

# СЕЛЕКЦІЯ, ГЕНЕТИКА ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

---

Ribogospod. nauka Ukr., 2016; 2(36): 48-64  
DOI: <http://dx.doi.org/10.15407/fsu2016.02.048>  
УДК 597-12:577.21.08

## СУЧАСНІ МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ РИБ (ОГЛЯД)

**О. В. Залоїло**, [zaloilo@if.org.ua](mailto:zaloilo@if.org.ua), Інститут рибного господарства НААН, м. Київ

**Ю. П. Рудь**, [rud@if.org.ua](mailto:rud@if.org.ua), Інститут рибного господарства НААН, м. Київ

**І. А. Залоїло**, [zaloilo@yahoo.com](mailto:zaloilo@yahoo.com), Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

**І. І. Грициняк**, [hrytsyniak@if.org.ua](mailto:hrytsyniak@if.org.ua), Інститут рибного господарства НААН, м. Київ

---

**Мета.** Молекулярні методи діагностики (ММД) поступово набувають широкого розповсюдження у сучасному рибництві. ММД містять широкий спектр специфічних підходів, кожен з яких має чіткі межі можливого застосування та характеризується індивідуальними особливостями у практичному виконанні.

Сучасна спеціальна література з даної теми переважно розглядає окремі методики у вузькому контексті завдань або практичні результати, одержані з допомогою таких підходів. Таким чином, узагальнення існуючої інформації про механізми дії, межі можливостей та типові проблеми основних методів молекулярної діагностики є актуальним завданням рибництва. Зокрема, такий опис дозволить більш ефективно обирати один чи декілька підходів для ідентифікації збудників захворювань риб.

**Результати.** У роботі розглянуто основні молекулярні методи, які застосовують у світовому рибництві для діагностики різних захворювань промислових риб.

**Наукова новизна.** Дана робота є узагальненням даних про принципи та механізми виконання діагностики на основі сучасних молекулярних методів. Для кожного з описаних підходів показано найбільш перспективні напрямки застосування. Інформація представлена у формі порівняльного аналізу методик із вказанням позитивних та негативних практичних аспектів кожної з них.

**Практична значимість.** Представлений огляд сучасних молекулярних методів діагностики у рибництві орієнтований на практичне застосування. Узагальнююча та аналітична інформація може бути використаною при плануванні поточкових та диференційованих діагностичних заходів (як оперативних, так і профілактичних), а також буде корисною при створенні комплексних діагностичних підходів загального та індивідуального характеру.

**Ключові слова:** методи молекулярної діагностики, ПЛР, ДНК, ампліфікація, хвороби риб.

---

## ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ ТА АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Молекулярні методи діагностики (ММД) мають високу діагностичну точність і водночас є більш простими у практичному виконанні порівняно з традиційними підходами ідентифікації патогенних організмів [1, 2]. Протягом останніх років спостерігається стрімка еволюція молекулярної діагностики захворювань у рибництві: зокрема, до її складу увійшла полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), рестрикційний аналіз, ДНК-мікрочіпування, *in situ*-гібридизація та

© О. В. Залоїло, Ю. П. Рудь, І. А. Залоїло, І. І. Грициняк, 2016



цикл опосередкованої ізотермічної ампліфікації [3–7]. Оскільки згадані способи дозволяють виявляти та ідентифікувати патогенні організми у риб-носіїв, їх можна використовувати не лише з метою діагностики, але і для профілактики спалахів захворювань. Застосування ММД дозволяє суттєво знизити навантаження від антибактеріальної терапії та виключає розвиток стійких штамів бактерій. У вітчизняному рибництві молекулярні методи діагностики захворювань не набули широкого використання. Однією з причин низького рівня застосування сучасних підходів на практиці є відсутність публікацій, що узагальнюють можливості даних методик саме у широкому діагностичному аспекті — більшість тематичних робіт присвячені вузькій проблематиці ММД та орієнтовані на аудиторію досвідчених спеціалістів. Дана робота містить загальний огляд сучасних ММД у рибництві з позицій їх функціональних можливостей, особливостей практичного виконання та доцільності застосування для конкретних клінічних випадків.

### **Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)**

Метод ПЛР дозволяє збільшити кількість фрагментів ДНК-мішені, що визначаються за допомогою двох праймерів, ДНК яких, у свою чергу, синтезується за допомогою термостабільних ДНК-полімераз [8, 9]. У результаті використання даного методу можна отримати у мільйон разів більше фрагментів ДНК. Отримані продукти ПЛР найчастіше ідентифікують шляхом електрофорезу в гелі. Ділянки ампліфікації при цьому налічують 150–3000 пар основ.

На чутливість та специфічність праймера впливає його хімічна будова та просторова структура. Отже, праймери повинні бути досить довгими для того, щоб витримати високу температуру відпалу і знизити можливість відпалу неспецифічних праймерів. Водночас, занадто довгі праймери сприяють неспецифічному відпалу, навіть коли ділянки ДНК є повністю комплементарними до послідовності праймера. У ПЛР використовується ДНК-матриця різних форм, від тканинного лізату до очищеної ДНК, а також праймери, полімерази-прискорювачі збірки копій ДНК та нуклеотиди для формування нових копій. З кожним етапом реакції у температурному циклі ДНК-матриця денатурується, відбувається відпал праймерів до комплементарних ділянок, і полімерази каталізують приріст нуклеотидів на кінцях кожного праймера. Таким чином збираються копії фрагментів ДНК. Теоретично, у кожному циклі приріст продуктів реакції має відбуватися у геометричній прогресії.

### *ПЛР зі зворотною транскрипцією*

Метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) використовується для ідентифікації РНК-вмісних вірусів, визначення специфічної мРНК та рівня експресії генів [10, 11]. Для кількісного аналізу рівня мРНК у дуже невеликих зразках полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією використовується при виконанні Нозерн-блот-аналізу та методу захисту від РНКаз [8, 12]. Фактично, ПЛР є достатньо чутливою для кількісної оцінки РНК у окремій клітині. За останні роки було розроблено методики для визначення продуктів ПЛР у реальному часі [13, 14]. Це призвело до широкого впровадження ЗТ-ПЛР як методу оцінки кількісних змін експресії генів у реальному часі. Крім того, полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією все частіше використовують і для перевірки результатів,



отриманих при виконанні інших аналізів. Чутливість і вибірковість, які досягаються при виконанні ЗТ-ПЛР, роблять цей метод ідеальним інструментом для моніторингу прихованих інфекцій.

Як і у випадку з еукаріотами, прокаріотичні гени рРНК теж містять висококонсервативні послідовності. Аналіз консервативних фрагментів генів, які кодуєть РНК, після ампліфікації, з подальшою ідентифікацією більш варіабельних генних або неінформативних послідовностей, дозволяє ідентифікувати бактерії, яких складно або неможливо розпізнати при культивуванні.

*Мультиплексна полімеразна ланцюгова реакція, мультипраймерна полімеразна ланцюгова реакція*

Нові розробки методу ПЛР дозволили визначити одночасно кілька патогенних організмів, що суттєво поліпшило і здешевило даний метод [15, 16]. При мультипраймерному ПЛР-аналізі використовують кілька пар праймерів і ампліфікують більше однієї цільової послідовності [17]. Даний метод допоможе заощадити час без зниження чутливості. З часу свого відкриття мультипраймерний аналіз було впроваджено у більшість галузей вивчення нуклеїнових кислот, у тому числі — у аналіз генних делецій, кількісний аналіз та процедури визначення РНК. У галузі діагностики інфекційних захворювань техніка виявилася ефективною при ідентифікації вірусів, бактерій, грибів і паразитів [18–22].

### Маркування та виявлення нуклеїнових кислот

Для аналізу нуклеїнових кислот існують різні системи їх маркування та виявлення. Традиційне використання радіоіотопів є небезпечним для дослідника, тому починають розвиватися і інші методи. Серед них варто відзначити маркування гаптенами, наприклад, біотином чи дигоксигеніном, та ідентифікацію за допомогою антитіл, зв'язаних флуоресцентними, хемілюмінесцентними або колориметричними мітками [23, 24, 25].

### Рестрикційний аналіз

Ферменти рестрикції (ендонуклеази рестрикції) розщеплюють ДНК у специфічній формі. Ферменти рестрикції типу 2, найбільш поширені при ДНК-аналізі та у генній інженерії, мають унікальну нуклеотидну послідовність, яка дозволяє їм «розрізати» ДНК. Деякі ферменти рестрикції розщеплюють ДНК лише за певною послідовністю, яка найчастіше складає 6 пар паліндромного ланцюга, інші здатні розщеплювати 4 або навіть 8 різних пар послідовностей [25, 26]. Найчастіше ендонуклеази рестрикції використовуються для створення «відбитків пальців» конкретної молекули ДНК [27]. Оскільки фермент має специфічну будову, він розрізає ДНК на окремі фрагменти, які потім можна розділити за допомогою електрофорезу в гелі. Система впорядкованих ДНК-фрагментів формує своєрідні «відбитки пальців» ДНК, що дозволяють персоніфікувати будь-яку окрему молекулу. Інші ферменти рестрикції також можуть використовуватися для подальшої характеристики конкретної молекули ДНК. Місцезнаходження зон розщеплення після дії ферментів рестрикції є основою для складання генної мапи. Такі інформаційні банки конче потрібні для ідентифікації та опису окремої ДНК-плазмиди або її ділянки.



*Поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів (RFLP)*

Ферменти рестрикції визначають специфічні короткі послідовності ДНК і розщеплюють молекулу в конкретних місцях. Зміни в окремому нуклеотиді призводять до появи або втрати місця розрізання, тому кількість одержуваних фрагментів суттєво залежить від будови та структурної стабільності рестриктора [28–30]. Поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів (RFLP) можна побачити за допомогою електрофорезу ДНК у гелі. Інформативність відмінностей RFLP-профілів стала революцією у криміналістичних дослідженнях, поступово перетворюючись на потужний інструмент для ідентифікації батьківства, в популяційній генетиці та діагностики різних захворювань [31].

Загалом, RFLP є методом диференціювання організмів на основі відмінностей моделі, отриманої в результаті розщеплення ДНК. Якщо у двох організмів є відмінності за відстанню між місцями розщеплення, довжина ДНК-фрагментів, утворених після дії ендонуклеаз рестрикції, також буде відрізнятися. Принципи подібності експериментального набору фрагментів застосовують при встановленні видової приналежності (або навіть розрізнення породи і штаму). Виділення достатньої кількості ДНК для проведення RFLP вимагає багато часу і зусиль. Для пришвидшення процесу генотипування RFLP використовують у комплексі з методом ПЛР у підготовчій фазі [32].

*Поліморфізм довжин ампліфікованих фрагментів (AFLP)*

Оперативний метод типування прокаріот та еукаріот на основі ПЛР. Принцип дії AFLP базується на швидкій і високовідтворюваній селективній ампліфікації геномних рестрикційних фрагментів цілого геному [33]. Відібрані маркери ампліфікують за допомогою ПЛР, яка робить AFLP легким і швидким інструментом для ідентифікації штамів, порід і сортів. AFLP-аналіз є одним з методів вибіркової ампліфікації, який виконується на основі лігування адаптерів геномними рестрикційними фрагментами та подальшої ПЛР-ампліфікації з адаптерспецифічними праймерами. Для AFLP-аналізу необхідна невелика кількість очищеної геномної ДНК; вона розщеплюється двома ферментами рестрикції, один з яких характеризується середньою частотою розщеплення (наприклад, EcoRI), а другий — високою частотою розщеплення (наприклад, MseI або TaqI). Двоспіральні олігонуклеотидні адаптери створюються таким чином, щоб первинне місце рестрикції не відновлювалось після лігування. Це дозволяє синхронізувати рестрикцію і лігування, поки повторно лігвані фрагменти знову розщеплюються. Одержана у результаті аліквотна проба піддається двом послідовним ПЛР-ампліфікаціям у жорстких умовах зі специфічним до адаптера праймером, який на 3'-кінці має утворення з одного або трьох нуклеотидів, яке буде контактувати з невідомим хромосомним рестрикційним фрагментом [34, 35]. Альтернативна процедура AFLP-типуювання заснована на одному ферменті з одиничним адаптером та аналізі за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Головне поліпшення цієї технології полягає у переході від радіоактивних міток до флуоресцентних праймерів при визначенні фрагментів у автоматичній послідовності. Крім того, показано, що для дрібних геномів бактерій і грибів досить одиничної ПЛР-ампліфікації з 1–2 селективними нуклеотидами на обох праймерах, що суттєво спрощує процедуру діагностики [36].



### ПЛР з випадковою ампліфікацією поліморфної ДНК (RAPD)

Технічно складний метод RAPD був застосований для вивчення гриба, що викликає чуму рака *Astacus astaci* [37]. У RAPD використовують одиничний праймер у м'яких умовах ПЛР. Випадкове зв'язування праймерів призводить до утворення фрагментів різного розміру у зразках з неідентичними ДНК. Застосування методу дозволяє групувати різні ізоляти грибів, і таким чином забезпечувати ґрунт для епідеміологічних досліджень [38]. Під час серйозних втрат дикої та господарської риби в Азії RAPD допоміг ідентифікувати патогенні види *Aphanomyces* [39]. Інші патогенні організми також можуть досліджуватися за допомогою даного методу, однак проблеми з відтворюваністю результатів та ризиком забруднення обмежують його використання у якості самостійного. Тим не менш, RAPD є цілком придатним на першому етапі розробки специфічних праймерів або проб, і, таким чином, ефективно застосовується у діагностиці бактерій [40].

### ДНК-мікрочіпи

Існує ряд варіантів використання ДНК-мікрочіпів для визначення унікальних ДНК або РНК послідовностей. Один з методів передбачає маркування всіх ДНК послідовностей аналізованої проби [41]. Зразок ДНК, призначений для гібридизації до мікрочіпів, має специфічні флуоресцюючі місця, які виявляються за допомогою спеціального обладнання та комп'ютерних програм. Часто буває більш доцільно використовувати конкурентну гібридизацію, при якій аналізований зразок конкурує за гібридизацію до зв'язаного з чіпом олігонуклеотидом з флуоресцюючим конкурентним олігонуклеотидом [5]. У випадку ідеальної комплементарності експериментальної ДНК у пробі до зв'язаного олігонуклеотиду, вона гібридується з чіпом. У іншому випадку, конкурентний флуоресцюючий олігонуклеотид зміщує ДНК зразок і сам гібридується до олігонуклеотиду чіпа. Детектор та комп'ютерна програма можуть аналізувати флуоресцентні ряди за присутністю або відсутністю специфічної видової ДНК-послідовності. У порівнянні з традиційною гібридизацією нуклеїнових кислот з мембранами, мікрочіпування має ряд додаткових переваг, зокрема, високу густину сигналу, чутливість, можливість автоматизації процесу і низький рівень фону [42]. Мікрочіпи можуть стати оптимальним інструментом для проведення діагностики у великих масштабах. Вони дозволяють аналізувати зразок за багатьма послідовностями одночасно. Реалізація даного методу значно спрощена, оскільки більшість генетичних послідовностей патогенних мікроорганізмів вже сьогодні є доступними в генетичному банку «GenBank» [43]. Це дає можливість створювати і вводити до складу мікрочіпу олігонуклеотидні проби, комплементарні до будь-яких відомих патогенів. Таким чином, при використанні одного мікрочіпу можна виявити одразу декілька збудників захворювання. Технологія мікрочіпування не потребує високої консервативності генетичної послідовності, оскільки увесь спектр послідовностей у різних популяціях загальної функціональної групи може міститися у матриці і використовуватися як проби для моніторингу заразних захворювань риб, зокрема — у фазі відсутності симптомів. Велика кількість проб на матриці може встановити присутність гена у зразку чи його участь у експресії. Даний тип матриці особливо підходить для вивчення патогенних організмів, коли присутність певних генів і їх продуктів може підтверджувати або спростовувати



їх наявність та активність [44, 45]. Первинна вартість мікрочіпування ДНК є досить високою, однак після придбання необхідного обладнання і мікрочіпів витрати на одну пробу мінімізуються. Процедура аналізу не потребує багато часу. У майбутньому технологія мікрочіпів буде активно застосовуватися у діагностиці захворювань риб, особливо у асимптоматичній фазі [42].

### *In situ*-гібридація

ПЛР в умовах *in situ* стала потужним інструментом у біологічних дослідженнях та клінічній практиці. Цей метод суттєво покращив розуміння патогенезу інфекційних захворювань та поліпшив їх діагностику [46, 47]. *In situ*-ЗТ-ПЛР, завдяки високочутливому виявленню мінімальної експресії генів у клітині, дозволила вивчати зразки більш детально. Межі застосування даного методу ПЛР *in situ* лімітуються його низькою чутливістю, невеликими показниками відтворюваності та високим фоном. Крім того, багато методів, які використовуються для візуалізації результатів ПЛР-ампліфікації у клітині чи тканинах, передбачають застосування радіоактивних міток, що робить дану технологію не лише трудомісткою й витратною, а й небезпечною. Незважаючи на згадані недоліки, в цілому методика вважається перспективною і дослідники активно працюють над її модернізацією. Так, сьогодні створено метод специфічного флуоресцентного виявлення експресії генів у *in situ*-ЗТ-ПЛР, який дозволяє визначати низький рівень експресії генів у тканинах з дуже незначним фоном інтерференції [48]. Потенційною сферою впровадження *in situ*-ЗТ-ПЛР виступає діагностика вірусів та інших інфекційних агентів у специфічній клітинній культурі, опис пухлинних клітин у тканинах, діагностика генетичних мутацій у спадковому захворюванні та визначення експресії генів на рівні тканин [49, 50].

У ході флуоресцентної *in situ*-гібридації (FISH), здійснюється маркування клітин і хромосом, відповідно до послідовностей нуклеїнових кислот у їх складі. У ході цього процесу беруться флуоресцентні мітки, а також РНК- або ДНК-зонди, які складаються приблизно з 20 нуклеотидів. Зонди інкубуються у присутності клітин в умовах, необхідних для здійснення специфічної гібридації проби з експериментальною нуклеїновою кислотою. Тип клітин, які містять рибосоми з комплементарними РНК-послідовностями, маркуються при зв'язуванні *in situ* з флуоресцентним зондом. Мічені клітини можна побачити за допомогою проточної цитометричної або флуоресцентної мікроскопії [51].

### **Цикл опосередкованої ізотермічної ампліфікації (LAMP)**

Цикл опосередкованої ізотермічної ампліфікації (LAMP) є новим методом, при якому ДНК ампліфікують з високою специфічністю, ефективністю і швидкістю в умовах постійної температури [52]. У поєднанні зі зворотною транскрипцією LAMP дозволяє з високою ефективністю ампліфікувати РНК-послідовності. Даний метод базується на автоматичному циклі синтезу ДНК-ланцюга зі зміщенням при використанні ДНК-полімераз з високою активністю зсуву і чотирьох спеціально створених праймерів. За допомогою чотирьох праймерів, які умовно поділяють на внутрішні і зовнішні, визначають шість окремих послідовностей ДНК-мішені, суттєво підвищуючи при цьому специфічність реакції. Остання протікає в ізотермічних умовах, оскільки денатурація ланцюгів відбувається за рахунок їх зміщення [53].



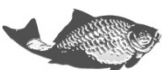
На початковому етапі у LAMP-реакції беруть участь усі чотири праймери, однак, у подальшому циклі реакції для зміщення ланцюга ДНК під час синтезу залучаються лише внутрішні праймери. Сама реакція ініціюється внутрішніми праймерами, які містять поліморфні та неінформативні послідовності ДНК-мішені. Вивільнення одноланцюгової ДНК відбувається за допомогою зовнішнього праймера. Одержаний ланцюг використовується як шаблон для синтезу ДНК, що запускається іншою парою внутрішнього і зовнішнього праймерів, які гібридизуються до протилежного кінця мішені. Даний процес приводить до формування ланцюга ДНК з петлею. На наступних етапах LAMP-циклу, один внутрішній праймер гібридизує петлю продукту і запускає зміщення синтезованого ланцюга ДНК, що викликає утворення нового вигину ДНК з петлею. Цикл триває приблизно протягом 1 години і призводить до утворення  $\approx 10^9$  копій ДНК-мішені. Кінцевий продукт реакції у просторовій конфігурації є ланцюгами ДНК з петлями різної довжини, які складаються з декількох перевернутих повторюваних послідовностей оригінального ДНК-шаблону [54].

#### *Візуалізація продуктів ампліфікації*

Для візуалізації кінцевого продукту LAMP-реакції можуть використовуватися кілька методів. Найчастіше застосовується візуалізація за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. При цьому агарозний гель фарбують бромистим етидієм, SYBR Green I чи іншими барвниками. Оскільки кінцевий продукт складається з ланцюгів різної довжини з численними петлями ДНК, електрофорез в агарозному гелі визначає продукти з мінімальною кількістю копій ДНК-мішені у лунці, що виглядають як мазок у верхній частині петлі в основі гелю [55]. LAMP-реакція дозволяє синтезувати надзвичайно велику кількість ДНК. Додавання барвника SYBR Green I до реакційної пробірки дає можливість візуалізувати продукти за допомогою приладу для УФ-просвічування флуоресціюючих у світлі або світлопоглинаючих об'єктів [56].

Інший спосіб передбачає накопичення великої кількості побічних продуктів реакції. У LAMP-реакції утворюється велика кількість побічних продуктів, іонів пірофосфату, від яких у реакційній суміші утворюється білий осад пірофосфату магнію. За присутністю чи відсутністю білого осаду встановлюють необхідність ампліфікації зразка ДНК. Оскільки у ході реакції густина розчину зростає, для детектування її закінчення можна використовувати колориметрію [57].

Перевага LAMP полягає у високій ефективності ампліфікації ДНК. Межа визначення в LAMP становить кілька копій, при цьому результати корелюють з ПЛР. Слід зазначити, що присутність у робочих розчинах сторонніх ланцюгів ДНК не чинить істотного впливу на загальну чистоту результату експерименту. LAMP є простим, легким і високоселективним методом. Крім того, він є високоспецифічним для експериментального об'єкта, тому що використовує чотири праймери, націлені одночасно на багато ланок однієї послідовності. Для виконання аналізу (після приготування відповідних праймерів) необхідна лише лабораторна водяна баня або температурний блок для реакції. У сукупності зі зворотною транскрипцією метод є цілком придатним і для ампліфікації РНК. До основних недоліків LAMP можна віднести високу ймовірність забруднення ампліфікованого продукту у подальших циклах та технологічну неможливість застосування мультиплексної ПЛР до продуктів LAMP [52, 58].



## ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ

Крім високої чутливості і можливості оперативної діагностики, головною перевагою молекулярних методів дослідження є визначення некультивованих інфекційних агентів. ДНК-ампліфікація дозволяє ідентифікувати патогенний мікроорганізм у дуже малих кількостях навіть при наявності мінімального об'єму проби. Молекулярні методи надають можливість діагностики інфекцій у латентній фазі розвитку, ідентифікації збудника інфекції тощо [1, 5, 59]. Дані методи дозволяють встановлювати відмінності патогенних мікроорганізмів від схожих антигенних структур. Основним недоліком описаних підходів є дорожнеча супутнього обладнання та реактивів. Однак, в умовах рибовирощувального підприємства інвестиції у засоби молекулярної діагностики є не лише перспективними, а й економічно вигідними [17, 42, 52].

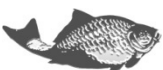
## ЛІТЕРАТУРА

1. Walker P. DNA-based Molecular Diagnostic Techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases / P. Walker, R. P. Subasinghe // FAO Fisheries Technical Paper. — 2000. — № 395. — 93 p.
2. Amos K. H. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens / Amos K. H. — Corvallis, Oregon, 1985. — 114 p.
3. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a nucleoprotein gene sequence of infectious hematopoietic necrosis virus / C. K. Arakawa, R. J. Deering, K. H. Higman [et al.] // Dis. Aquat. Org. — 1990. — Vol. 8. — P. 165—170.
4. Щелкунов И. С. Новые перспективы в диагностике вирусных болезней рыб: разработка тест-систем для выявления возбудителя весенней виремии карпа на основе методов анализа генома / И. С. Щелкунов, С. Ф. Орешкова. — М., 2006. — 112 с.
5. Zaloilo I. A. Application of DNA microarrays in a modern fish-farming / I. A. Zaloilo, O. V. Zaloilo, L. P. Buchatskiy // Biotechnologia Acta. — 2015. — Vol. 8, № 4. — P. 9—20.
6. Fluorescent *In Situ* Hybridization Protocol for Xist RNA Combined with Immunofluorescence of Histone Modification in X-chromosome Inactivation / M. Yue, J. L. Charles Richard, N. Yamada [et al.] // J. Vis. Exp. — 2014. — Vol. 93. — P. 9—20.
7. Soliman H. Detection of fish pathogens by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique / H. Soliman, M. Saleh, M. El-Matbouli // Methods Mol Biol. — 2015. — Vol. 1247 — P. 163—173.
8. ПЦР в реальном времени / [Ребриков Д. В., Саматов Г. А., Трофимов Д. Ю. и др.]. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. — 215 с.
9. *In vitro* probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* from Tunisian freshwater fishes / R. El-Jeni, M. El Bour, P. Calomata [et al.] // Can J Microbiol. — 2016. — Vol. 62(1). — P. 60—71.
10. Зорина В. В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР) : методическое пособие / Зорина В. В. — М. : ДНК-технология, 2012. — 80 с.
11. Expression of mep50 in adult and embryos of medaka fish (*Oryzias latipes*) / N. Cheng, M. Guo, P. Chang [et al.] // Fish Physiol Biochem. — 2016. — Jan. 9. — P. 1—9.

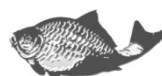




12. Жимулев И. Ф. Общая и молекулярная генетика : учеб. пособие / Жимулев И. Ф. — Новосибирск : Изд-во Новосиб. ун-та, 2002. — 459 с.
13. Interlaboratory Validation for a Real-Time PCR Salmonella Detection Method Using the ABI 7500 FAST Real-Time PCR System / C. M., Cheng T. Doran, W. Lin [et al.] // *J Food Prot.* — 2015. — Vol. 78(6). — P. 1119—1124.
14. A novel multiplex RT-qPCR method based on dual-labelled probes suitable for typing all known genotypes of viral haemorrhagic septicaemia virus / D. Vázquez, C. López-Vázquez, H. F. Skall [et al.] // *J Fish Dis.* — 2015. — Vol. 38(7). — P. 675—679.
15. Tabarestani S. Detection of Gene Amplification by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification in Comparison with *In Situ* Hybridization and Immunohistochemistry / S. Tabarestani, S. Ghaderian, H. Rezvani // *Asian Pac J Cancer Prev.* — 2015. — Vol. 16(17). — P. 7997—8002.
16. Gold-nanoparticle based electrochemical DNA sensor for the detection of fish pathogen *Aphanomyces invadans* / G. C. Kuan, L. P. Sheng, P. Rijiravanich [et al.] // *Talanta.* — 2013. — Vol. 117. — P. 312—317.
17. Евсегнеева Ж. В. Разработка и применение ПЦР-технологий для молекулярно-генетической диагностики герпесвирусов : дисс. ... кандидата биол. наук / Евсегнеева Жанна Виталиевна. — М., 2012. — 118 с.
18. An N-targeting real-time PCR strategy for the accurate detection of spring viremia of carp virus / L. Shao, Y. Xiao, Z. He [et al.] // *J Virol Methods.* — 2016. — Vol. 229. — P. 27—34.
19. Igbinsosa E. O. Detection and Antimicrobial Resistance of *Vibrio* Isolates in Aquaculture Environments: Implications for Public Health / E. O. Igbinsosa // *Microb Drug Resist.* — 2015. — 5. — [Epub ahead of print].
20. Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment / C. K. Tsui, J. Woodhall, W. Chen [et al.] // *IMA Fungus.* — 2011. — Vol. 2(2). — P. 177—189.
21. Molecular tools for the detection and identification of *Ichthyobodo* spp. (*Kinetoplastida*), important fish parasites / T. E. Isaksen, E. Karlsbakk, O. Repstad [et al.] // *Parasitol Int.* — 2012. — Vol. 61(24). — P. 675—683.
22. Marking of specific sequences in double-stranded DNA molecules-SNP detection and direct observation / Y. Shigemori, H. Haruta, T. Okada [et al.] // *Genome Res.* — 2004. — Vol. 14(12). — P. 2478—2485.
23. Zhang Y. Marking and detection of DNA of leptospire in the dot-blot and situ hybridization with digoxigenin-labelled probes / Y. Zhang, B. Dai // *Journal of West China University of Medical Sciences.* — 1992. — Vol. 23(4). — P. 353—357.
24. A comparison of several immunocytochemical detection systems using reflection-contrast and electron microscopy / A. F. Cremers, N. Jansen in de Wal, J. Wiegant [et al.] // *Histochemistry.* — 1987. — Vol. 86(6). — P. 609—615.
25. Kołodziejcki D. The extended version of restriction analysis approach for the examination of the ability of low-molecular-weight compounds to modify DNA in a cell-free system / D. Kołodziejcki, A. Brillowska-Dąbrowska, A. Bartoszek // *Food Chem Toxicol.* — 2015. — Vol. 75. — P. 118—127.
26. A molecular switch sensor for detection of PRSS1 genotype based on site-specific DNA cleavage of restriction endonuclease / Q. Liu, F. Gao, S. Weng [et al.] // *Ann Clin Lab Sci.* — 2015. — Vol. 45(2). — P. 128—133.



27. Microbial fingerprinting detects intestinal microbiota dysbiosis in Zebrafish models with chemically-induced enterocolitis / Q. He, L. Wang, F. Wang [et al.] // BMC Microbiol. — 2013. — Vol. 26. — 26050.
28. Application of polymerase chain reaction—restriction fragment length polymorphism and lab-on-a-chip technology to the identification of fishspecies from Bohai Bay / X. Li, Y. Qu, P. Zhang [et al.] // Se Pu. — 2011. — Vol. 29(7). — P. 673—676.
29. Rapid estimation of microbial populations in fish samples by using terminal restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA / Y. Tanaka, H. Takahashi, N. Kitazawa, B. Kimura [et al.] // J Food Prot. — 2010. — Vol. 73(1). — P. 104—113.
30. Nilsson W. B. Detection and identification of bacterial pathogens of fish in kidney tissue using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes / W. B. Nilsson, M. S. Strom // Dis Aquat Organ. — 2002. — Vol. 48(3). — P. 175—185.
31. Identification of fish-parasitic *Myxobolus (Myxosporea)* species using a combined PCR-RFLP method / E. Eszterbauer, M. Benko, A. Dán [et al.] // Dis Aquat Organ. — 2001. — Vol. 44(1). — P. 35—39.
32. Артамонова В. С. Генетические методы в лососеводстве и форелеводстве от традиционной селекции до нанобиотехнологий / В. С. Артамонова, А. А. Махров. — М. : Товарищество научных изданий КМК, 2015. — 128 с.
33. Ransom D. G. Mapping zebrafish mutations by AFLP / D. G. Ransom, L. I. Zon // Methods Cell Biol. — 1999. — Vol. 60. — P. 195—211.
34. Li T. The advancement of AFLP technology / T. Li // Sheng Wu Yong Cheng Xue Bao. — 2006. — Vol. 22(5). — P. 861—865.
35. An improved protocol for the production of AFLP markers in complex genomes by means of capillary electrophoresis / R. Papa, M. Troggio, P. Ajmone-Marsan [et al.] // J Anim Breed Genet. — 2005. — Vol. 122(1). — P. 62—68.
36. Rapid identification of pathogenic bacteria by single-enzyme amplified fragment length polymorphism analysis // N. Velappan, J. L. Snodgrass, J. R. Hakovirta [et al.] // Diagn Microbiol Infect Dis. — 2001. — Vol. 39(2). — P. 77—83.
37. Distribution and epidemiology of genotypes of the crayfish plague agent *Aphanomyces astaci* from noble crayfish *Astacus astacus* in Finland / S. Viljamaa-Dirks, S. Heinikainen, H. Torssonen [et al.] // Dis Aquat Organ. — 2013. — Vol. 103(3). — P. 199—208.
38. An improved isolation method for the cultivation of the crayfish plagues fungus, *Aphanomyces astaci* / B. Oidtmann, I. Schmid, D. Rogers [et al.] // Freshw Crayfish. — 1999. — Vol. 12. — P. 303—312.
39. Lilley H. Characterization of *Aphanomyces invadans* by electrophoretic and Western blot analysis / H. Lilley, K. D. Thompson, A. Adams // Dis Aquat Org. — 1997. — Vol. 30. — P. 187—197.
40. Залоїло О. В. Основні аспекти використання RAPD методу в рибицтві / О. В. Залоїло // Збірник наукових праць ПДАТУ. — 2012. — Вип. 20. — С. 83—85. — (Серія : Технологія виробництва і переробки продуктів тваринництва).
41. Schena M. Genome analysis with gene expression microarrays / M. Schena // Bioessays. — 1996. — Vol. 18(5). — P. 427—431.



42. Bumgarner R. DNA microarrays: Types, Applications and their future / R. Bumgarner // *Curr. Prot. Mol. Biol.* — 2013. — Jan; Chapter 22. — doi: 10.1002/0471142727.mb2201s101.
43. The National Center for Biotechnology Information. GenBank Overview [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>.
44. Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination / J. Y. Byon, T. Ohira, I. Hirono [et al.] // *Fish Shellfish Immunol.* — 2005. — Vol. 18(2). — P. 135—147.
45. Microarray analysis of gene expression in the bluecatfish liver reveals early activation of the MHC class I pathway after infection with *Edwardsiella ictaluri* / E. Peatman, J. Terhune, P. Baoprasertkul [et al.] // *Mol. Immunol.* — 2008. — Vol. 45(2). — P. 553—566.
46. Examination of the early infection stages of koi herpesvirus (KHV) in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio L.* using *in situ* hybridization / S. J. Monaghan, K. D. Thompson, A. Adams [et al.] // *J Fish Dis.* — 2015. — Vol. 5. — P. 477—489.
47. Gupta A. Detection of micro RNAs in cultured cells and paraffin-embedded tissue specimens by *in situ* hybridization / A. Gupta, Y. Y. Mo // *Methods Mol Biol.* — 2011. — Vol. 676. — P. 73—83.
48. Detection of stem cell factor mRNA expression in leukemic cells by *in situ* reverse transcriptase-PCR / B. Wu, X. L. Liu, W. L. Xuan [et al.] // *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* — 2002. — Vol. 22(6). — P. 490—492.
49. Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas: identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE) / P. Argani, C. Iacobuzio-Donahue, B. Ryu [et al.] // *Clin Cancer Res.* — 2001. — Vol. 7(12). — P. 3862—3868.
50. Croftwell P. L. Expression of *bmp2a* and *bmp2b* in late-stage zebrafish median fin development / P. L. Croftwell, A. R. Sommervold, P. M. Mabee // *Gene Expr Patterns.* — 2004. — Vol. 5(2). — P. 291—296.
51. Two-color fluorescent *in situ* hybridization using chromogenic substrates in zebrafish / J. A. Schumacher, E. J. Zhao, M. J. Kofron [et al.] // *Biotechniques.* — 2014. — Vol. 57(5). — P. 254—256.
52. Loop-mediated isothermal amplification of DNA / T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 2000. — Vol. 28(12). — E63.
53. Rapid detection of a fish iridovirus using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) / C. M. Caipang, I. Haraguchi, T. Ohira [et al.] // *J Virol Methods.* — 2004. — Vol. 121(2). — P. 155—161.
54. El-Matbouli M. Rapid diagnosis of *Tetracapsuloides bryosalmonae*, the causative agent of proliferative kidney disease (PKD) in salmonid fish by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) / M. El-Matbouli, H. Soliman // *Parasitol Res.* — 2005. — Vol. 96(5). — P. 277—284.
55. Capillary electrophoresis with lamp-based wavelength-resolved fluorescence detection for the probing of protein conformational changes / B. J. Kort, G. A. Kate, G. J. Jong. [et al.] // *Anal Chem.* — 2011. — Vol. 83(15). — P. 6060—6067.
56. Selection of fluorescent DNA dyes for real-time LAMP with portable and simple optics / G. Seyrig, R. D. Stedtfeld, D. M. Turlousse [et al.] // *J Microbiol Methods.* — 2015. — Vol. 119. — P. 223—227.



57. Li B. Adapting enzyme-free DNA circuits to the detection of loop-mediated isothermal amplification reactions / B. Li, X. Chen, A. D. Ellington // *Anal Chem.* — 2012. — Vol. 84(19). — P. 371—377.
58. Ushikubo H. Principle of LAMP method – a simple and rapid gene amplification method / H. Ushikubo // *Uirusu.* — 2004. — Vol. 54(1). — P. 107—112.
59. Індикація і ідентифікація деяких особливо небезпечних вірусів риби методом ПЦР / Е. А. Зав'ялова, Н. Ю. Кандріна, Н. Ф. Ломакіна [і др.] // *Рибоводство і рибне господарство.* — 2015. — № 3. — С. 21—25.

## REFERENCES

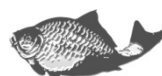
1. Walker, P., & Subasinghe, R. P. (2000). DNA-based Molecular Diagnostic Techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, 395, 93.
2. Amos, K. H. (1985). *Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens*. 3-rd Ed. Corvallis, Oregon.
3. Arakawa, C. K., Deering, R. J. J., & Higman, K. H. et al. (1990). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a nucleoprotein gene sequence of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 8, 165-170.
4. Shchelkunov, I. S., & Oreshkova, S. F. (2006). *Novye perspektivy v diagnostike virusnykh bolezney ryb: razrabotka test-sistem dlya vyyavleniya vzbudatelya vesenney viremii karpa na osnove metodov analiza genoma*. Moskva.
5. Zaloilo, I. A., Zaloilo, O. V., & Buchatskiy, L. P. (2015). Application of DNA microarrays in a modern fish-farming. *Biotechnologia Acta*, 8, 4, 9-20.
6. Yue, M., Charles Richard, J. L., Yamada, N., Ogawa, A., & Ogawa, Y. Quick. (2014). Fluorescent In Situ Hybridization Protocol for Xist RNA Combined with Immunofluorescence of Histone Modification in X-chromosome Inactivation. *J. Vis. Exp.*, 93, e52053, doi:10.3791/52053.
7. Soliman, H., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2015). Detection of fish pathogens by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique. *Methods Mol Biol.* 2015;1247, 163-73. doi: 10.1007/978-1-4939-2004-4\_12.
8. Rebrikov, D. V., Samatov, G. A., Trofimov, D. Yu., Semjonov, P. A., Savilova, A. M., Kofiadi, I. A., & Abramov, D. D. (2009). *PTsR v real'nom vremeni*. Moskva : BINOM Laboratoriya znany.
9. El-Jeni, R., El Bour, M., Calo-Mata, P., Böhme, K., Fernández-No, I. C., Barros-Velázquez, J., Bouhaouala-Zahar, B., & Can, J. (2016). *In vitro* probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* from Tunisian freshwater fishes. *Microbiol.*, 62(1), 60-71. doi: 10.1139/cjm-2015-0481. Epub 2015 Oct 26. PMID: 26651241.
10. Zorina, V. V. (2012). *Osnovy polimeraznoy tsepnoy reaktsii (PTsR). Metodicheskoe posobie*. Moskva : DNK-tehnologiya.
11. Cheng, N., Guo, M., Chang, P., Zhang, X., Zhang, R., Qi, C., Zhong, X., Zhou, Q., & Zhao, H. (2016). Expression of mep50 in adult and embryos of medaka fish (*Oryzias latipes*). *Fish Physiol Biochem.*
12. Zhimulev, I. F. (2002). *Obshchaya i molekulyarnaya genetika*. Novosibirsk: Izd-vo Novosib. un-ta.
13. Cheng, C. M., Doran, T., Lin, W., Chen, K. S., Williams-Hill, D., & Pamboukian, R. (2015). Interlaboratory Validation for a Real-Time PCR Salmonella Detection



- Method Using the ABI 7500 FAST Real-Time PCR System. *J Food Prot.* 78(6), 1119-1124. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-244.
14. Vázquez, D., López-Vázquez, C., Skall, H. F., Mikkelsen, S. S., Olesen, N. J., & Dopazo, C. P. (2015). A novel multiplex RT-qPCR method based on dual-labelled probes suitable for typing all known genotypes of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Fish Dis.*, May 7. doi: 10.1111/jfd.12381.
  15. Tabarestani, S., Ghaderian, S. M., & Rezvani, H. (2015). Detection of Gene Amplification by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification in Comparison with *In Situ* Hybridization and Immunohistochemistry. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 16(17), 7997-8002.
  16. Kuan, G. C., Sheng, L. P., Rijiravanich, P., Marimuthu, K., Ravichandran, M., Yin, L. S., Lertanantawong, B., & Surareungchai, W. (2013). Gold-nanoparticle based electrochemical DNA sensor for the detection offish pathogen *Aphanomyces invadans*. *Talanta*, 117, 312-317. doi: 10.1016/j.talanta.2013.09.016. Epub 2013 Sep 19.
  17. Evsegneeva, Zh. V. (2012). Razrabotka i primeneniye PTsR-tekhnologiy dlya molekulyarno-geneticheskoy diagnostiki gerpesvirusov. *Candidate's thesis*. Moskva.
  18. Shao, L., Xiao, Y., He, Z., & Gao, L. (2016). An N-targeting real-time PCR strategy for the accurate detection of spring viremia of carp virus. *J Virol Methods*, 229, 27-34. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.12.008.
  19. Igbinoza, E. O. (2015). Detection and Antimicrobial Resistance of *Vibrio* Isolates in Aquaculture Environments: Implications for Public Health. *Microb Drug Resist.*, 5.
  20. Tsui, C. K., Woodhall, J., Chen, W., Lévesque, C. A., Lau, A., Schoen, C. D., Baschien, C., Najafzadeh, M. J., & de Hoog, G. S. (2011). Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. *IMA Fungus.*, 2(2), 177-189. doi: 10.5598/imafungus.
  21. Isaksen, T. E., Karlsbakk, E., Repstad, O., & Nylund, A. (2012). Molecular tools for the detection and identification of *Ichthyobodo* spp. (*Kinetoplastida*), important fish parasites. *Parasitol Int.*, 61(4), 675-683. doi: 10.1016/j.parint.
  22. Shigemori, Y., Haruta, H., Okada, T., & Oishi, M. (2004). Marking of specific sequences in double-stranded DNA molecules-SNP detection and direct observation. *Genome Res.*, 14(12), 2478-2485.
  23. Zhang, Y., & Dai, B. (1992). Marking and detection of DNA of leptospire in the dot-blot and situ hybridization with digoxigenin-labelled probes. *Journal of West China University of Medical Sciences: Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 23(4), 353-357.
  24. Cremers, A. F., Jansen in de Wal, N., Wiegant, J., Dirks, R. W., Weisbeek, P., van der Ploeg, M., & Landegent, J. E. (1987). Non-radioactive in situ hybridization. A comparison of several immunocytochemical detection systems using reflection-contrast and electron microscopy. *Histochemistry*, 86(6), 609-615.
  25. Kołodziejwski, D., Brillowska-Dąbrowska, A., & Bartoszek, A. (2015). The extended version of restriction analysis approach for the examination of the ability of low-molecular-weight compounds to modify DNA in a cell-free system. *Food Chem Toxicol.*, 75, 118-127. doi: 10.1016/j.fct.2014.11.016.
  26. Liu, Q., Gao, F., Weng, S., Peng, H., Lin, L., Zhao, C., & Lin, X. (2015). A molecular switch sensor for detection of PRSS1 genotype based on site-specific DNA cleavage of restriction endonuclease. *Ann Clin Lab Sci.*, 45(2), 128-133.



27. He, Q., Wang, L., Wang, F., Wang, C., Tang, C., Li, Q., Li, J., & Zhao, Q. (2013). Microbial fingerprinting detects intestinal microbiota dysbiosis in Zebrafish models with chemically-induced enterocolitis. *BMC Microbiol.*, *13*, 289. doi: 10.1186/1471-2180-13-289.
28. Li, X., Qu, Y., Zhang, P., Zhang, J., Zhang, L., Huang, D., & Zhang, Y. (2011). Application of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and lab-on-a-chip technology to the identification of fishspecies from Bohai Bay. *Se Pu.*, *2011*, *29(7)*, 673-676.
29. Tanaka, Y., Takahashi, H., Kitazawa, N., & Kimura, B. (2010). Rapid estimation of microbial populations in fish samples by using terminal restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA. *J Food Prot.*, *73(1)*, 104-113.
30. Nilsson, W. B., & Strom, M. S. (2002). Detection and identification of bacterial pathogens of fish in kidney tissue using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes. *Dis Aquat Organ.*, *48(3)*, 175-185.
31. Eszterbauer, E., Benko, M., Dán, A., & Molnár, K. (2001). Identification of fish-parasitic *Myxobolus (Myxosporea)* species using a combined PCR-RFLP method. *Dis Aquat Organ.*, *44(1)*, 35-39.
32. Artamonova, V. S., & Makhrov, A. A. (2015). *Geneticheskie metody v lososevodstve i forelevodstve ot traditsionnoy seleksii do nanobiotekhnologii*. Moskva : Tovarischestvo nauchnykh izdaniy KMK.
33. Ransom, D. G., & Zon, L. I. (1999). Mapping zebrafish mutations by AFLP. *Methods Cell Biol.*, *60*, 195-211.
34. Li, T. (2006). The advancement of AFLP technology. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, *22(5)*, 861-865.
35. Papa, R., Troggio, M., Ajmone-Marsan, P., & Nonnis Marzano, F. (2005). An improved protocol for the production of AFLP markers in complex genomes by means of capillary electrophoresis. *J Anim Breed Genet.*, *122(1)*, 62-68.
36. Velappan, N., Snodgrass, J. L., Hakovirta, J. R., Marrone, B. L., & Burde, S. (2001). Rapid identification of pathogenic bacteria by single-enzyme amplified fragment length polymorphism analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, *39(2)*, 77-83.
37. Viljamaa-Dirks, S., Heinikainen, S., Torssonen, H., Pursiainen, M., Mattila, J., & Pelkonen, S. (2013). Distribution and epidemiology of genotypes of the crayfish plague agent *Aphanomyces astaci* from noble crayfish *Astacus astacus* in Finland. *Dis Aquat Organ.*, *103(3)*, 199-208. doi: 10.3354/dao02575.
38. Oidtmann, B., Schmid, I., Rogers, D., & Hoffmann, R. W. (1999). An improved isolation method for the cultivation of the crayfish plague fungus. *Aphanomyces astaci*. *Freshw Crayfish.*, *12*, 303-312.
39. Lilley, H., Thompson, K. D., & Adams A. (1997). Characterization of *Aphanomyces invadans* by electrophoretic and Western blot analysis. *Dis Aquat Org*, *30*, 187-197.
40. Zaloilo, O. V. (2012). Osnovni aspekty vykorystannia RAPD metodu v rybnystvi. *Zbirnyk naukovykh prats PDATU*, *20*, 83-85.
41. Schena, M. (1996). Genome analysis with gene expression microarrays. *Bioessays*, *18(5)*, 427-431.
42. Bumgarner, R. (2013). DNA microarrays: Types, Applications and their future. *Curr. Prot. Mol. Biol.* doi:10.1002/0471142727.mb2201s101.
43. The National Center for Biotechnology Information. GenBank Overview. *ncbi.nlm.nih.gov/genbank*. Retrieved from : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>.



44. Byon, J. Y., Ohira, T., Hirono, I., & Aoki, T. (2005). Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 18(2), 135-147.
45. Peatman, E., Terhune, J., Baoprasertkul, P., Xu, P., Nandi, S., Wang, S., Somridhivej, B., Kucuktas, H., Li, P., Dunham, R., & Liu, Z. (2008). Microarray analysis of gene expression in the bluecatfish liver reveals early activation of the MHC class I pathway after infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Mol. Immunol.*, 45(2), 553-566.
46. Monaghan, S. J., Thompson, K. D., Adams, A., Kempter, J., & Bergmann, S. M. (2015). Examination of the early infection stages of koi herpesvirus (KHV) in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio L.* using *in situ* hybridization. *J Fish Dis.*, 38(5), 477-489. doi: 10.1111/jfd.12260. Epub 2014 Jun 13.
47. Gupta, A., & Mo, Y. Y. (2011). Detection of microRNAs in cultured cells and paraffin-embedded tissue specimens by *in situ* hybridization. *Methods Mol Biol.*, 676, 73-83. doi: 10.1007/978-1-60761-863-8\_6.
48. Wu, B., Liu, X. L., Xuan, W. L., Feng, R., Yin, F., & Zhou, S. Y. (2002). Detection of stem cell factor mRNA expression in leukemic cells by *in situ* reverse transcriptase-PCR. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 22(6), 490-492.
49. Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., Ryu, B., Rosty, C., Goggins, M., Wilentz, R. E., Murugesan, S. R., Leach, S. D., Jaffee, E., Yeo, C. J., Cameron, J. L., Kern, S. E., & Hruban, R. H. (2001). Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas: identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE). *Clin Cancer Res.*, 7(12), 3862-3868.
50. Crotwell, P. L., Sommervold, A. R., & Mabee, P. M. (2004). Expression of *bmp2a* and *bmp2b* in late-stage zebrafish median fin development. *Gene Expr Patterns*, 5(2), 291-296.
51. Schumacher, J. A., Zhao, E. J., Kofron, M. J., & Sumanas, S. (2014). Two-color fluorescent *in situ* hybridization using chromogenic substrates in zebrafish. *Biotechniques*, 57(5), 254-256. doi: 10.2144/000114229.
52. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 15, 28(12), E63.
53. Caipang, C. M., Haraguchi, I., Ohira, T., Hirono, I., & Aoki, T. (2004). Rapid detection of a fish iridovirus using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J Virol Methods*, 121(2), 155-161.
54. El-Matbouli, M., & Soliman, H. (2005). Rapid diagnosis of *Tetracapsuloides bryosalmonae*, the causative agent of proliferative kidney disease (PKD) in salmonid fish by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Parasitol Res.*, 96(5), 277-284.
55. de Kort, B. J., ten Kate, G. A., de Jong, G. J., & Somsen, G. W. (2011). Capillary electrophoresis with lamp-based wavelength-resolved fluorescence detection for the probing of protein conformational changes. *Anal Chem.*, 83(15), 6060-6067. doi: 10.1021/ac201136y.
56. Seyrig, G., Stedtfeld, R. D., Tourlousse, D. M., Ahmad, F., Towery, K., Cupples, A. M., Tiedje, J. M., & Hashsham, S. A. (2015). Selection of fluorescent DNA dyes for real-time LAMP with portable and simple optics. *J Microbiol Methods*, 119, 223-227. doi: 10.1016/j.mimet.2015.11.004.



57. Li, B., Chen, X., & Ellington, A. D. (2012). Adapting enzyme-free DNA circuits to the detection of loop-mediated isothermal amplification reactions. *Anal Chem.*, 84(19), 8371-8377. doi: 10.1021/ac301944v.
58. Ushikubo, H. (2004). Principle of LAMP method a simple and rapid gene amplification method. *Uirusu*, 54(1), 107-112.
59. Zav'yalova, E. A., Kandrina, N. Yu., Lomakina, N. F., & Gulyukin, M. I. (2015). Indikatsiya i identifikatsiya nekotorykh osobo opasnykh virusov ryb metodom PTsR. *Rybovodstvo i rybnoe khozyaystvo*, 3, 21-25.

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ РЫБ (ОБЗОР)

**О. В. Залоило**, [zaloilo@if.org.ua](mailto:zaloilo@if.org.ua), Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев

**Ю. П. Рудь**, [rud@if.org.ua](mailto:rud@if.org.ua), Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев

**І. А. Залоило**, [zaloilo@yahoo.com](mailto:zaloilo@yahoo.com), Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

**І. І. Грициняк**, [hrytsyniak@if.org.ua](mailto:hrytsyniak@if.org.ua), Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев

*Цель.* Молекулярные методы диагностики (ММД) постепенно приобретают широкое распространение в современном рыбоводстве. ММД включают широкий спектр специфических подходов, каждый из которых обладает четкими границами возможного применения и характеризуется индивидуальными особенностями в практическом выполнении.

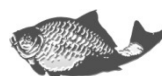
Между тем, современная специальная литература по данной тематике преимущественно рассматривает отдельные методики в узком контексте задач либо обсуждает практические результаты, полученные с помощью таких подходов. Таким образом, обобщение существующей информации о механизмах действия, границах возможностей и типовых проблемах основных методов молекулярной диагностики является актуальной задачей рыбоводства. В частности, такой обзор позволит более эффективно выбирать один или несколько подходов для идентификации возбудителей заболеваний рыб.

*Результаты.* В работе рассмотрены основные молекулярные методы, используемые в мировом рыбоводстве для диагностики различных заболеваний промысловых рыб.

*Научная новизна.* Данная работа является обобщением данных о принципах и механизмах выполнения диагностики на основании современных молекулярных методов. Для каждого из упомянутых подходов показаны наиболее перспективные направления применения. Информация представлена в форме обобщенного сравнительного анализа методик с указанием положительных и отрицательных практических аспектов каждой из них.

*Практическая значимость.* Представленный обзор современных молекулярных методов диагностики в рыбоводстве ориентирован на практическое применение. Обобщенная и аналитическая информация может быть использована при планировании текущих и дифференцированных диагностических мероприятий (как оперативных, так и профилактических), а также будет полезной при создании комплексных диагностических подходов общего и индивидуального характера.

*Ключевые слова:* методы молекулярной диагностики, ПЦР, ДНК, амплификация, болезни рыб.





## THE CURRENT METHODS FOR MOLECULAR DIAGNOSTICS OF FISH DISEASES (REVIEW)

**O. Zaloilo**, [zaloilo@if.org.ua](mailto:zaloilo@if.org.ua), Institute of Fisheries NAAS, Kyiv

**Yu. Rud**, [rud@if.org.ua](mailto:rud@if.org.ua), Institute of Fisheries NAAS, Kyiv

**I. Zaloilo**, [zaloilo@yahoo.com](mailto:zaloilo@yahoo.com), National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

**I. Hrytsyniak**, [hrytsyniak@if.org.ua](mailto:hrytsyniak@if.org.ua), Institute of Fisheries NAAS, Kyiv

**Purpose.** *The methods of molecular diagnostic (MMD) gradually become widespread in modern fish farming. MMD contain a wide variety of specific approaches, each of which has distinct limits of their possible applications and is characterized by individual peculiarities in practical performance. In addition to high sensitivity and the possibility of rapid diagnostics, the main advantage of molecular methods is to determine the uncultivated infectious agents. DNA amplification allows identifying pathogenic microorganisms at very small quantities even in the minimum sample volume. Molecular methods of diagnostic enable the determination of infection in latent or acute phases. These methods allow showing the differences between pathogens with similar antigenic structures.*

*The current literature data on this subject usually show a methodology in the narrow context of the tasks or practical results obtained through such approaches. Thus, a synthesis of existing information on the mechanisms of action and the limits of the typical problems of basic methods of molecular diagnostics are an urgent task of fish breeding. In particular, the following description will more effectively choose one or several approaches to identify pathogens in fish.*

**Findings.** *This paper reviews the basic molecular methods that are used in the world's aquaculture for diagnosis of various diseases in commercial fish species.*

**Originality.** *This work is a generalization of data on the principles and mechanisms for the implementation of diagnostics based on modern molecular techniques. For each of the mentioned approaches, the most promising areas of application were shown. The information is provided in the form of a comparative analysis of each methodology, indicating positive and negative practical aspects.*

**Practical value.** *The current review of modern methods of molecular diagnostic in aquaculture is focused on practical application. Generalizing and analytical information can be used when planning the work flow and differential diagnostic measures (both operational as well and preventive), and will be useful when creating complex diagnostic approaches of general and individual character.*

**Keywords:** *methods of molecular diagnostics, PCR, DNA amplification, fish diseases.*

