

УДК 597-12:576.85.08

ВИКОРИСТАННЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ В ЕКСПРЕС ДІАГНОСТИЦІ ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ РИБ

Ю.П. Рудь, Л.В. Жук, І.Б. Владимирський

Інститут рибного господарства НААН України

*Розроблено метод мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (мПЛР) для ідентифікації найпоширеніших бактеріальних збудників інфекційних захворювань риб *Renibacterium salmoninarum*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium columnarae*, *Aeromonas salmonicida* та *Aeromonas hydrophila*. Показано специфічність та ефективність олігонуклеотидних праймерів, а також переваги запропонованого методу над бактеріологічною діагностикою даних патогенів.*

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].

Розвиток молекулярної біології в кінці ХХ століття привів до створення нових методів діагностики інфекційних захворювань у людини і тварин. Дослідження та діагностика хвороб риб не є виключенням і багато нових відкриттів в цьому напрямі було зроблено за останні 10 років. Використання ДНК-технологій, спрямованих на безпосереднє виявлення генетичного матеріалу збудників хвороб різної етіології (вірусів, бактерій, грибів, екто- та ендопаразитів) поступово витісняє трудомісткі культуральні, серологічні та гістологічні методи діагностики. Нині найпопулярнішими методами в ДНК-діагностиці інфекційних хвороб риб є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР або англ. PCR) та її різновиди [2].

Такі інфекційні захворювання риб як фурункульоз (*Aeromonas salmonicida*), хвороба “червоного рота” лососевих (*Yer-*

sinia ruckeri), бактеріальна геморагічна септицимія (*Aeromonas hydrophila*), бактеріальна хвороба нирок (*Renibacterium salmoninarum*) та колумнарна хвороба (*Flavobacterium columnarae*) широко поширені у всьому світі і призводять до значних економічних збитків в рибному господарстві. Традиційно діагностика цих захворювань проводилась за допомогою бактеріологічних посівів на щільні поживні середовища з наступною ідентифікацією фенотипових чи серологічних властивостей досліджуваних штамів. Але ці методи є трудомісткими та низькочувливими, до того ж вони потребують обов'язкового попереднього виділення патогену [3]. Використання методу мПЛР дозволяє ідентифікувати одразу декілька збудників інфекційних хвороб в одному зразку, взятого безпосередньо від риби. До того ж цей різновид ПЛР зменшує витрати на реагенти для реакції та скорочує час на ідентифікацію кожного збудника завдяки використанню специфічних наборів олігонуклеотидів [4].

Мета роботи — підібрати олігонуклеотидні праймери, специфічні до вищезгаданих бактеріальних збудників інфекційних захворювань риб, та використати їх в експрес-діагностиці за допомогою методу мПЛР.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Мікробіологічні дослідження. Первинний посів мікроорганізмів з патологічного матеріалу здійснювали на м'ясо-пептонний агар (МПА). Дослідження морфології колоній та клітин проводили за загальноприйнятими методиками. Виділення чистої культури здійснювали за методом Дригальського [5].

Виділення ДНК. ДНК виділяли зі зразків, взятих безпосередньо від мальків райдужної форелі *Onchorhynchus mykiss* та бактеріальних суспензій, отриманих як від окремих колоній чистих культур, так і шляхом їх змішування. До суспензій додавали буфер (10 мМ TRIS-HCl pH=8,0, 0,1 М NaCl, 25 мМ ЕДТА, 0,5% ДСН) та протеїназу К, ретельно перемішували та інкубували 1 годину за температури 37°C. ДНК екстрагували фенолом та центрифугували 5 хвилин за 13 000 об./хв. Надосадову рідину відбирали та проводили повторну екстракцію ДНК сумішшю хлороформ — ізоаміловий спирт (24:1). Суспензію центрифугували на мікроцентрифузі упродовж п'яти хвилин за 13 000 об./хв. До супернатанту додавали 0,1 об'єму 3М натрій ацетату (pH=5,2) та 2,5 об'єму охолодженого до -20°C етанолу. Преципітацію ДНК проводили за кімнатної температури упродовж 1 год. Після цього осаджували ДНК на мікроцентрифузі за 13 000 об./хв упродовж 10 хвилин. Осад ДНК промивали 70%-м етанолом. ДНК розчиняли у деіонізованій воді вільній від нуклеаз [6].

Підбір олігонуклеотидів. Олігонуклеотидні праймери для ідентифікації *R. salmoninarum* (Rs1: 5'-CAAGGTGAAGGG-AATTCTTCCACT-3' та Rs2: 5'-GACGGCAA-TGTCCGTCCCCGGTTT-3'), *Y. ruckeri* (YerF: 5'-GCGAGGAGGAAG GGTAAAGTG-3' та YerR: 5'-GAAGGCACCAAGGCATCTCTG-3'), *F. columnarum* (FCF: 5'-AAGGCAACGAT-GGGTAG-3' та FCR: 5'-GCACGGAGT TA-GCCGATC-3') та *A. salmonicida* (AsF: 5'-CGTTGGATATGGCTCTTCCT-3' та AsR: 5'-СТСАААСГГСТГCGТАССА -3') були описані Brown et al. (1994), Altinok et al. (2001), Yeh et al. (2006) та Hiney et al. (1992) відповідно [7–10]. Олігонуклеотиди, які використовувались для ідентифікації *A. hydrophila* (AhF: 5'-GAAAGTTGATGCCTAATACGTA-3' та AhR: 5'-CGTGCTGGCAACAAGGA CAG-3') були

підбрані нами, на підставі нуклеотидних послідовностей ДНК українських штамів цих бактерій [11].

Для розроблення праймерів, визначення їхньої специфічності та фізичних властивостей використовували програмне забезпечення Vector NTI 10 та Primer Premier 5. Крім того, специфічність праймерів перевіряли за допомогою онлайн-сервісу BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

ПЛР. Ампліфікацію проводили на термоциклері "Eppendorf MasterCycler". До складу реакційної суміші входило: 25 мкл PCR MasterMix (Fermentas), олігонуклеотиди (Metabion) по 0,5 мкл кожного (20 пмоль/мкл), 2 мкл ДНК та стерильна деіонізована вода до загального об'єму 50 мкл. Ампліфікація ДНК включала 1 цикл попередньої денатурації за 94°C (3 хвилини) та 35 циклів денатурації за 94°C (30 секунд), відпаду праймерів за 59°C (90 секунд), елонгації за 72°C (1 хвилина) та додатковий останній цикл синтезу за 72°C (10 хвилин). Після ПЛР продукти аналізували в 2%-му агарозному гелі в ТАЕ-буфері (40 мМ TRIS-HCl, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ ЕДТА). Результати електрофорезу спостерігали під ультрафіолетовим транслюмінатором [12].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як показали результати досліджень, обрані олігонуклеотидні праймери, специфічні до бактерій *Y. ruckeri*, *F. columnarum*, *A. salmonicida* та *A. hydrophila* ампліфікували очікувані за розміром фрагменти ДНК. Розмір ампліконів становив близько 600, 200, 400 та 700 пар нуклеотидів (п.н.) відповідно (рис.). Олігонуклеотиди, специфічні до *Y. ruckeri*, *F. columnarum* та *A. hydrophila* підбиралися для ампліфікації фрагментів генів 16S рРНК, а олігонуклеотиди, специфічні до *A. salmonicida* — для ампліфікації фрагменту плазмідної ДНК.

Специфічність праймерів була підтверджена постановкою реакції, де в реакційну суміш з усіма олігонуклеотидами додавалась лише ДНК конкретної бактерії (див. рис.). В цих реакціях спостерігався лише один специфічний продукт очікуваного розміру.

Однак, в усіх варіантах дослідження не вдалось ампліфікувати фрагмент довжиною

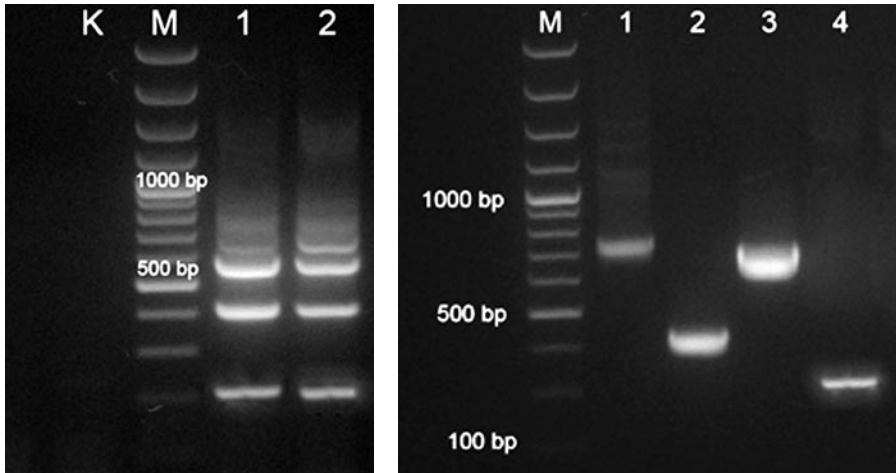


Рисунок. Специфічність мПЛР, розробленої для ідентифікації *R. salmoninarum*, *Y. ruckeri*, *F. columnarae*, *A. salmonicida* та *A. hydrophila*. М – 100 п.н. ДНК-маркер; К – контроль (реакційна суміш без ДНК); 1 — *A. hydrophila* (700 п.н.); 2 — *A. salmonicida* (400 п.н.); 3 — *Y. ruckeri* (600 п.н.); 4 — *F. columnarae* (200 п.н.); 1–2 (ліворуч) — мПЛР із чотирма патогенами разом

500 п.н., що є ділянкою гену, кодуючого поверхнево-клітинний білок розміром 57 кДа бактерії *R. salmoninarum*. Це можна пояснити тим, що ця бактерія не культивується на МПА і відповідно не була ізольована на щільному поживному середовищі. До того ж, як стверджують Chase, Pascho (1998) [13], відбір матеріалу для діагностики збудника бактеріальної хвороби нирок слід проводити з освітленої плазми крові, вільної від еритроцитів або безпосередньо з ниркової тканини. Відбір патологічного матеріалу для нашого дослідження включав бактеріологічні посіви на МПА з поверхні шкіри та зябер.

Здорова риба, без зовнішніх ознак захворювання, може бути носієм інфекційного збудника і поширювати його всередині популяції. Хронічні або латентні інфекції можуть проявлятися під дією стресових чинників навколишнього середовища, а в умовах сучасної інтенсивної аквакультури такий ризик є досить поширеним. Тому виявлення хвороботворних мікроорганізмів в популяціях об'єктів аквакультури — це важливий крок в контролі інфекційних захворювань. Порівняно із стандартними бактеріологічними методами, мПЛР значно швидша у виконанні. Тому ця методика є важливим інструментом в діагностиці таких найбільш поширених бактеріальних збудників інфекційних захворювань як

R. salmoninarum, *Y. ruckeri*, *F. columnarae*, *A. salmonicida* та *A. hydrophila*.

У літературі є повідомлення про використання мПЛР для ідентифікації різних вірусів та бактерій — збудників інфекційних захворювань риб [4, 14, 15]. У наших дослідженнях ми спробували об'єднати в одній реакції діагностику п'яти найпоширеніших бактеріальних патогенів. Як показали результати наших досліджень, запропонована нами методика дозволяє ідентифікувати *Y. ruckeri*, *F. columnarae*, *A. salmonicida* та *A. hydrophila* упродовж одного дня. У порівнянні з звичайними бактеріологічними дослідженнями, високоефективний метод мПЛР є більш швидким, точним, легким у використанні та економічним.

У подальших дослідженнях ми плануємо здійснити секвенс ампліфікованих фрагментів ДНК з метою проведення філогенетичного аналізу українських штамів досліджуваних бактерій та провести апробацію нашої методики зі збудником бактеріальної хвороби нирок — бактерією *R. salmoninarum*.

ВИСНОВКИ

Розроблено високочутливий метод мПЛР для експрес-діагностики бактеріальних збудників інфекційних захворювань риб *R. salmoninarum*, *Y. ruckeri*, *F. columnarae*, *A. salmonicida* та *A. hydrophila*.

Запропонований метод мПЛР є більш точним, легким у використанні та економним у порівнянні з традиційними бактеріологічними дослідженнями і дозволяє ідентифікувати п'ять бактеріальних патогенів упродовж одного дня.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Cunningam C.O.* Molecular diagnosis of fish and shellfish disease: present status and potential use in disease control // *Aquaculture*. — 2002. — Vol. 206. — P. 19–55.
2. *Altinok I., Kurt I.* Molecular diagnosis of fish diseases: a review // *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. — 2003. — Vol. 3. — P. 131–138.
3. *Woo P.T.K., Bruno D.W.* 2011. *Fish Diseases and Disorders*. Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI, 944 pp.
4. *Mata A.I., Gibello A., Casamayor A.* et al. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish // *App. Environ. Microbiol.* — 2004. — Vol. 70. — P. 3183–3187.
5. *Мусселує В.А., Ванятинський В.Ф., Вихман А.А.* и др. // *Лабораторный практикум по болезням рыб*. — М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. — 296 с.
6. *Sambrook J.* *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed / J. Sambrook, D.W. Russell. — New York: Cold Spring Harbour, 2001.
7. *Brown L.L., Iwama G.K., Evelyn P.T.P.* et al. Use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect DNA from *Renibacterium salmoninarum* within individual salmonid eggs // *Dis. Aquat. Org.* — 1994. — Vol. 65. — P. 171–199.
8. *Altinok I., Grizzle J.M., Liu Z.* Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of polymerase chain reaction // *Dis. Aquat. Org.* — 2001. — Vol. 44. — P. 29–34.
9. *Yeh H.-Y., Shoemaker C.A., Klesius P.H.* Sensitive and rapid detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus* by a loop-mediated isothermal amplification method // *J. App. Microbiol.* — 2006. — Vol. 100. — P. 919–925.
10. *Hiney M., Dawson M.T., Heery D.M.* et al. DNA probe for *Aeromonas salmonicida* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1992. — Vol. 58. — P. 1039–1042.
11. *Жук Л.В.* Ідентифікація бактерій роду *Aeromonas* методом полімеразної ланцюгової реакції / Л.В. Жук, Ю.П. Рудь // *Науковий вісник НУБіП України. Серія “Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва”* — 2012. — Вип. 172, Ч. 3. — С. 87–90.
12. *McPherson M.J.* *PCR. The basics: from background to bench* / M.J. McPherson, S.G. Moller. — New York: BIOS Scientific Publishers Ltd, 2000. — P. 276.
13. *Chase D.M., Pascho R.J.* Development of a nested polymerase reaction for amplification of a sequence of the p57 gene of *Renibacterium salmoninarum* that provides a highly sensitive method for detection of the bacterium in salmonid kidney // *Diseases of Aquatic Organisms*. — 1998. — Vol. 34. — P. 223–229.
14. *Cerro A., Marquez I., Guijarro J.A.* Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by Multiplex PCR // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2002. — Vol. 68, № 10. — P. 5177–5180.
15. *Brasher C.W., DePaola A., Jones D.D., Bej A.K.* Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR // *Curr. Microbiol.* — 1998. — Vol. 37. — P. 101–107.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В ЭКСПРЕСС ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РЫБ

Ю.П. Рудь, Л.В. Жук, І.Б. Владимирський

Разработан метод мультиплексной полимеразной цепной реакции (мПЦР) для идентификации самых распространенных бактериальных возбудителей инфекционных заболеваний рыб *Renibacterium salmoninarum*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium columnarae*, *Aeromonas salmonicida* и *Aeromonas hydrophila*. Показаны специфичность и эффективность олигонуклеотидных праймеров, а также преимущества предложенного метода над бактериологической диагностикой данных патогенов.

USE OF MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION IN RAPID DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES OF FISH

Yu. Rud, L. Zhuk, I. Vladymyrsky

The method of multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of major bacterial fish pathogens *Renibacterium salmoninarum*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium columnarae* was developed. The specificity and effectiveness of oligonucleotide primers and also the advantages of developed method in comparison with bacterial examination were shown.