

STUDY OF INDUSTRIAL DISINFECTANTS THE STABILITY OF ISOLATES ISOLATED FROM POULTRY

Puštvit N. A., Pinchuk N. G.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv, Ukraine

Contamination of food and water, direct contact with infected animals can all be the cause of infection. Improved methods for the analysis of food products for the presence of pathogens of acute intestinal infections (AI), including bacteria of the genus *Campylobacter* spp. - one of the most pressing problems of food hygiene. As follows, knowledge about the overall effectiveness of disinfectants, used in the fight against pathogens, especially campylobacteriosis necessary. This article the study of the effect of industrial disinfectants on the stability of selected isolates from poultry and assessment of bacteriostatic or bactericidal effect.

The purpose of our study the effect of industrial disinfectants on the stability of selected isolates from poultry.

Materials and methods. Evaluating the effectiveness of disinfectants conducted accordingly from Manual P 4.2. 2643 -10 hardening on Russia republic.

In the anchor test-microorganism boules of vicarities next isolates: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* SS/15, *Campylobacter jejuni*.

Results. Working solutions were prepared disinfectants ex tempore by mixing appropriate quantities of disinfectants and sterile drinking water. Bactericidal activity was determined by suspension and method using test objects.

Conclusions. So we can say, that disinfectants Pentasol 237, Ancep cip, P3-Manodes manifests bacteriostatic effect with respect to microorganisms, and the use of ultraviolet disinfection as an independent agent for various types of surfaces, contaminated by bacteria for exhibitions 20 minutes and 2 hours ineffective.

Keywords: campylobacteriosis, disinfectants, environmental specimens, material, contamination, isolates

УДК 597-12:576.85.08

ЕКСПРЕС-ДІАГНОСТИКА ЧОТИРЬОХ ПАТОГЕННИХ
БАКТЕРІЙ У РАЙДУЖНОЇ ФОРЕЛІ *ONCHORHYNCHUS MYKISS*Рудь Ю. П.^{1,2}, Залоїло О. В.^{1,2}, Бучацький Л. П.²¹ Інститут рибного господарства НААН України, м. Київ, Україна² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ, Україна, e-mail: rud@if.org.ua

Представлено результати підбору олігонуклеотидних праймерів, специфічних до чотирьох патогенних бактерій райдужної форелі *Onchorhynchus mykiss* та на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) розроблено метод мультиплексної ПЛР (мПЛР) для ідентифікації *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium columnarae*, *Aeromonas salmonicida* та *Aeromonas hydrophila*. Показано специфічність та ефективність олігонуклеотидних праймерів, а також дієвість мПЛР для ідентифікації бактерій як в сукупності, так і кожного збудника окремо. Перевагою запропонованого методу над бактеріологічною діагностикою даних патогенів є швидкість отримання результату та висока чутливість.

Ключові слова: молекулярна діагностика, мПЛР, бактеріальні хвороби риб

За останні 10–15 років в умовах аквакультури та у природних водоймах було ідентифіковано велику кількість нових бактеріальних патогенів риб. Ізоляція цих збудників тісно пов'язана із збільшенням обсягів ведення світової аквакультури. В умовах аквакультури бактерії спричиняють масову загибель риб і наносять великі збитки промислового рибництву [1].

Такі інфекційні захворювання риб як фурункульоз (*Aeromonas salmonicida*), хвороба "червоного рота" лососевих (*Yersinia ruckeri*), бактеріальна геморагічна септицимія (*Aeromonas hydrophila*) та колумнарна хвороба (*Flavobacterium columnarae*) широко поширені у всьому світі [2]. 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 низькочутливими, 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 затрати на реагенти для реакції та скорочує час на ідентифікацію кожного збудника завдяки використанню специфічних наборів олігонуклеотидів [4].

Тому метою нашої роботи було підібрати олігонуклеотидні праймери, специфічні до вищезгаданих бактеріальних збудників інфекційних захворювань риб, та використати їх в експрес діагностиці за допомогою методу мПЛР.

Матеріали та методи. Первинний посів мікроорганізмів з патологічного матеріалу, отриманого від різних вікових груп (личинки, цьоголітки, одно- та дворічки) райдужної форелі *O. mykiss* здійснювали на м'ясо-пептонний агар (МПА). Дослідження морфології колоній та клітин, а також виділення чистих культур проводили за загальноприйнятими методиками [5].

ДНК виділяли із зразків, взятих безпосередньо від хворої риби та бактеріальних суспензій, отриманих як від окремих колоній чистих культур, так і шляхом їх змішування для апробації методу. Для виділення ДНК використовували комерційний набір GeneJet DNA Purification Kit (ThermoScientific). Концентрацію та якість очищення ДНК вимірювали на спектрофотометрі APEL PD-303 UV [6].

Олігонуклеотидні праймери для ідентифікації *Y. ruckeri*, *F. columnarum*, та *A. hydrophila* підбирали на основі аналізу нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК, а для *A. salmonicida* було проаналізовано нуклеотидну послідовність плазмідної ДНК. Для розробки праймерів, 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).

Ампліфікацію проводили на термоциклері 96 Universal Gradient PEQ STAR (PEQLAB, Німеччина). Параметри реакції визначали на підставі фізичних властивостей специфічних олігонуклеотидів. До складу реакційної суміші входило: 25 мкл PCR MasterMix (ThermoScientific), 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 при 94 °С (3 хвилини) та 35 циклів денатурації при 94 °С (30 секунд), віджигу праймерів при 59 °С (90 секунд), елонгації при 72 °С (1 хвилина) і додатковий останній цикл синтезу при 72 °С (10 хвилин). Після ПЛР продукти аналізували у 2% агарозному гелі в ТАЕ-буфері (40 мМ TRIS-HCl, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ EDTA). Результати електрофорезу спостерігали під ультрафіолетовим транслюмінатором.

Результати досліджень. Як показали результати наших досліджень, обрані олігонуклеотидні праймери, специфічні до бактерій *Y. ruckeri*, *F. columnarum*, *A. salmonicida* та *A. hydrophila* ампліфікували очікувані по розміру фрагменти ДНК. Розмір ампліконів становив 589, 204, 416 та 685 пар нуклеотидів (п.н.) відповідно (рисунок). Специфічність праймерів була підтверджена постановкою реакції, де в реакційну суміш з усіма олігонуклеотидами додавалась лише ДНК конкретної бактерії (рисунок). У цих реакціях ми спостерігали лише один специфічний продукт очікуваного розміру.

Здорова риба, без зовнішніх ознак захворювання, може бути носієм інфекційного збудника і поширювати його всередині популяції [7]. Хронічні або латентні інфекції можуть проявлятися під дією стресових факторів 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 [8, 9]. 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 *Y. ruckeri*, *F. columnarum*, *A. salmonicida* та *A. hydrophila*.

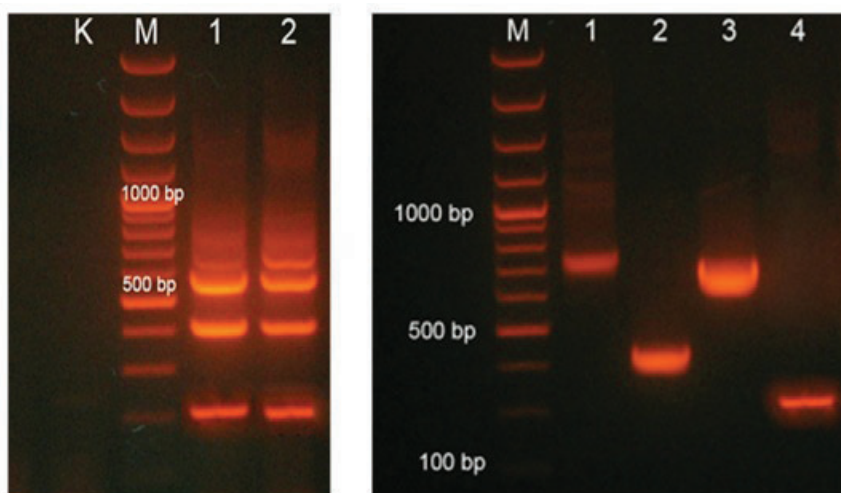


Рис. Специфічність мПЛР, розробленої для ідентифікації *Y. ruckeri*, *F. columnarum*, *A. salmonicida* та *A. hydrophila*. М – 100 п.н. ДНК-маркер; К – контроль (реакційна суміш без ДНК); 1 – *A. hydrophila* (685 п.н.); 2 – *A. salmonicida* (416 п.н.); 3 – *Y. ruckeri* (589 п.н.); 4 – *F. columnarum* (204 п.н.); 1-2 (ліворуч) – мПЛР з чотирма патогенами разом

У літературі є повідомлення про використання мПЛР для ідентифікації різних вірусів та бактерій – збудників інфекційних захворювань риб [10]. У наших дослідженнях ми спробували об'єднати в одній реакції діагностику чотирьох найпоширеніших бактеріальних патогенів.

У подальших дослідженнях ми плануємо здійснити секвенування ампліфікованих фрагментів ДНК з метою проведення філогенетичного аналізу українських штамів досліджуваних бактерій та проводити апробацію нашої методики в різних регіонах країни, охоплюючи таким чином усі кліматичні пояси та ландшафтно-територіальні структури України. Також цікавим буде провести моніторинг інших лососевих видів риб.

Висновки. Розроблено високочутливий метод мПЛР для експрес діагностики бактеріальних збудників інфекційних захворювань риб *Y. ruckeri*, *F. columnarum*, *A. salmonicida* та *A. hydrophila*. Запропонований метод мПЛР є високочутливим, специфічним та швидким, що дозволяє ідентифікувати чотири бактеріальних патогена упродовж одного дня.

Список літератури

1. Woo P.T.K., Bruno D.W. 2011. Fish Diseases and Disorders. Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI, 944 pp.
2. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2015. URL: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015/>
3. Рудь Ю.П. Ідентифікація грамнегативних бактерій у риб методом ПЛР-ПДРФ гену 16S рРНК / Риборосподарська наука України. – 2013. – №1. – С. 80-86.
4. Panangala V.S., Shoemaker C.A., Santen V.L., Dybvig K., Klesius P.K. Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogens, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophila* / Diseases of aquatic organisms. – 2007. – Vol. 74. – P. 199–208.
5. OIE Aquatic animal health code 12th Edition // World Organisation for Animal Health (www.oie.int). – 2009. – 288 p.
6. Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. – New York: Cold Spring Harbour, 2001.
7. Рудь Ю.П. Експрес-діагностика флавобактеріозу риб методом полімеразної ланцюгової реакції / Сільськогосподарська мікробіологія. – 2013. – Вип. 18. – С. 132-145.
8. Жук Л.В., Рудь Ю.П. Ідентифікація бактерій роду *Aeromonas* методом полімеразної ланцюгової реакції / Науковий вісник НУБіП України. Серія "Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва" – 2012. Вип. 172, Ч. 3. – С. 87-90.
9. Рудь Ю.П., Циганок І.О. Молекулярна діагностика *Yersinia ruckeri* / Риборосподарська наука України. – 2014. – №2. – С. 69-78.
10. Рудь Ю.П., Бучацький Л.П. Молекулярне визначення інфекційних захворювань риб / Тваринництво України. – 2016. - № 4-5. – С. 28-31.

RAPID IDENTIFICATION OF FOUR PATHOGENIC BACTERIA IN RAINBOW TROUT ONCHORHYNCHUS MYKISS

Rud Yu. P.^{1,2*}, Zaloilo O. V.^{1,2}, Buchatskiy L. P.²

¹Institute of Fisheries of the NAAS, Kyiv, Ukraine

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

*The results of primers design targeting four pathogenic bacteria, isolated in rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*, and developing of multiplex polymerase chain reaction (mPCR) method to identify *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium columnarum*, *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila* are presented. The specificity of oligonucleotide primers and efficiency of mPCR to identify investigated bacteria collectively and each pathogen apart were shown. The advantages of the proposed method on bacteriological diagnosis of these pathogens are speed of obtaining results and high sensitivity.*

Keywords: molecular diagnostics, mPCR, bacterial fish diseases

УДК 619: 616.98-07: 636.4 (477)

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИЗАЦІЯ ІЗОЛЯТІВ ЦИРКОВІРУСУ ДРУГОГО ТИПУ, ВИДІЛЕНИХ ВІД СВІЙСЬКИХ СВИНЕЙ В УКРАЇНІ

Ситюк М. П.¹, Фурда І. Л.², Байдалюк В. А.¹, Подгорська К.³

¹ Інститут ветеринарної медицини НААН України, м. Київ, Україна, e-mail: snp1978@ukr.net

² Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ, Україна

³ Національний ветеринарний Інститут, м. Пулави, Республіка Польща

Проведено молекулярно-генетичні дослідження двох ізолятів цирковірусу другого типу, виділених від свійських свиней в Україні. За результатами секвенування повного геному побудовано філогенетичне древо з визначення місця та складу виділених ізолятів.

Ключові слова: цирковірус другого типу, ізоляти, свійські свині, секвенування

Цирковірусна інфекція свиней є емерджентною хворобою, яка знайдена в комерційних свинарських господарствах і може бути причиною виникнення клінічних або субклінічних інфекцій [5]. Вірус ДНК відноситься до родини *Circoviridae* [1].

Молекула ДНК геному цирковірусів односпіральна кільцевої форми, [6] з негативним зарядом, має довжину 1759 пар нуклеотидів для ЦВС-1 та 1768 – для ЦВС-2 [7].

До цього часу описано два типи вірусу: ЦВС-1 та ЦВС-2. ЦВС-1 вперше був виділений з перецеплюваної лінії нирок свиней (PK-15) і не був патогенним для свиней, в той час як ЦВС-2 пов'язаний з цілою низкою проявів хвороб (цирковірус-асоційованих захворювань свиней), в тому числі, синдром мультисистемного відлучення, комплексні респіраторні захворювання свиней, дерматит свиней і синдром нефропатії, пневмонія, діарея, репродуктивна недостатність [8].