



Промысловые виды и их биология

Результаты апробации трёх пар праймеров для идентификации возбудителя фурункулёза лососевых рыб *Aeromonas salmonicida* методом ПЦР

А.В. Полтева¹, Е.В. Галанина¹, Д.А. Викторов², А.А. Ломакин³

¹ Сахалинский филиал ФГБНУ «ВНИРО» («СакхНИРО»), ул. Комсомольская, 196, г. Южно-Сахалинск, 693023

² Научно-исследовательский технологический институт им. С.П. Капицы. УлГУ (ФГБОУ ВО «НИТИ УлГУ»), Университетская набережная, 1, корп. 4, г. Ульяновск, 432000

³ Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина (ФГБОУ ВО «УлГАУ»), бульвар Новый Венец, 1, г. Ульяновск, 432017

E-mail: a.polteva@sakhniro.ru

SPIN-коды: Полтева А.В. – 2103-6463; Викторов Д.А. – 9521-1794; Галанина Е.В. – 9416-8684; Ломакин А.А. – 5988-6812

Цель работы состояла в практической апробации нескольких разработанных ранее пар праймеров для идентификации возбудителя фурункулёза лососевых рыб *Aeromonas salmonicida* методом ПЦР.

Использованные методы: при апробации праймеров в качестве тестовых были использованы шесть бактериальных культур, выделенных от преднерестовой кеты, выловленной в реках на юге Сахалина.

Для выделения бактериальной ДНК и подготовки ПЦР-смесей использовали готовые наборы D-Cells-250 и Intifica TaqM мастер-микс. Амплификацию осуществляли в термоциклере T-100 ThermoCycler (Bio-Rad). Детекцию продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере (ТАЕ). Для визуализации результатов и их документирования использовали систему Bio-Rad Gel DOC XR+SyStem.

По результатам работы экспериментально подтверждена видоспецифичность трёх пар праймеров, подобранных для идентификации возбудителя фурункулёза методом ПЦР. Апробация выбранных праймеров проведена на бактериальных культурах, выделенных от половозрелых особей кеты с проявлениями фурункулёза и без них. По итогам тестирования все бактериальные изоляты были отнесены к виду *A. salmonicida*.

Новизна работы: впервые выполнено сравнение праймеров, предложенных несколькими авторами для идентификации возбудителя фурункулёза, на бактериальных культурах, выделенных от лососей дальневосточного региона.

Практическая значимость: полученные результаты использованы для подготовки методических указаний по идентификации возбудителя фурункулёза лососевых рыб *A. salmonicida* методом ПЦР, позволяющим сократить сроки диагностики заболевания.

Ключевые слова: фурункулёз, *Aeromonas salmonicida*, праймеры, лососевые рыбы.

Results of approbation of three pairs of primers for identification of the causative agent of salmon furunculosis *Aeromonas salmonicida* by PCR

Aleksandra V. Polteva¹, Elena V. Galanina¹, Denis A. Viktorov², Artyom A. Lomakin³

¹ Sakhalin branch of «VNIRO» («SakhNIRO»), 196, Komsomolskaya st., Yuzhno-Sakhalinsk, 693023, Russia

² S.P. Kapitsa Research Institute of Technology («RIT UISU»), 1, Universitetskaya emb., bldg. 4, Ulyanovsk, 432000, Russia

³ P.A. Stolypin Ulyanovsk State Agrarian University («UISAU»), 1, Boulevard Novy Venets, Ulyanovsk, 432017, Russia

The aim of the work was to select and test several pairs of primers to identify the causative agent of *A. salmonicida* salmon furunculosis by PCR.

The methods: six bacterial cultures isolated from pre-spawning chum salmon with and without external signs of furunculosis, caught in rivers in the south of Sakhalin, were used as test cultures during the testing of primers. Ready-made kits D-Cells-250 and Intifica TaqM master mix were used to isolate bacterial DNA and prepare PCR mixtures. Amplification was carried out in a thermocycler T-100 ThermoCycler (Bio-Rad). Detection of PCR products was carried out by electrophoresis in 1.5% agarose gel in triacetate buffer (TAE). To view the results and document them, the Bio-Rad Gel DOC XR+system was used.

The results: the species specificity of three pairs of primers selected for the identification of the causative agent of furunculosis by PCR was experimentally confirmed. Testing of the selected primers was carried out on bacterial cultures isolated from pre-spawning chum salmon individuals with and without manifestations of furunculosis. According to the results of testing, all bacterial isolates were assigned to the species *A. salmonicida*.

Novelty of the work: for the first time, a comparison of primers proposed by several authors for the identification of the causative agent of furunculosis was performed on bacterial cultures isolated from salmon of the Far Eastern region.

Practical significance: the obtained results were used to prepare methodological guidelines for the identification of the causative agent of salmon furunculosis *A. salmonicida* by PCR, which reduces the time of diagnosis of the disease.

Keywords: furunculosis, *Aeromonas salmonicida*, primers, salmon fish.

ВВЕДЕНИЕ

Фурункулёз – инфекционное заболевание лососевых рыб, этиологическим агентом которого является бактерия *Aeromonas salmonicida* (сем. Aeromonadaceae) [Головина и др., 2003]. Заболевание встречается в лососевых хозяйствах США, Канады, Западной Европы, Японии, Кореи и других стран [Austin, Austin, 2016; Du et al., 2018]. На Дальнем Востоке РФ патоген зарегистрирован в естественных популяциях на Сахалине, Камчатке, Курильских о-вах, в Хабаровском крае. Случаи инфицирования молоди выявлены на лососевых рыбодоводных заводах на Сахалине у кеты, на Камчатке у молоди кеты и кижуча [Галанина, Ломакина, 2011; Устименко, Сергеенко, 2020].

Актуальность исследований фурункулёза у лососевых рыб в России, начатых в 80-е гг. прошлого века, сохраняется, поскольку решаются задачи регионализации территории РФ по заболеванию, определению границ его распространения, что важно для принятия решений по введению ограничений, направленных на предотвращение распространения возбудителя, а также разработке мер профилактики и лечения заболевания [Приказ Минсельхоза¹..., 2015].

Согласно разработанной несколько десятилетий назад методике диагностики фурункулёза, вошедшей в состав «Инструкции о мероприятиях по профилактике и мерах борьбы с фурункулёзом лососевых рыб» [Сборник инструкций..., 1998], идентификация возбудителя заболевания происходит путём фенотипирования с определением большого числа культуральных и биохимических характеристик возбудителя при росте на различных диагностических средах и постановке многочисленных тестов. Длительность диагностического исследования при этом составляет не менее пяти-семи суток.

Множество проведённых исследований, посвящённых оценке возможности использования молекулярно-генетических методов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для обнаруже-

ния возбудителей бактериальных заболеваний рыб, показало, что прямой анализ маркёрных фрагментов геномов позволяет избегать проблем культивирования и неспецифической детекции. Кроме того, появляется возможность эффективно и быстро выявлять как отдельные микроорганизмы, так и целые группы бактерий в пробах биологического материала у больных рыб [Tirola et al., 2002; Steinum et al., 2009], в том числе и возбудителей фурункулёза у лососевых рыб.

Начиная с 90-х гг. прошлого столетия, разрабатывались варианты детекции возбудителя фурункулёза *A. salmonicida* на основе полимеразной цепной реакции [Hiney et al., 1992; Miyata et al., 1996; Beaz-Hidalgo et al., 2008]. В качестве видоспецифичного участка ДНК для подбора праймеров чаще других исследователи выбирали ген *varA*, кодирующий синтез белка А-слоя, покрывающего клетку и обуславливающего вирулентность бактерии. Были предложены различные варианты праймеров для обнаружения и идентификации ДНК возбудителя [Викторов др., 2018; Gustafson et al., 1992; Mooney et al., 1995; Høie et al., 1999; Hidalgo et al., 2008; Gulla et al., 2016].

Подобрать праймеры из описанных в литературе для разрабатываемых в настоящее время отраслевых методических материалов по лабораторной диагностике фурункулёза лососевых рыб ПЦР-методом и провести, используя выбранные праймеры, тестовую видовую идентификацию бактериальных культур, выделенных от лососей – основная цель исследований, результаты которых представлены в настоящей работе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбранные для апробации и тестирования олигонуклеотиды (праймеры) были синтезированы ООО «Синтол». Характеристики праймеров приведены в табл. 1 раздела «Результаты и обсуждение».

Для оценки видовой специфичности праймеров были использованы 5 культур бактерий, в том числе:

– *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 948) № В-1138 и *Vibrio parahaemolyticus* 616 № В-6824, зарегистрированные во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ);

¹ Приказ Минсельхоза России от 14 декабря 2015 г. № 635 «Об утверждении Ветеринарных правил регионализации территории Российской Федерации».

– *Aeromonas hydrophila* 108, *Aeromonas sobria* 106, *Vibrio alginolyticus* 180 из рабочей коллекции лаборатории СахНИРО.

В тестовой идентификации участвовали шесть культур бактерий, выделенных из паренхиматозных органов (почка, печень), фурункулов преднерестовой кеты, выловленной в реках Ольховатка (№ 204–208) и Фирсовка (№ 163) на юге Сахалина.

ДНК из суточных бактериальных культур, выращенных при комнатной температуре на ГРМ-бульоне (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk), выделяли с помощью набора D-Cells-250 (изготовитель ООО «Биолабмикс», Новосибирск) в соответствии с инструкцией производителя.

ПЦР-смесь готовили из компонентов набора Intifisa TaqM мастер-микс (зелёный) (ООО «Компания Алкор Био», Санкт-Петербург) по прописи изготовителя. Объём смеси рассчитывали с учётом количества исследуемых образцов на каждом этапе работы.

Реакционную смесь готовили из расчёта: на каждый образец 25 мкл смеси TaqM мастер-микс, 1 мкл выделенной ДНК, 23 мкл деионизированной воды, 1 мкл смеси праймеров. Итоговая концентрация праймеров в реакционной смеси – 500 нМ. В качестве отрицательного контроля в пробирку вносили деионизированную воду того же объёма – 1 мкл.

Положительным контролем служила ДНК, выделённая от культуры *A. salmonicida* из коллекции Лаборатории здоровья гидробионтов КамНИРО. Последовательность штамма зарегистрирована в GenBank под номером OQ880517. В нашей работе культуре был присвоен номер K2.

Аmplification проводили с использованием термоциклера T-100 ThermoCycler (Bio-Rad). Анализ продуктов ПЦР выполняли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере (ТАЕ). Для электрофореза использовали камеру «SE-1» (ООО «Компания Хеликон») с рабочим объёмом буфера 250 мл. Этидия бромид (10 мг/мл) добавляли в гель, ох-

лаждённый до 45–50 °С, из расчёта 3 мкл на 100 мл геля. Маркёр молекулярного веса ДНК Step 100 Long (Biolabmix) с шагом 100 п. н. (шкала 100–3000 п. н.) вносили в объёме 3 мкл. Для визуализации результатов и их документирования использовали систему Gel DOC XR+SyStem (Bio-Rad).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ литературы показал, что праймеры, предложенные К. Густафсон с соавторами [Gustafson et al., 1992] для амплификации участков гена *vapA*, кодирующих образование А-слоя у клеток возбудителя фурункулёза *A. salmonicida*, инициируют образование ПЦР-продуктов с размерами 421 п. н. и 1944 п. н.

Известно, что для вида *A. salmonicida* характерны фенотипически различимые типичные и нетипичные изоляты. Для типичных одним из важных признаков является выделение красно-коричневого пигмента при росте на агаровых средах ГРМ-агар, TSA (Tryptone Soya agar) и формирование синих колоний на СВВ-агаре (Coomassie Brilliant Blue agar). Нетипичные растут без выделения пигмента, их колонии не окрашены. Различают типичные и нетипичные изоляты и по ряду других биохимических признаков.

Разработанные праймеры [Gustafson et al., 1992] позволяют распознавать как типичные, так и нетипичные варианты *A. salmonicida* [Byers et al., 2002a; Gulla et al., 2016]. Предложенный метод рассматривается как наиболее чувствительный [Byers et al., 2002b], а набор праймеров признаётся исследователями как дающий наилучшие результаты при идентификации возбудителя [Beaz-Hidalgo et al., 2008].

Все перечисленные характеристики дали основание выбрать две пары праймеров, предложенные К. Густафсон с соавторами [Gustafson et al., 1992], для тестовой идентификации бактериальных культур, выделённых от половозрелых особей кеты из двух рек на юге Сахалина (табл. 1).

Таблица 1. Варианты праймеров к гену-мишени *vapA*

Table 1. Variants of primers for the *vapA* target gene

№ пп	Праймер	Шифр пары праймеров	Нуклеотидная последовательность	T плавления, °С	Длина ампликона, п. н. (пар нуклеотидов)	Источник
1	asa_l_f	asal	GGTGTTTGTGTTCCGGTGCTC	59,97	218	Викторов и др., 2018
2	asa_l_r		ACAGATGCGAGGGAGGTAGT	60,03		
3	AP-1 (f)	AP	GGCTGATCTCTTCATCTCACCC	65,6	412	Gustafson et al., 1992
4	AP-2 (r)		CAGAGTCAAATCTACCAGCGGTGC	66,4		
5	RAA2 (f)	RT	GATCTCACTTCAAAGAAGAGGCCGA	60	1944	
6	TJT51 (r)		GCACCACCGCTTGGCAG	54		

Третьей парой праймеров, выбранной для тестирования, стали олигонуклеотидные последовательности для амплификации участков гена *varA*, разработанные российскими исследователями [Викторов и др., 2018] и подтверждённые на специфичность к *A. salmonicida* (см. табл. 1). Размер продукта амплификации при использовании этого варианта праймеров – 218 п. н.

Прежде чем провести тестовую видовую идентификацию ДНК микроорганизмов, выделенных от лососевых рыб, выбранные праймеры были экспериментальным путём оценены на специфичность.

По результатам тестирования трёх пар праймеров для оценки их видоспецифичности на ДНК близкородственных видов бактерий *A. hydrophila* 108, *A. sobria* 106, *V. parahaemolyticus* 616 № В-6824, *V. alginolyticus* 180 и неродственных *P. fluorescens* (ATCC 948) № В-1138 ни одна из культур не дала перекрёстного результата и не была идентифицирована как *A. salmonicida*. Образование специфического продукта амплификации с размерами 421, 218, 1944 п. н. происходило только с образцом ДНК, выделенным от контрольного штамма *A. salmonicida* K2 (рис. 1).

деляли красно-коричневый пигмент, сбрасывали глюкозу на среде Хью-Лейфсона. Клетки бактерий были неподвижны, грамтрицательны, оксидазо-, каталазо-положительны. Совокупность выявленных признаков позволила предположить, что выделенные от рыб микроорганизмы относятся к виду *A. salmonicida* [Blue Book, 2020²].

В результате анализа ПЦР-продуктов шести культур методом электрофореза было выявлено наличие фрагментов ДНК длиной 421, 218, 1944 п. н. (рис. 2 (А, В, С); дорожки 2–7). Размер продуктов амплификации ДНК бактериальных культур совпал с размером продукта контрольной культуры *A. salmonicida* K2 (рис. 2, дорожка 1), что позволило отнести все идентифицируемые штаммы к виду *A. salmonicida*.

Для выбора оптимальной программы (протокола) проведения ПЦР при идентификации возбудителя была проведена амплификация ДНК тестовых культур с различным количеством циклов, вариациями времени на этапах элонгации и при разных температурах отжига. Результаты показали, что в течение 20 циклов при использовании праймеров RT амплифицируется количество продукта, недостаточное для его визуализации

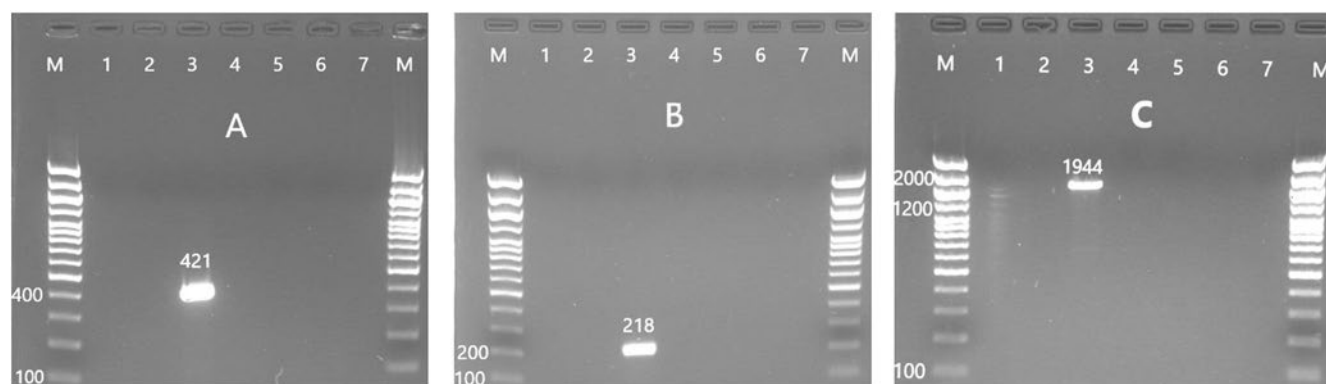


Рис. 1. Результат тестирования трёх вариантов праймеров (А – AP; В – asal, С – RT) на видоспецифичность. Дорожки: М – маркер молекулярного веса, п. н.; 1 – *A. sobria* 106; 2 – *A. hydrophila* 108; 3 – положительный контроль *A. salmonicida* K2; 4 – *V. alginolyticus* 180; 5 – *P. fluorescens* (ATCC 948) № В-1138; 6 – *V. parahaemolyticus* 616 № В-6824; 7 – отрицательный контроль

Fig. 1. The result of testing three variants of primers (A – AP; B – asal, C – RT) for species specificity. Lane: M – molecular weight marker, bp; 1 – *A. sobria* 106; 2 – *A. hydrophila* 108; 3 – positive control of *A. salmonicida* K2; 4 – *V. alginolyticus* 180; 5 – *P. fluorescens* (ATCC 948) No. B-1138; 6 – *V. parahaemolyticus* 616 No. B-6824; 7 – negative control

Далее, подтверждённые на видоспецифичность три пары праймеров были использованы для видовой идентификации ПЦР-методом шести культур бактерий (163, 204–208), выделенных от сахалинской кеты.

Следует отметить, что бактерии были выделены от рыб как с внешними признаками фурункулёза (фурункулы на теле), так и без них. При росте на среде выделения (ГРМ-агар) культуры формировали характерные для *A. salmonicida* колонии, на 2–4 сутки вы-

зали в агарозном геле. Число циклов должно быть не менее 25 (рис. 3). Для амплификации с праймерами AP и asal количество циклов может быть как 20, так и 25.

Удовлетворительный результат амплификации был получен для всех пар праймеров при темпера-

² Blue Book 2020. Fish Health Section Blue Book. 2020 Edition / Suggested Procedures For The Detection And Identification Of Certain Finfish And Shellfish Pathogens. Доступно: <https://units.fisheries.org/fhs/fish-health-section-blue-book-2020/>

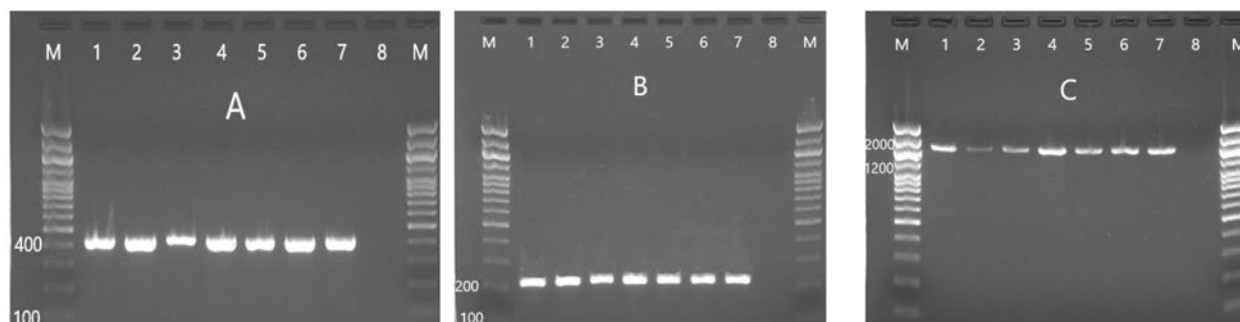


Рис. 2. Видовая идентификация с тремя вариантами праймеров (А – AP; Б – asal, С – RT). Дорожки: М – маркёр молекулярного веса, п.н; 1 – положительный контроль *A. salmonicida* K2; 2 – 163; 3 – 7-204-208; 8 – отрицательный контроль

Fig. 2. Species identification with three variants of primers (A – AP; B – asal, C – RT). Lane: M – marker of molecular weight, p.n; 1 – positive control of *A. salmonicida* K2; 2 – 163; 3 – 7-204-208; 8 – negative control

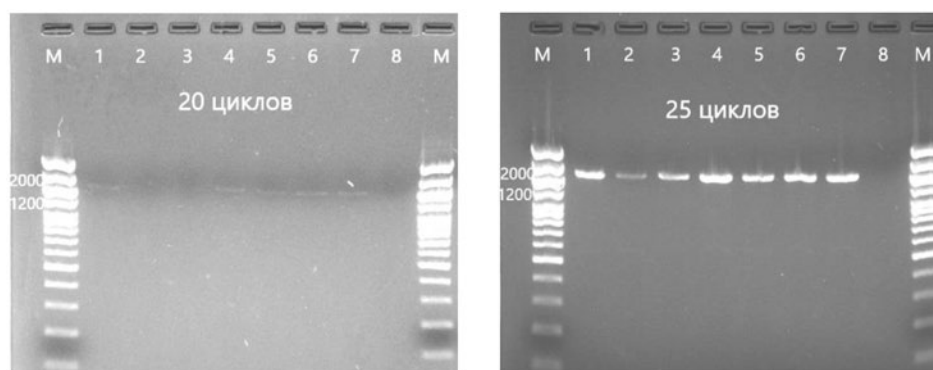


Рис. 3. Визуализация ПЦР-продуктов, полученных при 20 и 25 циклах амплификации с праймерами RT

Fig. 3. Visualization of DNA amplification products at 20 and 25 amplification cycles with RT primers

туре отжига 60 °С. Окончательный вариант протокола ПЦР для амплификации специфических участков ДНК *A. salmonicida* при использовании праймеров AP, asal, RT представлен в табл. 2.

Экспериментальным путём были подобраны условия проведения электрофореза. Режим, обеспечивающий хорошие результаты разделения ПЦР-продуктов и ДНК-маркёров, включал следующие параметры: продолжительность – 30 мин, напряжение – 200 В, сила тока – 15 мА, мощность тока – 15 Вт.

Результаты тестирования праймеров показали, что при использовании пары RT необходим более длительный процесс электрофореза в 1,5% агарозном геле, обусловленный, в частности, довольно большим размером продуктов амплификации. Для ПЦР предпочтительно использовать праймеры, образующие продукты амплификации с длиной 200–400 п. н., так как это позволяет сократить время на элонгацию при термоциклировании и электрофорезе продуктов амплификации. Более удобны по этой причине для лабораторной работы пары праймеры AP и asal.

Таблица 2. Протокол ПЦР для амплификации ДНК *A. salmonicida* с праймерами AP, asal, RT

Table 2. PCR protocol for amplification of *A. salmonicida* DNA with primers AP, asal, RT

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество повторов (циклов)
Первичная денатурация	95	3 мин	1
Денатурация	95	30 с	25–35
Отжиг праймеров	60	30 с	
Элонгация	72	1 мин	
Финальная элонгация	72	5 мин	1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате апробации трёх пар праймеров AP, asaI, RT, подобранных для целей видовой идентификации бактерий при лабораторной диагностике фурункулёза лососевых рыб, была подтверждена их видоспецифичность. Специфичность праймеров протестирована на шести бактериальных культурах, выделенных от лососевых рыб с признаками фурункулёза и без них. В ходе амплификации ДНК тестовых бактериальных изолятов были получены ПЦР-продукты размерами 218, 412 и 1944 п. н., характерные для возбудителя фурункулёза, что позволило все культуры отнести к виду *A. salmonicida*.

В ходе работы были оптимизированы протокол ПЦР и параметры детекции продуктов амплификации методом гель-электрофореза.

Результаты тестирования также показали, что ПЦР с использованием выбранных праймеров является быстрым, простым и надёжным методом идентификации *A. salmonicida*, который может быть использован при лабораторной диагностике фурункулёза лососевых рыб.

Благодарности

Выражаем признательность коллегам из лаборатории здоровья гидробионтов Камчатского филиала ФГБНУ «ВНИРО» и отдельно — ведущему научному сотруднику лаборатории Устименко Е. А. за предоставленную культуру *A. salmonicida*, использованную при проведении исследований, результаты которых представлены в настоящей работе.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Все применимые этические нормы соблюдены.

Финансирование

Работа выполнена в рамках Прикладных научно-исследовательских работ ФГБНУ «ВНИРО» по теме «Разработка общероссийской системы региональных центров по охране здоровья объектов аквакультуры с учётом специфики технологий их выращивания».

ЛИТЕРАТУРА

Викторов Д. А., Тороповский А. Н., Садртдинова Г. Н. 2018. ПЦР-тест-система для выявления и типирования возбудителей аэромоназов рыб // Рыбоводство и рыбное хозяйство. № 12 (155). С. 40–48.

Галанина Е. В., Ломакина А. В. 2012. Исследования заболеваемости фурункулёзом, вызванным инфицированием

Aeromonas salmonicida, у лососевых рыб южной части о. Сахалин // Известия РАН. Серия биологическая. № 5. С. 1–7.

Головина Н. А., Стрелков Ю. А., Воронин В. Н., Головин П. П., Евдокимова Е. Б., Юхименко Л. Н. 2003. Ихтиопатология / Головина Н. А., Бауера О. Н. ред. М.: Мир. 448 с.

Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. 1998. Часть 1. М.: Отдел маркетинга АМБ-агро. 310 с.

Устименко Е. А., Сергеев Н. В. 2020. Возбудитель фурункулёза *Aeromonas salmonicida* у тихоокеанских лососей Камчатки // Труды ВНИРО. Т 182. С. 139–150. DOI: 10.36038/2307–3497–2020–182–139–150

Austin B., Austin D. A. 2016. Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish. 6th edn.: Springer. 732 p. DOI: 10.1007/978–3–319–32674–0

Beaz-Hidalgo R., Magi G. E., Balboa S., Barja J. L., Romalde J. L. 2008. Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene // Vet. Microbiol. V. 128. Iss. 3–4. P. 386–394. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.10.004

Byers H. K., Gudkovs N., Crane M. St. J. 2002a. PCR-based assays for the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. I. Evaluation of three PCR primer sets with infected fish for detection and identification // Dis. Aquat. Org. V. 49 (2). P. 129–138.

Byers H. K., Cipriano R. C., Gudkovs N., Crane M. St. J. 2002b. PCR-based assays for the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. II. Further evaluation and validation of three PCR primer sets with infected fish // Dis. Aquat. Org. V. 49 (2). P. 139–144.

Du Y., Liu P., Meng L., Sharawy Z., Liu Y. 2018. Colonization of *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida* strains in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during infection // Aquaculture Research. V. 49. Iss. 5. P. 1826–1833. DOI: 10.1111/ARE.13637.

Gulla S., Lund V., Kristoffersen A. B., Sorum H., Colquhoun D. J. 2016. *vapA* (A-layer) typing differentiates *Aeromonas salmonicida* subspecies and identifies a number of previously undescribed subtypes // J. of Fish Dis. V. 39. Iss. 3. P. 329–342. DOI: 10.1111/jfd.12367.

Gustafson C. E., Thomas C. J., Trust T. J. 1992. Detection of *Aeromonas salmonicida* from fish by using polymerase chain reaction amplification of the virulence surface array protein gene // Appl. and Environ. Microbiol. V. 58. No 12. P. 3816–3825. DOI:10.1128/aem.58.12.3816–3825.1992.

Hiney M., Dawson M. T., Heery D. M., Smith P. R., Gannon F., Powell R. 1992. DNA probe for *Aeromonas salmonicida* // Appl. Environ. Microbiol. V. 58. P. 1039–1042. DOI: 10.1128/aem.58.3.1039–1042.1992.

Høie S., Dalsgaard I., Aase I. L., Heum M., Thornton J. M., Powell R. 1999. Polymerase chain reaction (PCR)-based typing analysis of atypical isolates of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* // Syst. Appl. Microbiol. V. 22. Iss. 3. P. 403–411. DOI: 10.1016/S0723–2020(99)80049–6.

Miyata M., Inglis V., Aoki T. 1996. Rapid identification of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* by the polymerase chain reaction // Aquaculture. V. 141. Iss. 1–2. P. 13–24. DOI: 10.1016/0044–8486(95)01221–4

Mooney J., Powell E., Clabby C., Powell R. 1995. Detection of *Aeromonas salmonicida* in wild Atlantic salmon using

- a specific DNA probe test // *Dis. Aquat. Organ.* V. 21. No. 2. P. 131–135.
- Steinum T., Sjøstad K., Falk K., Kvellestad A., Colquhoun D.J. 2009. An RT PCR-DGGE survey of gill-associated bacteria in Norwegian seawater-reared Atlantic salmon suffering proliferative gill inflammation // *Aquaculture*. V. 293. Iss. 3–4. P. 172–179. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.05.006.
- Tiirola M., Valtonen E. T., Rintamäki-Kinnunen P., Kulomaa M.S. 2002. Diagnosis of flavobacteriosis by direct amplification of rRNA genes // *Dis. Aquat. Organ.* V. 51. No. 2. P. 93–100.
- Du Y., Liu P., Meng L., Sharawy Z., Liu Y. 2018. Colonization of *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida* strains in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during infection // *Aquaculture Research*. V. 49. Iss. 5. P. 1826–1833. DOI: 10.1111/ARE.13637.
- Gulla S., Lund V., Kristoffersen A.B., Sorum H., Colquhoun D.J. 2016. *vapA* (A-layer) typing differentiates *Aeromonas salmonicida* subspecies and identifies a number of previously undescribed subtypes // *J. of Fish Dis.* V. 39. Iss. 3. P. 329–342. DOI: 10.1111/jfd.12367.
- Gustafson C.E., Thomas C.J., Trust T.J. 1992. Detection of *Aeromonas salmonicida* from fish by using polymerase chain reaction amplification of the virulence surface array protein gene // *Appl. and Environ. Microbiol.* V. 58. No. 12. P. 3816–3825. DOI:10.1128/aem.58.12.3816–3825.1992.
- Hiney M., Dawson M.T., Heery D.M., Smith P.R., Gannon F., Powell R. 1992. DNA probe for *Aeromonas salmonicida* // *Appl. Environ. Microbiol.* V. 58. P. 1039–1042. DOI: 10.1128/aem.58.3.1039–1042.1992.
- Høie S., Dalsgaard I., Aase I.L., Heum M., Thornton J.M., Powell R. 1999. Polymerase chain reaction (PCR)-based typing analysis of atypical isolates of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* // *Syst. Appl. Microbiol.* V. 22. Iss. 3. P. 403–411. DOI: 10.1016/S0723–2020(99)80049–6.
- Miyata M., Inglis V., Aoki T. 1996. Rapid identification of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* by the polymerase chain reaction // *Aquaculture*. V. 141. Iss. 1–2. P. 13–24. DOI: 10.1016/0044–8486(95)01221–4.
- Mooney J., Powell E., Clabby C., Powell R. 1995. Detection of *Aeromonas salmonicida* in wild Atlantic salmon using a specific DNA probe test // *Dis. Aquat. Organ.* V. 21. No. 2. P. 131–135.
- Steinum T., Sjøstad K., Falk K., Kvellestad A., Colquhoun D.J. 2009. An RT PCR-DGGE survey of gill-associated bacteria in Norwegian seawater-reared Atlantic salmon suffering proliferative gill inflammation // *Aquaculture*. V. 293. Iss. 3–4. P. 172–179. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.05.006.
- Tiirola M., Valtonen E. T., Rintamäki-Kinnunen P., Kulomaa M.S. 2002. Diagnosis of flavobacteriosis by direct amplification of rRNA genes // *Dis. Aquat. Organ.* V. 51. No. 2. P. 93–100.
- Viktorov D.A., Toropovsky A.N., Sadrtidinova G.N. 2018. PCR-test-system for detecting and typing pathogens of fish aeromonosis // *Fish farming and fisheries*. No. 12 (155). P. 40–48. (in Russ.).
- Galanina E.V., Lomakina A.V. 2012. Studies of the incidence of furunculosis caused by infection with *Aeromonas salmonicida* in salmon fish of the southern part of the island. Sakhalin // *Izvestiya RAS. Biological series* No. 5. P. 1–7. (in Russ.).
- Golovina N.A., Strelkov Yu.A., Voronin V.N., Golovin P.P., Evdokimova E.B., Yukhimenko L.N. 2003. *Ichthyopathology / Golovina N.A., Bauer O.N. ed. Moscow: Mir. 448 p. (in Russ.).*
- Collection of instructions for combating fish diseases.* 1998. Part 1. Moscow: Marketing Department of AMB-agro. 310 p. (in Russ.).
- Ustimenko E.A., Sergienko N.V. 2020. The causative agent of *Aeromonas salmonicida* furunculosis in Pacific salmon of Kamchatka // *Trudy VNIRO*. V. 182. P. 139–150. DOI: 10.36038/2307–3497–2020–182–139–150 (in Russ.).
- Austin B., Austin D.A. 2016. *Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish.* 6th edn.: Springer. 732 p. DOI: 10.1007/978–3–319–32674–0
- Beaz-Hidalgo R., Magi G.E., Balboa S., Barja J.L., Romalde J.L. 2008. Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene // *Vet. Microbiol.* V. 128. Iss. 3–4. P. 386–394. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.10.004
- Byers H.K., Gudkovs N., Crane M. St.J. 2002a. PCR-based assays for the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. I. Evaluation of three PCR primer sets with infected fish for detection and identification // *Dis. Aquat. Org.* V. 49 (2). P. 129–138.
- Byers H.K., Cipriano R.C., Gudkovs N., Crane M. St.J. 2002b. PCR-based assays for the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. II. Further evaluation and validation of three PCR primer sets with infected fish // *Dis. Aquat. Org.* V. 49 (2). P. 139–144.

Поступила в редакцию 07.06.2023 г.

Принята после рецензии 14.09.2023 г.