

antibodies against the causative agents of leukemia - the sarcoma group are found only in birds of the D-4 line and in a much lower percentage - 37.6 than in the same bird, where they used natural infection pathways. Our findings suggest that the birds are not equally sensitive to different methods of application of leukemia virus. The bird we studied was resistant to leukemia when it was infected through the mouth, eye mucosa, trachea, cloaca, while the intravenous injection of the same pathogen revealed a significant death of the bird of the test lines from the erythroid leukemia virus (strain R).

**Keywords:** chickens, leggorn and Poltava clayey chickens, erythroid leukemia virus (strain R), ways of infection.

Дата надходження до редакції: 17.10.2018 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Улько Л. Г.

УДК 575:17, 575.21:577.21

## РОЗРОБЛЕННЯ ДІАГНОСТИЧНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM* У РАЙДУЖНОЇ ФОРЕЛІ

**Н. Є. Гриневич**, к.вет.н., доцент\*

**Р. В. Облап**, к.б.н., ст.н.сп.\*\*

**Т. М. Димань**, д.с.-г.н., професор\*

**О. А. Хом'як**, к.с.-г.н., доцент\*

\*Білоцерківський національний аграрний університет

\*\*ДП «Укрметртестстандарт»

Бактерії *Flavobacterium psychrophilum* широко розповсюджені у всьому світі і призводять до значних збитків у рибному господарстві передусім через те, що спричиняють так звану хворобу холодної води (з англ. bacterial cold water disease, BCWD). За використання технології TaqMan методу полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (ПЛР-РЧ) було розроблено тест-систему для виявлення *F. psychrophilum* у райдужної форелі. Пару праймерів з зондом FPGrV для ідентифікації ДНК *F. psychrophilum* було підібрано за допомогою комп'ютерної програми Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). Для цього було використано послідовність гена GrvB. Обраний зонд було мічено флуоресційним барвником HEX та гасником флуоресценції BHQ1. Теоретичну специфічність підібраних праймерів оцінювали за допомогою алгоритму BLAST. Аналітичну чутливість розробленої тест-системи визначали за допомогою зразка ДНК, виділеного із чистої культури бактерій. Перевірку специфічності роботи праймерів, підібраних для ідентифікації *F. Psychrophilum*, здійснювали шляхом тестування зразків ДНК, ізольованих із таких культур як *F. columnare*, *F. branchiophilum*, *F. opocorynchi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas salmonicida*, *Shewanella putrifaciens*. Перехресних реакцій при цьому виявлено не було. Результати досліджень підтвердили 100 % специфічність підібраних праймерів.

**Ключові слова:** епізоотія, флавобактеріоз, *Flavobacterium psychrophilum*, ПЛР-РЧ, ампліфікація, флуоресценція, праймери.

**Постановка проблеми у загальному вигляді.** Бактерії *Flavobacterium psychrophilum* широко розповсюджені у всьому світі і призводять до значних збитків у рибному господарстві передусім через те, що спричиняють так звану хворобу холодної води (з англ. bacterial cold water disease, BCWD), а також запалення печінки у мальків райдужної форелі (з англ. rainbow trout fry disease, RTFS). Ці захворювання поширені в країнах Скандинавії, але також зустрічаються в холодноводних господарствах Центральної та Східної Європи. Основна ознака інфекції *F. psychrophilum* – утворення глибоких виразок на поверхні тіла ураженої риби. В Україні ситуацію з розповсюдженням флавобактеріозу як у природних водоймищах, так і рибогосподарських підприємствах, досліджено недостатньо. Крім того, дане бактеріальне захворювання визначено одним із найнебезпечніших для сучасної аквакультури, і виявлення його збудника у популяціях об'єктів рибництва є важливим заходом щодо запобігання інфекційним захворюванням.

Застосування молекулярних методів діагностики дає змогу значно знизити навантаження від антибактеріальної терапії та виключає розвиток стійких штамів бактерій. На жаль, у вітчизняному рибництві такі методи не набули широкого використання. З огляду на те, що в замкнутих установках існує велика загроза виникнення епізоотій, важливим фактором є можливість проведення профілактичних та лікувальних заходів у системі замкнутого водопостачання.

**Зв'язок з важливими науковими і практичними завданнями.** Дослідження є частиною комплексних наукових досліджень кафедри іхтіології та зоології Білоцерківського національного аграрного університету за тематичним планом науково-дослідної роботи «Обґрунтування та розроблення системи санітарно-гігієнічних заходів в індустріальних форелевих господарствах України за замкнутого водопостачання». Державний реєстраційний номер 0116 У 005809

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.** За вирощування риби в замкнутих установках, особливо за великої щільності їх посадки та інтенсивної годівлі, у воді накопичується багато органічних сполук, якими живляться гетеротрофні бактерії [2, 3]. Ці мікроорганізми очищують середовище від органічних забруднень, але водночас є причиною виникнення несприятливої епізоотичної обстановки [1].

Особливу небезпеку становлять збудники інфекційних та інвазійних хвороб, що мало вивчені, або ті, що раніше не реєструвалися у певного виду риб чи на певній території. Досить поширеними є такі інфекційні захворювання риб як фурункулез (*Aeromonas salmonicida*), хвороба "червоного рота" лососевих риб (*Yersinia ruckeri*), бактеріальна гемограгічна септицемія (*Aeromonas hydrophila*), колумнарна хвороба (*Flavobacterium columnarum*), бактеріальна септицемія сома (*Edwardsiella ictaluri*), псевдомоноз *Pseudomonas sp.* та хвороба "холодної води" (BCWD) (*Flavobacterium*

*psychrophila*) широко розповсюджені у всьому світі і призводять до значних економічних збитків в рибному господарстві [1, 4].

**Мета роботи** виділити представників роду *Flavobacterium* із хворої та клінічно здорової райдужної форелі *Onchorhynchus mykiss* та розробити метод діагностики флавобактеріозу риб на основі методу полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу (ПЛР-РЧ).

**Матеріали і методи досліджень.** Біологічний матеріал для дослідження було отримано із індустріального форелевого господарства Харківської області.

Тотальну ДНК з бактерій та досліджуваних зразків риб виділяли за використання комерційних наборів серії "ДНК-Екстран" (Синтол, РФ) відповідно до інструкції виробника. Для виділення ДНК з риби використовували такі органи як зябра, нирки та печінка. На одне виділення брали приблизно 25 мг свіжої або замороженої тканини. Концентрацію та чистоту виділеної нуклеїнової кислоти визначали методом спектрофотометрії за довжини хвилі  $\lambda = 260$  нм.

Під час розроблення діагностичної тест-системи для

визначення бактерій *Flavobacterium psychrophilum* було використано технологію *TaqMan* методу полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (ПЛР-РЧ, Real-Time PCR). Пару праймерів з зондом FPGyB (рис. 1) для ідентифікації ДНК *Flavobacterium psychrophilum* було підібрано самостійно за допомогою комп'ютерної програми Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). Для цього було використано послідовність гена *GyrB* (ДНК-гіраза, субодинаця В; GenBank: KT809647.1). Синтез підібраних праймерів з зондом було замовлено в компанії "Metabion international AG" (Німеччина). Обраний зонд було мічено флуоресційним барвником HEX та гасником флуоресценції BHQ1.

Теоретичну специфічність підібраних праймерів оцінювали за допомогою алгоритму BLAST (NCBI, Національний центр біотехнологічної інформації США). Підібрані праймери характеризувалися 100 % специфічністю.

**Результати власних досліджень та їх обговорення.** Результати досліджень послідовності та характеристики обраних праймерів наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

**Характеристика праймерів та зонду для ампліфікації і детекції послідовності ДНК гена *GyrB F. Psychrophilum***

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина (п.н.)	GC-склад (%)	Tm (°C)	Розмір продукту (п.н.)
FPGyB-F	agaaaatccaatgatgcaagaatc	25	32	59	91
FPGyB-R	caccattcacgggctttcta	22	45	60	
FPGyB-P	HEX-ttgccagcacaagcacgctcatgc-BHQ1	24	54	70	
GenBank: KT809647.1					
Flavobacterium psychrophilum strain US33 GyrB (gyrB) gene, partial cds.					
1 aatgctttgt caaacactt gcgagcaacc gttcatagta gcgacggaaa gatttacgag					
61 caagaatagc aaaaaggaaa agcacttat cccgtaaacg aaataggcga aacgactaaa					
121 cgtggaacca ttgtaacttt ttaccggac ccttctatt ttacccaac catagagtat					
181 tctatgaca cttatctgc tcgatgctg gaattatct ttttaataa aggaatcacc					
241 attacttta cagataaaa agaaaagac aaagacgga atttgttc agaattttt					
301 cattcaacag aaggactaaa agaataatc cgttattag atggaaccc agagccaatt					
361 attgcccagc taattctat ggataacgat aaaggagaga ttccagtga ggttgctta					
421 attataata caagttatac agagaatatt tttcttagc taaacaatat caatacacac					
481 gaaggaggaa cgcatttga aggtttaga actggtttaa cccgtcgtt aaagaaatat					
541 gcagattcgt ctggaatgt agataattg aaattgaaa ttccaggaga tgactccgt					
601 gaaggattaa cagctattat ttcgtaaaa gttgctgaac ctcaattga aggtcaaac					
661 aaaaccaaat taggaaatag agaagtagt tctccagttt ctcaagcgtt tggcgatatg					
721 attgaaaatt attggaaga aatccaat gatgcaagaa tcatgtgca aaaagtaatt					
781 ttggcagcac aagcacgtca tctgctaaq aaagcccgtg aaatggtgca gcgaaaaacc *					
841 gtaatgggtg gtggtggctt accaggaaaa ctatcagatt gttctgaaca agatccagca					
901 aaatggaag tatttctgt tgaggagat tcggcaggag gaacagcaaa acaaggacgt					
1021 atgcaccaca aggttttga aaacgaagaa attcgtaata tatttacagc attgggg					

Примітка \*Фрагмент послідовності гена *GyrB F. psychrophilum*. Підкреслюванням виділено послідовності праймерів, сірим кольором – послідовність зонда, підібраних для ампліфікації ділянки гена *GyrB* розміром 91 п.н.

Оптимізацію умов ампліфікації проводили за такими параметрами, як температура гібридизації праймерів, концентрація  $MgCl_2$ , концентрація та співвідношення праймерів і зондів. Оптимальна температура, за якої підібрані нами праймери найбільш ефективно працювали, становила 60°C. Найкращі результати було отримано за концентрації  $MgCl_2$  в 2,5 мМ. Проведення серії реакцій з різними концентраціями праймерів і зонду дало змогу визначити оптимальні значення – 10 пкмоль для праймерів та 5 пкмоль для зонду.

ПЛР у реальному часі проводили на приладі CFX 96 (Bio-Rad, США) відповідно до протоколу, наведеного у таб-

лиці 2. Флуоресцентний сигнал вимірювався на стадії гібридизації і синтезу у кожному циклі ампліфікації. Граничну лінію та базовий рівень флуоресценції прилад розраховував автоматично по завершенню реакції. Обробку отриманих результатів здійснювали у відповідності до інструкції виробника приладу.

Реакційна суміш для проведення ПЛР-РЧ містила 1x Taq-буфер (75 мМ Tris-HCl (pH 8,8); 20 мМ  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,01% Tween 20); 2,5 мМ  $MgCl_2$ ; 0,2 мМ дНТФ суміші; 10 пкмоль кожного з праймерів та 5 пкмоль зонду; 100 нг ДНК; 1 од. Taq ДНК полімерази (Thermo Fisher Scientific, США).

Протокол проведення ПЛР у реальному часі

Крок	Етапи	Т°С	Час (сек)	Цикл
1	Початкова денатурація	94	180	1x
2	Денатурація	95	20	45x
3	Гібридизація і синтез	60	40	

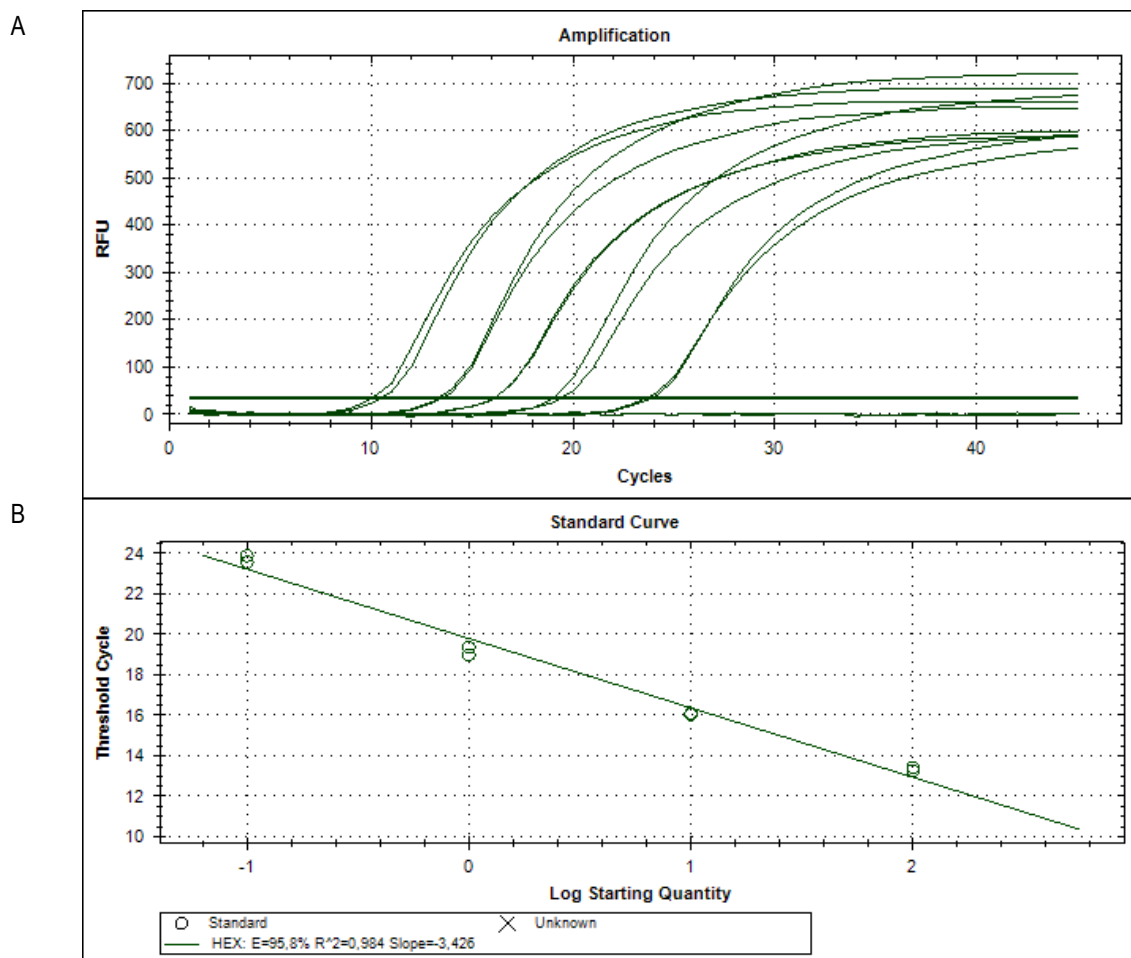


Рис. 2. А – графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час перевірки ефективності роботи ПЛР-системи; В – графік стандартної кривої серії десятикратних розведень бактеріальної ДНК, побудований за результатами ПЛР у реальному часі для послідовності гена *GyrB F. Psychrophilum*

Для оцінювання ефективності ампліфікації використовували такі критерії, як значення кута нахилу кінетичної кривої (А), ефективність ампліфікації (Е) та значення коефіцієнту кореляції  $R^2$ . Результати реакції вважаються задовільними, якщо значення кута нахилу кривої лежить в діапазоні від  $-3.6 \leq A \leq -3.1$ , що відповідає ефективності ампліфікації 90–110%, а середнє значення коефіцієнта кореляції  $R^2 \geq 0,98$ .

Визначення ефективності перевіряли шляхом проведення ПЛР-РЧ із серією десятикратних розведень бактеріальної ДНК. Кожна серія десятикратних розведень ДНК складалася з трьох точок. На основі отриманих даних було побудовано графік стандартної кривої в системі координат  $Lg[N]/Ct$  (рис. 2).

Отримані дані демонструють, що значення кута

нахилу кривої ( $A=3,426$ ) вкладалося в бажаний діапазон, а показник  $R^2$  дорівнював 0,984. Розраховане значення ефективності ПЛР для праймерів FP $GyrB$  становило 95,8 %, що свідчить про достатньо високий рівень розробленої тест-системи.

Визначення аналітичної чутливості проводили за допомогою кількісно охарактеризованого зразка ДНК, виділеного із чистої культури бактерій. Для цих цілей було отримано розчини бактеріальної ДНК у діапазоні концентрацій від 100 до  $1 \cdot 10^{-7}$  нг. Всі зразки аналізували в 4-х кратній повторності. Для всіх досліджених концентрацій, за винятком останньої, було отримано позитивний результат (рис. 3). Аналітична чутливість розробленої ПЛР-системи становила приблизно  $1 \times 10^{-6}$  нг або  $3,33 \times 10^{-1}$  копій/мкл ( $333 \text{ ГЕ/см}^3$ ).

Well	Fluor	Content	Sample	Ct
A01	HEX	NTC-01	HK	N/A
A02	HEX	NTC-01	HK	N/A
B03	HEX	Unkn-02	100 ng	13,88
B04	HEX	Unkn-02	100 ng	13,73
B05	HEX	Unkn-03	10	15,88
B06	HEX	Unkn-03	10	15,87
B07	HEX	Unkn-04	1	19,07
B08	HEX	Unkn-04	1	19,28
C01	HEX	Unkn-05	0.1	22,85
C02	HEX	Unkn-05	0.1	22,83
C03	HEX	Unkn-06	0.01	26,44
C04	HEX	Unkn-06	0.01	26,43
C05	HEX	Unkn-07	0.001	29,65
C06	HEX	Unkn-07	0.001	30,10
C07	HEX	Unkn-08	0.0001	33,15
C08	HEX	Unkn-08	0.0001	33,27
D01	HEX	Unkn-09	0.00001	36,68
D02	HEX	Unkn-09	0.00001	37,43
D03	HEX	Unkn-10	0.000001	39,09
D04	HEX	Unkn-10	0.000001	38,67
D05	HEX	Unkn-11	0.0000001	N/A
D06	HEX	Unkn-11	0.0000001	N/A

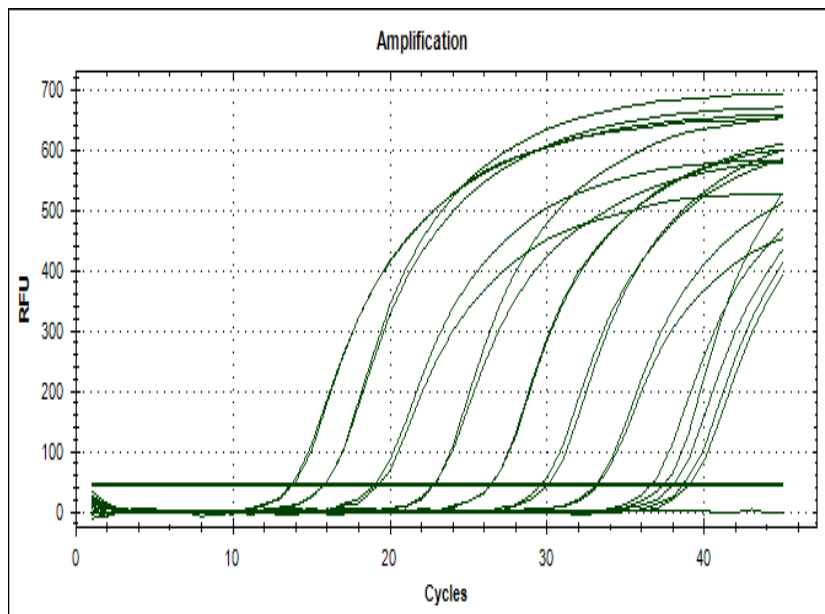


Рис. 3. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ та значення Ct під час визначення аналітичної чутливості підібраних праймерів (НК – негативний контроль)

Перевірку специфічності роботи праймерів, підібраних для ідентифікації *F. Psychrophilum*, здійснювали шляхом тестування зразків ДНК, ізольованих із таких культур як *F. Columnare*, *F. Branchiophilum*, *F. Oncorynchi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas salmonicida*, *Shewanella putrefaciens*. Перехресних реакцій при цьому виявлено не було. Результати досліджень підтвердили 100% специфічність підібраних праймерів. У таблиці 4 наведено результати з перевірки специфічності роботи праймерів FPGyгB, підібраних для визначення ДНК *F. Psychrophilum*.

Було досліджено 50 зразків ДНК, ізольованої із бактерій, наведених у таблиці 4. Пробу розглядали як позитивну на присутність бактерій *F. psychrophilum* у тому випадку, якщо сигнал флуоресценції детектувався за каналом HEX, а значення Ct варіювало з 10 по 40 цикл, залежно від кількості бактеріальної ДНК. Відповідно, пробу розглядали як негативну, якщо сигнал за каналом HEX був відсутній. На рисунку 4 наведено дані щодо скринінгового аналізу зразків ДНК, отриманих із досліджуваних бактерій.

Таблиця 4

**Перевірка специфічності роботи праймерів та зонду, підібраних для визначення ДНК *F. Psychrophilum***

№	Назва патогену	Наявність / відсутність сигналу
1	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	+
2	<i>Flavobacterium columnare</i>	-
3	<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	-
4	<i>F. Oncorynchi</i>	-
5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
6	<i>Aeromonas salmonicida</i>	-
7	<i>Shewanella putrefaciens</i>	-

Well	Fluor	Content	Sample	Ct	SQ
D05	HEX	NTC-12	HK	N/A	N/A
D06	HEX	NTC-12	HK	N/A	N/A
D07	HEX	Unkn-13	зразок 1	N/A	N/A
D08	HEX	Unkn-13	зразок 1	N/A	N/A
E01	HEX	Unkn-14	зразок 2	13,45	N/A
E02	HEX	Unkn-14	зразок 2	13,04	N/A
E03	HEX	Unkn-15	зразок 3	16,75	N/A
E04	HEX	Unkn-15	зразок 3	16,52	N/A
E05	HEX	Unkn-16	зразок 4	15,60	N/A
E06	HEX	Unkn-16	зразок 4	15,67	N/A
E07	HEX	Pos Cnt-17	ПКЗ	9,41	N/A
E08	HEX	Pos Cnt-17	ПКЗ	10,29	N/A
F01	HEX	Unkn-18	зразок 5	N/A	N/A
F02	HEX	Unkn-18	зразок 5	N/A	N/A

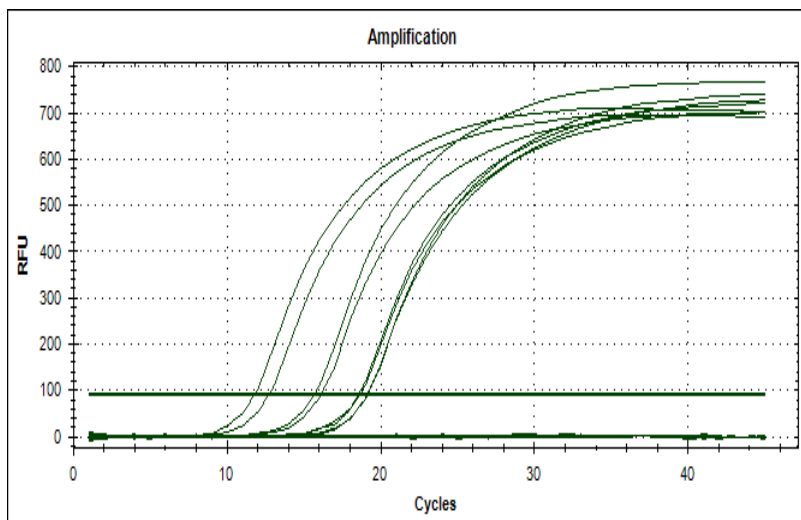


Рис. 4. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ та значення Ct під час проведення скринінгового аналізу райдувної форелі на присутність *F. psychrophilum* (НК – зразок без матриці, ПКЗ – позитивний контрольний зразок, 1–5 – досліджувані зразки риби)

**Висновки.** Таким чином, за допомогою методу ПЛР-РЧ нами було розроблено діагностичну тест-систему для ідентифікації збудника "хвороби холодної води" *Flavobacterium psychrophilum* у радужної форелі *Onchorhynchus mykiss*. Для конструювання діагностичного було використано праймери і зонд до гена *GyrB* ДНК-гірази бактерії *Flavobacterium psychrophilum*. Специфічність

підібраних праймерів становить 100 %.

**Перспективи подальших досліджень.** Розроблена діагностична тест-система для визначення бактерій *Flavobacterium psychrophilum* за використання технології *TaqMan* методу полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі дає змогу на ранніх стадіях розвитку діагностувати у радужної форелі флавобактеріоз.

#### **Список використаної літератури:**

1. Димань Т. М., Мазур Т. Г. Безпека продовольчої сировини і харчових продуктів: підручник. К.: ВЦ «Академія», 2011. 520 с.
2. Облап Р. В., Новак Н. Б., Мельничук М. Д. та ін. Методичні рекомендації щодо використання методу полімеразної ланцюгової реакції в скотарстві; за ред. Т. М. Димань. Біла Церква: Видавництво БНАУ, 2010. 68 с.
3. Del Cerro A., Marquez I., Prieto J. M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cultured rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum), in Spain. *J. fish dis.* 2010. Vol. 33. P. 285–291.
4. Van Vliet D., Wiens G. D., Loch T. P., Nicolas P., Faisal M. Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from three *Oncorhynchus* spp. in the U.S.A. revealed by multilocus sequence typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016. Vol. 82(11). P. 3246–3255.

#### **References:**

1. Dyman T. M., Mazur T. G. *The safety of food raw materials and food products: textbook*, K.: VC "Akademiya", 2011, 520 p. (in Ukrainian)
2. Oblap R. V., Novak N. B., Melnychuk M. D. et al. *Methodical recommendations on the use of the polymerase chain reaction method in cattle breeding*; for ed. T. M. Dyman. Bila Tserkva: BNAU Publishing House, 2010, 68 p. (in Ukrainian)
3. Del Cerro A., Marquez I., Prieto J. M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cultured rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum), in Spain. *J. fish dis.* 2010, vol. 33, pp. 285–291.
4. Van Vliet D., Wiens G. D., Loch T. P., Nicolas P., Faisal M. Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from three *Oncorhynchus* spp. in the U.S.A. revealed by multilocus sequence typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016, vol. 82(11), pp. 3246–3255.

#### **Гриневич Н. Е., Облап Р. В., Димань Т. Н., Хомяк О. А. Разработка диагностической тест-системы для определения *Flavobacterium psychrophilum* у радужной форели.**

Бактерии *Flavobacterium psychrophilum* широко распространены во всем мире и приводят к значительным потерям в рыбных хозяйствах, прежде всего потому, что вызывают так называемую болезнь холодной воды. При использовании технологии *TaqMan* метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) была разработана тест-система для определения *F. Psychrophilum* у радужной форели. Пара праймеров с зондом *FPGyrB* для идентификации ДНК *F. Psychrophilum* была подобрана при помощи компьютерной программы *Primer Express 3.0* (Applied Biosystems). Для этого использовали последовательность гена *GyrB*. Зонд был мечен флуоресцентным красителем *HEX* и гасителем флуоресценции *BHQ1*. Теоретическую специфичность подобранных праймеров оценивали с помощью алгоритма *BLAST*. Аналитическую чувствительность разработанной тест-системы определяли с помощью образца ДНК, выделенного из чистой культуры бактерий. Проверку специфичности работы праймеров, подобранных для идентификации *F. Psychrophilum*, осуществляли путем тестирования образцов ДНК, изолированных из таких культур как *F. Columnare*, *F. Branchiophilum*, *F. Oncorhynchi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas salmonicida*, *Shewanella putrefaciens*. Перекрестных реакций при этом выявлено не было. Результаты исследований подтвердили 100 % специфичность подобранных праймеров.

**Ключевые слова:** эпизоотия, флавобактериоз, *Flavobacterium psychrophilum*, ПЦР-РВ, амплификация, флуоресценция, праймеры.

#### **Grynevych N., Oblap R., Dyman T., Chomiak O. Development of diagnostic test-system for determination of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout.**

The bacteria *Flavobacterium psychrophilum* is widespread throughout the world and leads to significant losses in fisheries, primarily because of the so-called cold water disease. Using *TaqMan* technology of real-time polymerase chain reaction (PCR-RT), a test system was developed to determine *F. Psychrophilum* in rainbow trout. A pair of primers with an *FPGyrB* probe for identification of *F. Psychrophilum* DNA was selected using the *Primer Express 3.0* computer program (Applied Biosystems). For this, the *GyrB* gene sequence was used. The probe was labeled with a fluorophore *HEX* and a *BHQ1* fluorescence quencher. The theoretical specificity of the selected primers was evaluated using the *BLAST* algorithm. The analytical sensitivity of the developed test system was determined using a DNA sample isolated from a pure bacterial culture. The specificity of the primers selected for identification of *F. psychrophilum* was checked by testing DNA samples isolated from such cultures as *F. columnare*, *F. branchiophilum*, *F. oncorhynchi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas salmonicida*, *Shewanella putrefaciens*. No cross reactions were detected. The research results confirmed the 100 % specificity of the selected primers.

**Keywords:** epizooty, flavobacteriosis, *Flavobacterium psychrophilum*, PCR-RT, amplification, fluorescence, primers.

Дата надходження до редакції: 18.10.2018 р.

Рецензент: к.вет.н., професор Зон Г. А.