидні праймери для експрес-діагностики вирулентного штаму *Y. ruckeri*.

Практическа значимість. Експрес-діагностика ієрсиніозу дозволить ідентифікувати збудителя цього інфекційного захворювання, — бактерію *Y. ruckeri* — і здійснювати профілактичні або лікувальні заходи в рибохозяйствених підприємствах України.

Ключеві слова: *Y. ruckeri*, експрес-діагностика, ПЦР.

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF *YERSINIA RUCKERI*

Yu. Rud, rud_yuriy@ifr.com.ua, Institute of Fisheries of the NAAS, Kyiv

I. Tsyganok, bykoffka@mail.ru, ESC Institute of Biology, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

Purpose. The analysis of nucleotide sequences of the 16S rDNA gene of virulent strains of *Yersinia ruckeri* and to develop the method of molecular diagnostic of enteric redmouth disease.

Methodology. By the method of CLUSTALW algorithm in MEGA software version 6.0 the nucleotide sequences of the 16S rDNA gene of virulent strains of *Yersinia ruckeri* were analysed. For development of molecular diagnostic of *Y. ruckeri* the method of polymerase chain reaction (PCR) was used. Primer selection was carried out in software VectorNTI11 and on-line-service BLAST. The PCR products were investigated by the methods of sequencing and nucleotide analysis.

Findings. Based on PCR assay the method of molecular diagnostic of enteric redmouth disease agent, bacterium *Y. ruckeri* was developed. It was shown that specific oligonucleotide primers generated PCR products in size of 600 base pairs. PCR products were investigated by the sequencing that showed right targeting of primers in reaction.

Originality. Among high-conservative gene of 16S rDNA of *Y. ruckeri* the fragment of DNA was determined to which the specific primers for rapid diagnostic of virulent strains were selected.

Practical Value. Rapid diagnostic of yersiniosis will allow to identify an agent of this infectious disease, bacterium *Y. ruckeri*, and to provide the prophylactic or medical measures in the fish farming of Ukraine.

Key words: *Y. ruckeri*, rapid diagnostic, PCR.

