

УДК 577.29

ОБНАРУЖЕНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ШТАММОВ АЭРОМОНАД МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР

© 2025 г. Д. А. Доколин¹, *, М. Н. Соколов¹, А. А. Паюта¹,
Е. А. Флёрова¹, Ю. В. Зайцева¹

¹Лаборатория экобиомониторинга и контроля качества, Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова,
Ярославль, 150003 Россия

*e-mail: DimonDokolin@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.12.2024 г.

После доработки 26.02.2025 г.

Принята к публикации 03.03.2025 г.

В данном исследовании представлен метод совместной амплификации генов α - и β -гемолизина у бактерий рода *Aeromonas*. Разработанный протокол мультиплексной ПЦР продемонстрировал высокую специфичность и чувствительность. ПЦР-скрининг показал широкое распространение генов гемолизина среди изолятов аэромонад, выделенных из объектов аквакультуры и окружающей среды. Выявлена корреляция между гемолитической активностью штаммов и наличием у них определенных генов (*hlyA* и *aerA*). Предлагаемый способ может стать полезным инструментом для эпидемиологического мониторинга распространения патогенных видов аэромонад, что имеет важное значение для обеспечения биологической безопасности продукции рыбоводства.

Ключевые слова: *Aeromonas*, условно-патогенные бактерии, полимеразная цепная реакция, факторы патогенности, α -гемолизин, β -гемолизин, тест-система

DOI: 10.7868/S3039579X25040092

Бактерии рода *Aeromonas* – повсеместно распространенные грамотрицательные, факультативно анаэробные палочковидные бактерии. Род *Aeromonas* включает более 35 видов, выделенных в основном из водной среды, почвы и различных животных [1, 2]. Представители данного рода способны вызывать заболевания у рыб, земноводных и млекопитающих. Наиболее известные патогены рыб – *A. hydrophila* и *A. salmonicida* [3, 4]. *A. salmonicida* вызывает фурункулез и геморрагическую септицемию у лососевых рыб, что приводит к колоссальным экономическим потерям в континентальной и морской аквакультуре [5]. Некоторые гипервирулентные штаммы *A. hydrophila* вызывают крупномасштабные вспышки заболевания, характеризующегося массивным кровотечением и экзофтальмией у тепловодных рыб [6, 7].

Употребление зараженных продуктов питания может стать причиной развития инфекции у человека. Аэромонады являются новыми зоонозными патогенами, которые могут вызывать острый гастроэнтерит, раневые инфекции и даже опасную

для жизни септицемию у иммунодефицитных и иммунокомпетентных лиц. Наиболее распространенными видами аэромонад, выделенных из клинических образцов, являются *A. caviae*, *A. veronii*, *A. dhakensis* и *A. hydrophila*. Передача вирулентных штаммов происходит фекально-оральным путем как через косвенный, так и через прямой контакт с загрязненной водой [8, 9].

Для совершенствования биологической безопасности водных биотопов и предотвращения распространения инфекций, вызываемых бактериями рода *Aeromonas*, необходимо проведение санитарно-бактериологических исследований водных объектов, объектов окружающей среды, а также пищевых продуктов [10]. В связи с этим особую важность приобретает задача совершенствования методов идентификации аэромонад и оценки их эпидемиологической значимости.

В настоящее время наличие бактерий рода *Aeromonas* в исследуемом материале определяется преимущественно микробиологическими методами с использованием индикаторных и селективных

питательных сред (кровяной агар, фурункулезный агар и др.). Существенными недостатками данной группы методов являются низкая специфичность, длительность проведения и трудоемкость анализа. ПЦР-диагностика представляет собой более эффективный метод лабораторного обследования для выявления аэромонад в различном биологическом материале [11–13]. Амплификация целевых фрагментов бактериального генома все шире используется для их обнаружения и диагностики [14].

Определение патогенного потенциала микроорганизма имеет важное значение при диагностике инфекций. На сегодняшний день установлены некоторые факторы патогенности бактерий рода *Aeromonas*. Они включают в себя различные гидролитические ферменты, термостабильные и термолабильные энтеротоксины, гемолизины и некоторые др. [15, 16]. Показана прямая зависимость между количеством генов, детерминирующих различные факторы патогенности, и вирулентностью изолята [14, 16]. В то время как большая часть исследований факторов патогенности аэромонад посвящена энтеротоксинам, гемолизинам остаются малоизученными. У бактерий рода *Aeromonas* они представлены α -гемолизином и β -гемолизином — порообразующими белками, нарушающими целостность мембран клеток-мишеней (эритроцитов, эпителиоцитов кишечника и других клеток). Синтез данных факторов патогенности детерминируют гены *hlyA* и *aerA* соответственно [17]. Показано, что штаммы бактерий рода *Aeromonas*, имеющие несколько типов факторов патогенности (в том числе два и более видов гемолизина), имеют больший патогенный потенциал по сравнению со штаммами, продуцирующими один тип гемолизина [14, 18, 19].

Цель данного исследования — разработка и апробация тест-системы на основе мультиплексной ПЦР для обнаружения гемолитических штаммов бактерий рода *Aeromonas*.

МЕТОДИКА

Штаммы и среды для культивирования. В работе использованы штаммы бактерий рода *Aeromonas*, выделенные из почвы, а также водной среды и тканей радужной форели за период с 2019 по 2023 годы в рамках деятельности лаборатории из различных природных источников и объектов аквакультуры (Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022623573, Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022622850). Среди исследуемых изолятов 12 штаммов относились к виду *A. piscicola*, 5 — к виду *A. salmonicida*, 31 — к виду *A. veronii*, 2 — к виду *A. bestiarum*, 1 — к виду *A. sobria*. Для 11 штаммов точную видовую принадлежность не удалось установить (данные не представлены). Для пересева, выделения в чистую культуру и дальнейшей идентификации с исполь-

зованием молекулярно-генетических методов отбирали колонии, окрашенные в пурпурный цвет. Далее штаммы культивировали в чашках Петри на агаризованной питательной среде LB при 28°C.

Выделение ДНК. Выделение ДНК исследуемых штаммов осуществляли с использованием коммерческих наборов *diaGene* (“Диаэм”, Россия) согласно инструкции производителя. Полученные препараты ДНК хранили при температуре –20°C.

Выявление гемолитической активности у исследуемых штаммов. Наличие гемолитической активности у исследуемых штаммов определяли с помощью культивирования на агаризованной среде LB с добавлением 5% эритроцитарной массы. О наличии или отсутствии гемолиза судили по появлению зоны просветления вокруг колонии (для β -гемолиза) или изменению окраски среды по периметру колонии на зеленоватую (для α -гемолиза). Воспроизводимость данных гемолиза для всех изолятов была продемонстрирована в трех повторностях.

Дизайн олигонуклеотидных праймеров. Для дизайна праймеров использовали референсные последовательности из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>): для гена *aerA* — нуклеотидные последовательности данного гена у *A. hydrophila* (GeneBank EU009398.1, M16495.1, MT491733.1, AY136943.1, HQ425626.1, EU159683.1) и *Aeromonas sobria* (GeneBank KP942428.1, KP942424.1), а для гена *hlyA* — нуклеотидные последовательности гена у *A. hydrophila* (GeneBank LC424297.1, GU229025.1, AB206039.1, U81555.1, KF786302.1), *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (GeneBank MK592413.1) и *A. veronii* (GeneBank KU845732.1, KU845731.1). Определение консервативных участков генов проводили с помощью программного обеспечения Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). Праймеры были разработаны с использованием программного обеспечения GeneRunner (<https://www.generunner.net/>). При подборе праймеров учитывали наличие точечных нуклеотидных замен в последовательностях генов гемолизина. Последовательность праймеров, целевые гены и длины ожидаемых ампликонов приведены в табл. 1. Все праймеры, использованные в этом исследовании, были синтезированы компанией “Евроген” (Россия).

Условия проведения ПЦР. Реакцию амплификации проводили с использованием набора HS Taq PCR Color ×2 (“Биолабмикс”, Россия). Реакционная смесь объемом 20 мкл включала 10 мкл буфера, по 1 мкл каждого праймера, 2 мкл матрицы (исходная концентрация 0.01–10 нг/мкл) и 4 мкл деионизированной воды. В качестве положительного контроля был использован штамм *A. piscicola* GPR23, для которого ранее был секвенирован ге-

Таблица 1. Праймеры и продукты ПЦР для мультиплексного ПЦР-анализа

Ген	Праймер	Последовательность	Длина фрагмента, п. н.	Источник
<i>aerA</i>	AerA-F	5'-CAACTGGTCVAARACSRAYAC-3'	560	Данная работа
	AerA-R	5'-CGGCRAACTGRCTYTCRGC-3'		
<i>hlyA</i>	HlyA-F	5'-ATGCCAARATAGTGCGGAT-3'	260	Данная работа
	HlyA-R	5'-GCCCATCCTTGTTACATC-3'		
<i>gyrA</i>	gyrA-F	5'-ATGAGCGATCTGGCCAGAGA-3'	810	[27]
	gyrA-R	5'-CGCGCCTTGTTACCTGATA-3'		

ном (BioProject PRJNA768251) и показана гемолитическая активность.

Подбор оптимальной температуры отжига осуществляли с помощью градиентной ПЦР на приборе GeneExplorer GE-96G (“Bioer”, КНР). Полимеразную цепную реакцию проводили при следующих параметрах: предварительная денатурация – 5 мин при 94°C; денатурация – 30 с при 94°C, отжиг праймеров – 40 с при градиенте температур 54–71°C и элонгация – 40 с при 72°C (30 циклов); финальная элонгация – 5 мин при 72°C.

Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле и визуализировали в УФ-свете после окрашивания бромистым этидием с использованием трансиллюминатора ЕСХ-F15.М (“Vilber Lourmat”, Франция) и видеосистемы гель-документирования “Взгляд”.

Чувствительность и специфичность используемого протокола мультиплексной ПЦР. Чувствительность реакции определяли методом серийных разведений ДНК *A. piscicola* GPR23 в пределах 10–0.00001 нг/мкл. Специфичность реакции была протестирована с использованием ДНК других видов бактерий: *Pseudomonas yamanorum* GEOT18 (GenBank MT180656), *Brevibacterium* sp. GRP218, *Pantoea* sp. GET11 (GenBank MT180667), *Bacillus* sp. Gep07 (GenBank MT180660) и *Rhodococcus* sp. VER34 (GenBank CP085042.1) и *Citrobacter* sp. A4.

Статистический анализ данных. Для анализа и интерпретации результатов исследования были использованы статистические методы. Так как данные, полученные в ходе исследования, представлены дихотомическими величинами, а размер выборки не велик, для проверки гипотезы о взаимосвязи переменных был применен точный тест Фишера [20]. Для оценки корреляции между этими величинами был использован показатель ϕ -квadrat, рассчитываемый по формуле:

$$\phi = \sqrt{\chi^2/N},$$

где ϕ – коэффициент корреляции, χ^2 – критерий согласия Пирсона, N – размер выборки.

Для повышения статистической значимости результатов корреляции была применена симуляция p -value, реализованная в пакетах статистической обработки языка программирования R [21, 22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки эффективности разработанной системы была проведена предварительная стандартная ПЦР с каждой парой праймеров на целевые гены *aerA* и *hlyA*, а затем мультиплексная ПЦР с использованием ДНК эталонного штамма бактерий. В качестве внутреннего положительного контроля была использована пара праймеров к гену α -субъединицы ДНК-гиразы (*gyrA*) (табл. 1). На рис. 1 показаны результаты ПЦР с ожидаемой длиной ампликонов, полученных с праймерами 1–2 (длина фрагмента 560 п.н.) и 3–4 (длина фрагмента 260 п.н.). В ходе градиентной ПЦР установлено, что 62°C является оптимальной температурой отжига.

При проведении контрольной ПЦР с ДНК бактерий других видов в качестве матрицы продуктов ПЦР получено не было. Предел обнаружения ДНК при использовании метода мультиплексной ПЦР составил менее 1 нг/мкл. Найденное значение предела обнаружения лежит в диапазоне аналогичных значений, представленных в литературе для тест-систем на основе мультиплексной ПЦР [23, 24].

Разработанный протокол мультиплексной ПЦР был использован для обнаружения генов α - и β -гемолизинов у 62 штаммов аэромонад. Контрольная ПЦР с праймерами к гену *gyrA* оказалась положительной/дала положительный результат при использовании в качестве матрицы препаратов ДНК, выделенных из всех исследуемых изолятов *Aeromonas*.

На основании результатов проведенного скрининга исследуемых штаммов было выделено

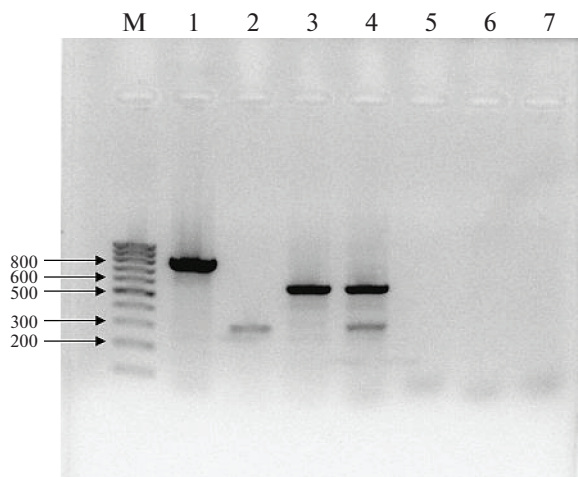


Рис. 1. Электрофорез в геле агарозы продуктов амплификации генов *aerA* и *hlyA* для эталонного штамма *A. piscicola* GPR23: М – маркер длин ДНК; 1 – продукт амплификации участка гена *gyrA*; 2 – продукт амплификации участка гена *hlyA*; 3 – продукт амплификации участка гена *aerA*; 4 – продукты мультиплексной амплификации фрагментов генов *aerA* и *hlyA*; 5–7 отрицательные контрольные образцы для пар праймеров к генам *gyrA*, *hlyA* и *aerA* соответственно.

3 генотипа в соответствии с наличием или отсутствием генов гемолизина у бактерий рода *Aeromonas*: *hlyA*⁻/*aerA*⁺ (генотип 1), *hlyA*⁺/*aerA*⁺ (генотип 2) и *hlyA*⁻/*aerA*⁻ (генотип 3). Результаты скрининга приведены в табл. 2.

Ген *aerA*, отвечающий за синтез β-гемолизина, был обнаружен у 82.3% штаммов (51 из 62 исследованных), а ген *hlyA*, отвечающий за синтез

α-гемолизина, был выявлен у 19.4% (12 из 62) исследованных штаммов. Большинство штаммов, для которых экспериментально было показано наличие одновременно генов *hlyA* и *aerA*, были выделены из почвы (рис. 2).

Оценка фенотипических характеристик показала, что 52 изолята из 62 проявляли гемолитическую активность: отмечалось просветление питательной среды вокруг колонии изолята, что указывало на принадлежность данных штаммов к β-гемолитическим. (табл. 2).

Распределение изученных штаммов по фенотипу и генотипу произошло следующим образом (рис. 2). Среди гемолитических аэромонад (52 штамма) оба гена гемолизина (*aerA* и *hlyA*) были обнаружены у 11 штаммов, у 39 штаммов был идентифицирован только ген *aerA*. Таким образом, результаты мультиплексной ПЦР совпали с результатами оценки наличия гемолитической активности микробиологическим методом в 59 из 62 случаев. Эффективность представленной тест-системы составила 95%.

У одного штамма наблюдалось отсутствие гемолитической активности при наличии генов гемолизина. Фенотипические методы не всегда позволяют адекватно оценить патогенный потенциал бактерий. Ранее было показано, что изоляты *A. caviae*, которые не проявляли цитотоксическую или гемолитическую активность, восстанавливали способность экспрессировать гены токсинов после пассажа через животных, но снова теряли ее при последующем субкультивировании [25]. Таким образом, отсутствие гемолитической активности у исследуемых штаммов аэромонад может быть результатом метаболических перестроек, возник-

Таблица 2. Распространение гемолитического фенотипа и наличия генов гемолизина у бактерий рода *Aeromonas*

Организм	Фенотип	<i>hlyA</i> ⁻ / <i>aerA</i> ⁺ (генотип 1)	<i>hlyA</i> ⁺ / <i>aerA</i> ⁺ (генотип 2)	<i>hlyA</i> ⁻ / <i>aerA</i> ⁻ (генотип 3)
<i>A. piscicola</i>	Гемолитический	4	7	0
	Не гемолитический	0	1	0
<i>A. salmonicida</i>	Гемолитический	3	1	1
<i>A. bestiarum</i>	Гемолитический	0	2	0
<i>A. veronii</i>	Гемолитический	27	0	0
	Не гемолитический	0	0	4
<i>A. sobria</i>	Гемолитический	1	0	0
<i>Aeromonas</i> sp.	Гемолитический	4	1	1
	Не гемолитический	0	0	5
Всего		39	12	11

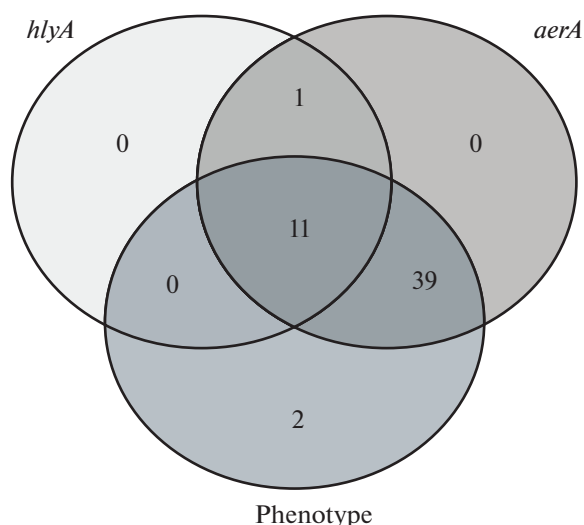


Рис. 2. Распределение штаммов по фенотипу и генотипу.

ших в процессе их культивирования. Кроме того, негемолитические изоляты могли иметь мутации в генах гемолизина [19]. С другой стороны, два штамма демонстрировали гемолитический фенотип при отрицательном результате ПЦР-теста, что можно объяснить наличием у данных изолятов генов гемолизина, не идентифицированных в ходе настоящего исследования. Так, например, цитолитический энтеротоксин (Act) из *A. hydrophila*, может обладать гемолитической активностью [26]. Также различия в последовательности ДНК-мишени могли быть одним из объяснений отсутствия продуктов ПЦР-амплификации [19].

Проведена оценка корреляции между фенотипом и генотипом для всей совокупности выборок, а также для выборок, разделенных по месту отбора пробы и систематической принадлежности выделенных бактерий. Это позволило более детально изучить взаимосвязи между различными параметрами в отдельных группах, а также установить взаимосвязь группы и каждого отдельного параметра. Для того, чтобы доказать статистическую значимость различий между этими группами, был использован точный тест Фишера. По результатам тестирования p -value составило 0.0005, что указывало на достоверность различий между отдельными выборками.

Анализ генотипов, представленных в табл. 2, выявил два интересных момента. Присутствие в геноме гена *aerA* (генотип 1) имело высокий коэффициент корреляции ($\phi = 0.96$) с проявлением штаммом гемолитической активности. Наличие у исследуемых штаммов обоих генов (*aerA* и *hlyA*) также имело высокую корреляцию ($\phi = 0.96$) с гемолитическими свойствами исследуемых аэромонад. Полученные результаты согласуются с исследованиями других авторов. Ранее было

показано, что проявление гемолитической активности у аэромонад в высокой степени коррелирует с наличием гена *aerA* [19, 27]. Ген *hlyA* так же является важным фактором патогенности. Установлено, что Hly-белки обеспечивают цитотоксические свойства бактерий рода *Aeromonas*. Результаты проведенных исследований указывали на то, что наиболее вирулентные аэромонады продуцировали как минимум два разных гемолитических токсина [27]. Гемолизины, кодируемые генами *aerA* и *hlyA*, могли действовать синергетически, обеспечивая цитотоксическую активность аэромонад и повышая их способность вызывать инфекции [28, 29].

Был проведен анализ корреляции между фенотипом и генотипом у штаммов, сгруппированных по источнику выделения. Статистический анализ проводили для выборок штаммов, выделенных из почвы и здоровой рыбы, поскольку количество штаммов, выделенных из других источников, было малочисленным. Среди бактерий, выделенных из почвы, корреляция между фенотипом и наличием гена *aerA* была умеренной ($\phi = 0.32$), а между фенотипом и наличием *hlyA* статистически значимая связь отсутствовала ($\phi = 0.05$). Оба гена гемолизина были выявлены у 11 штаммов, из них 10 проявили гемолитические свойства. Среди штаммов, выделенных из здоровой рыбы, была выявлена сильная положительная корреляция между фенотипом и наличием гена *aerA* ($\phi = 1.0$). Все штаммы, несущие ген *aerA*, обладали гемолитической активностью. Ген *hlyA* был обнаружен лишь у одного изолята, выделенного из здоровой рыбы. Полученные результаты показывают, что штаммы, обладающие высоким патогенным потенциалом, присутствовали как в почве, так и в биологическом материале здоровой рыбы. Ранее в других исследованиях не было обнаружено корреляции между патогенностью штаммов и местом выделения [27, 30]. Вирулентные штаммы аэромонад, несущие гены гемолизина и обладающие гемолитической активностью, были выделены из воды, рыбы, продуктов питания [27, 29, 31, 32].

В группах, выделенных по видовой принадлежности штаммов, сильная корреляция между исследуемыми параметрами обнаружена только у *A. veronii*. Ген *aerA* у бактерий этого вида, показал высокую положительную ($\phi = 1.0$) связь с фенотипом. Для бактерий других видов статистически значимая корреляция не выявлена.

Согласно данным других исследований, гены гемолизина *aerA* и *hlyA* часто обнаруживаются у аэромонад различной видовой принадлежности [32–34]. Однако следует заметить, что большинство исследований сосредоточены на представителях рода *Aeromonas*, являющихся потенциальными возбудителями инфекций человека (*A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. caviae* и некоторых др.) [32, 33, 35]. Настоящее исследование расширяет представле-

ние о гемолитической активности малоизученных в этом отношении видов *A. piscicola* и *A. bestiarum*, которые также могут быть возбудителями инфекций в аквакультуре [36, 37].

Таким образом, большинство штаммов *Aeromonas*, находящихся в кишечном содержимом здоровой рыбы и в окружающей среде, могут иметь множественные профили вирулентности, что указывает на потенциальный риск для здоровья человека. Результаты этого исследования подчеркивают важность использования молекулярных методов для скрининга определенных генов гемолизина. Совершенствование диагностических систем позволит предсказывать патогенный потенциал аэромонад и, следовательно, обеспечивать безопасность анализируемых продуктов.

* * *

Разработан протокол мультиплексной ПЦР для простого и быстрого обнаружения гемолитических аэромонад. Высокая специфичность, скорость выполнения анализа и хорошая воспроизводимость результатов делают метод ПЦР более привлекательным по сравнению с методами фенотипической идентификации. Данная тест-система позволяет определить наличие генов гемолизина у представителей различных видов бактерий рода *Aeromonas*. Кроме того, представленный протокол можно легко расширить на другие гены факторов патогенности у аэромонад, которые уже известны или могут быть обнаружены в будущем. Скрининг на специфические гены цитотоксинов и гемолизина, по-видимому, является наиболее эффективным способом обнаружения и характеристики факторов вирулентности *Aeromonas*.

ПЦР-диагностика с использованием разработанного протокола показала, что гены гемолизина широко распространены среди изолятов аэромонад, выделенных из биологического материала рыб и почвы. Штаммы бактерий рода *Aeromonas*, выделенные из здоровых особей радужной форели, имели высокий патогенный потенциал, о чем свидетельствует наличие у них как минимум одного из двух рассматриваемых генов гемолизина, а также высокая положительная связь между наличием гена *aerA* и гемолитическим фенотипом. Также это указывает на их возможную роль в качестве оппортунистических патогенов радужной форели. Своевременное обнаружение аэромонад в объектах аквакультуры имеет большое значение для профилактики инфекции и разработки методов борьбы с ней. Мультиплексный ПЦР-анализ, описанный в этом исследовании, может стать не только перспективным инструментом для молекулярной диагностики, но и способствовать углубленному изучению механизмов вирулентности у бактерий рода *Aeromonas*, что имеет важное значение для

повышения биологической безопасности и устойчивости экосистем аквакультуры.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование частично выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-76-00065, <https://rscf.ru/project/24-76-00065/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит материалов исследований с использованием животных и человека в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andriyanov P.A., Kashina D.D., Liskova E.A., Zhurilov P.A., Tutrina A.I., Ermolaeva S.A. et al. // Scientific Reports. 2023. V. 13. № 1. Article 4315. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31306-3>
2. Chen J.S., Hsu G.J., Hsu B.M., Yang P.Y., Kuo Y.J., Wang J.L. et al. // Environmental Pollution. 2021. V. 287. Article 117361. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117361>
3. Hidalgo-Vila J., Martinez Silvestre A., Pérez-Santiago N., León-Vizcaíno L., Díaz-Paniagua C. // Amphibia-Reptilia. 2020. V. 41. № 4. P. 509–518. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10021>
4. Park S.Y., Han J.E., Kwon H., Park S.C., Kim J.H. // J. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 30. № 10. P. 1443–1457. <https://doi.org/10.4014/jmb.2005.05040>
5. Vanden Bergh P., Frey J. // Microbial Biotechnology. 2014. V. 7. № 5. P. 381–400. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12091>
6. Gonzalez-Avila L.U., Loyola-Cruz M.A., Hernández-Cortez C., Bello-López J.M., Castro-Escarpulli G. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22, № 11. Article 5974. <https://doi.org/10.3390/ijms22115974>
7. Rasmussen-Ivey C.R., Hossain M.J., Odom S.E., Terhune J.S., Hemstreet W.G., Shoemaker C.A. et al. // Front. Microbiol. 2016. V. 18. № 7. Article 1615. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01615>
8. Fernández-Bravo A., Figueras M.J. // Microorganisms. 2020. V. 8. № 1. Article 129. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010129>
9. Zhao Y., Alexander J. // Cureus. 2021. V. 13. № 12. Article e20834. <https://doi.org/10.7759/cureus.20834>
10. Катаева Л.В., Степанова Т.Ф., Посоюзных О.В., Ташланова В.В., Карпущина Н.Ф., Колотова О.Н. et al. // Здоровье населения и среда обитания. 2018. № 6. С. 54–57.

11. Патент КНР. 2008. № 101235411 CN.
12. Патент КНР. 2010. №101736073 CN.
13. Патент РФ. 2014. № 2514668 С1.
14. *El-Bahar H.M., Ali N.G., Aboyadak I.M., Abd El Salam S.K., Ibrahim M.S.* // International Microbiology. 2019. V. 22. № 4. P. 479–490.
<https://doi.org/10.1007/s10123-019-00075-3>
15. *Lee H.J., Storesund J.E., Lunestad B.T., Hoel S., Lerfall J., Jakobsen A.N.* // Front. Microbiol. 2023. V. 14. Article 1175304.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1175304>
16. *Sadique A., Neogi S.B., Bashar T., Sultana M., Johura F.T., Islam S. et al.* // Front. Public Health, 2021. V. 9. Article 692166.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.692166>
17. *Epple H.J., Mankertz J., Ignatius R., Liesenfeld O., Fromm M., Zeitz M. et al.* // Infection and Immunity. 2004. V. 72. № 8. P. 4848–4858.
<https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4848-4858.2004>
18. *Zhu D., Li A., Wang J., Li M.* // Frontiers of Biology in China, 2007. V. 2. P. 176–179.
<https://doi.org/10.1007/s11515-007-0024-4>
19. *Wang G., Clark C.G., Liu C., Pucknell C., Munro C.K., Kruk T.M. et al.* // J. Clin. Microbiol. 2003. V. 41. № 3. P. 1048–1054.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1048-1054.2003>
20. *Цорин И.Б.* // Фармакокинетика и фармакодинамика, 2019. № 3.С. 3–18.
21. *Wickham H.* ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Houston: Springer-Verlag, 2016. P. 241–253.
22. *Eddelbuettel D.* // Journal of Statistical Software. 2011. V. 40. P. 1–4.
23. *Mehrabadi J.F., Morsali P., Nejad H.R., Imani Fooladi A.A.* // J. Infect. Public Health. 2012. V. 5. № 3. P. 263–267.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2012.02.004>
24. *Balakrishna K., Murali H.S., Batra H.V.* // Indian J. Microbiol. 2010. V. 50. P. 139–144.
<https://doi.org/10.1007/s12088-010-0038-5>
25. *Singh D.V., Sanyal S.C.* // J. Med. Microbiol. 1992. V. 37. №. 4. P. 262–267.
<https://doi.org/10.1099/00222615-37-4-262>
26. *Chopra A.K., Houston C.W., Peterson J.W., Jin G.F.* // Can. J. Microbiol. 1993. V. 39. № 5. P. 513–523.
<https://doi.org/10.1139/m93-073>
27. *Heuzenroeder M.W., Wong C.Y., Flower R.L.* // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 174. № 1. P. 131–136.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13559.x>
28. *Hammad A.M., Moustafa A.H., Mansour M.M., Fahmy B.M., Hamada M.G., Shimamoto T. et al.* // J. Food Prot. 2018. V. 81. № 6. P. 1015–1021.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-360>
29. *Zhang D., Feng J., Wang Y., Shoemaker C.A., Wise A.A., Beck B.H.* // FEMS Microbiol. Lett. 2025. V. 372. Article fnae108.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnae108>
30. *Hoel S., Vadstein O., Jakobsen A.N.* // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Article 931.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00931>
31. *Sherif A.H., Kassab A.S.* // BMC Microbiology, 2023, V. 23. № 1. Article 80.
<https://doi.org/10.1186/s12866-023-02827-8>
32. *Qu F.T., Wang W.Q., Liu Q., Zhou H.J., Hu J.R., Du X.L. et al.* // Biomed. Environ. Sci. 2022. V. 35. № 9. P. 842–853.
33. *Igbinsosa I.H., Igbinsosa E.O., Okoh A.I.* // Environmental Science and Pollution Research International. 2016. V. 23. № 12. P. 12199–12205.
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-6421-y>
34. *Sadiq S.T., Al-Hamdani A.H.A., Taha Z.M.* // Veterinary Research Forum. 2024. V. 15. № 10. P. 529–536.
<https://doi.org/10.30466/vrf.2024.2010315.3998>
35. *Hussain I.A., Jeyasekaran G., Shakila R.J., Raj K.T., Jeevithan E.* // J. Food Sci. Technol. 2014. V. 51. № 2. P. 401–407.
<https://doi.org/10.1007/s13197-013-1190-9>
36. *Beaz-Hidalgo R., Alperi A., Figueras M.J., Romalde J.L.* // Systematic and Applied Microbiology. 2009. V. 32. № 7. P. 471–479.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.06.004>
37. *Lee H.J., Hoel S., Lunestad B.T., Lerfall J., Jakobsen A.N.* // J. Appl. Microbiol. 2021. V. 130. № 4. P. 1380–1393.
<https://doi.org/10.1111/jam.14865>

Detection of Hemolytic Strains of *Aeromonas* by Multiplex PCR

D. A. Dokolin^{a, *}, M. N. Sokolov^a, A. A. Payuta^a, E. A. Fleurova^a, Y. V. Zaitseva^a

^a*Demidov Yaroslavl State University, Laboratory of Ecobiomonitoring and Quality Control, Yaroslavl, 150003 Russia*

**e-mail: DimonDokolin@yandex.ru*

This study presents a method for the co-amplification of α - and β -haemolysin genes in bacteria of the genus *Aeromonas*. The developed multiplex PCR protocol demonstrated high specificity and sensitivity. PCR screening showed a wide distribution of haemolysin genes among *Aeromonas* isolates isolated from aquaculture and environmental sites. A correlation was found between the haemolytic activity of strains and the presence of certain genes (*hlyA* and *aerA*). The proposed method may become a useful tool for epidemiological monitoring of the spread of pathogenic aeromonad species, which is important for ensuring biological safety of fish production.

Keywords: Aeromonas, opportunistic bacteria, polymerase chain reaction, pathogenicity factors, α -hemolysin, β -hemolysin, test system