

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Ульяновский государственный аграрный университет
имени П. А. Столыпина»

На правах рукописи

ЛОМАКИН АРТЁМ АНДРЕЕВИЧ

**Разработка методов лабораторной диагностики инфекций,
вызываемых бактериями *Aeromonas hydrophila***

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, доцент
Феоктистова Наталья Александровна

Ульяновск - 2025

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Таксономия бактерий рода <i>Aeromonas</i>	13
1.2. Распространение бактерий рода <i>Aeromonas</i>	16
1.2.1. Распространение <i>Aeromonas</i> в водной среде	16
1.2.2. Распространение бактерий рода <i>Aeromonas</i> в продуктах питания....	19
1.2.3. Распространение бактерий рода <i>Aeromonas</i> у гидробионтов и теплокровных животных	23
1.3. Анализ эпизоотической ситуации по аэромонозу на территории Российской Федерации	26
1.4. Биологические свойства бактерий рода <i>Aeromonas</i>	28
1.5. Устойчивость к антибактериальным препаратам бактерий рода <i>Aeromonas</i>	31
1.6. Характеристика геномов бактерий <i>A. hydrophila</i>	35
1.7. Факторы вирулентности бактерий <i>Aeromonas hydrophila</i>	38
1.8. Схемы выделения и идентификации бактерий рода <i>Aeromonas</i>	45
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	53
2.1. Объекты, материалы и методы	53
2.2. Результаты исследований и их обсуждение	60
2.2.1. Биологические свойства референс – штамма <i>A. hydrophila</i>	60
2.2.2. Разработка бактериологического компонента тест-системы	65
2.2.3. Разработка молекулярно-генетического компонента тест-системы ..	72
2.2.3.1. Метод ПЦР с электрофоретической детекцией результата амплификации	72
2.2.3.2. Метод ПЦР-РВ	73
2.2.3.3. Метод RT-LAMP	76

2.2.4. Разработка комплексной тест-системы для выделения и идентификации <i>A. hydrophila</i>	84
2.2.5. Апробация разработанной схемы выделения и идентификации бактерий <i>A. hydrophila</i>	86
2.2.6. Изучение антибиотикорезистентности выделенных бактериальных изолятов	97
2.2.7. Факторы вирулентности выделенных штаммов <i>Aeromonas</i>	101
2.2.8. Генотипирование выделенных изолятов <i>Aeromonas</i> spp. методами ERIC- и BOX-ПЦР	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	120
ВЫВОДЫ	130
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	132
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	132
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	134
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	136
ПРИЛОЖЕНИЯ	190

ВВЕДЕНИЕ

Аквакультура – это одна из самых быстрорастущих отраслей пищевой промышленности, снабжающая мир высококачественным белком. В 2020 году в мире было произведено 122,6 миллиона тонн продукции аквакультуры, рыночная стоимость которой составила 281,5 миллиард долларов США [173, 306, 416].

Увеличение производства аквакультуры помогает минимизировать разрыв, образовавшийся из-за нехватки продовольствия, вызванной перенаселением. Таким образом, количество выращиваемой рыбы, как на морских, так и на пресноводных фермах, значительно увеличилось за последние пять десятилетий [271].

Увеличение производства аквакультуры помогает минимизировать разрыв, образовавшийся из-за нехватки продовольствия, вызванной перенаселением. Таким образом, количество выращиваемой рыбы, как на морских, так и на пресноводных фермах, значительно увеличилось за последние пять десятилетий [271].

Бактерии *Aeromonas hydrophila* - это условно-патогенные микроорганизмы, вызывающие заболевания у рыб в условиях стресса (John, N. et al., 2019), который провоцируют изменения температуры и pH воды, высокий уровень аммиака и нитритов, низкий уровень растворенного кислорода, паразитарные инфекции, высокая плотностью посадки и т.п. [174, 358]. Некоторые исследователи выделяют *A. hydrophila* как основной патоген, вызывающий заболевания на рыбоводческих фермах, сопровождающиеся высокой смертностью и большими экономическими потерями [272, 358]. В литературе это заболевание называют «подвижной септицемией *Aeromonas*» [195], «геморрагической септицемией», «язвенной болезнью», «красной язвой» [18, 226] и «хвостовой и плавниковой гнилью» [89]. Заболевание характеризуется поверхностными поражениями, кровоизлияниями, язвами,

абсцессами, пучеглазием, наличием асцитической жидкости и поражениями печени и почек.

При анализе данных, полученных из ФГБУ «Россельхознадзор», о заболеваемости аэромонозом в Российской Федерации за период с 2014 по 2023 годы, было установлено, что оно носит эпизодический характер. За последние годы наибольшее число неблагополучных по аэромонозу хозяйств зарегистрировано на территории Московской, Оренбургской, Кировской, Челябинской, Тверской и Свердловской областей (<https://fsvps.gov.ru/jepizooticheskaia-situacija/rossija/operativnyeinformacionnye-soobshhenija/>).

Для выделения и идентификации *A. hydrophila* в лабораторных условиях настоящее время в Российской Федерации используют «Методические указания по диагностике аэромоноза (краснухи) карпов», утв. 23.04.86 №13–3/5 [11]. Однако в этих методических указаниях не представлены методы для точной идентификации *A. hydrophila* от других патогенных представителей данного рода.

В связи с этим актуальной является разработка современных методов лабораторной диагностики инфекций, вызываемых бактериями *Aeromonas hydrophila*.

Степень разработанности темы

Идентификация возбудителя заболевания очень важна для понимания процесса заболевания. В связи с этим происходит постоянное совершенствование методологии идентификации бактериальных патогенов. Фенотипические, серологические и молекулярные методы широко используются для идентификации патогенных для рыб бактерий, в том числе и для *A. hydrophila* [17, 297, 353].

Автоматизированные системы, к которым относятся API-20E, API-32GN, Vitek2, MicroScan Walk/Away, ID69-Phoenix, BBL Crystal Enteric/Nonfermenter и

система микропланшетов GN2-Omnilog, имеют ограниченное применение при идентификации представителей некоторых видов *Aeromonas* [23, 124]. Уровень точности данных методов, а также преимущества и недостатки между ними, являются предметом обсуждения. Установлена недостоверность результатов, полученных при использовании комплекса Motile для идентификации бактерий *Aeromonas*. В дополнении к этому сообщалось, что наборы для фенотипической идентификации могут давать неверные результаты в отношении видов *Aeromonas*, тогда как молекулярная идентификация довольно надёжна [167].

В ряде исследований для идентификации *A. hydrophila* был использован метод полногеномного секвенирования [123, 127]. На практике идентификация *A. hydrophila* в основном осуществляется на основе детекции генов вирулентности, к которым относятся гены: цитотоксического энтеротоксина (act), ген аэролизина (aer), ген гемолизина А (hylA) и ген энтеротоксина (ast) [410]. Однако некоторые из данных генов детектируются в штаммах, не принадлежащих к виду *A. hydrophila*, что ведёт к получению недостоверных результатов. В ряде исследований утверждалось, что нет необходимости определять все гены вирулентности в одном патогенном штамме, о чем свидетельствуют эмпирические данные, полученных на бактериальных штаммах, выделенных от рыб и из клинических образцов [71, 116, 356].

Следовательно, а также из-за ограничений, присущих этим методам, изоляты рода *Aeromonas* могут быть идентифицированы ошибочно [199, 335, 199]

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что необходимо выполнить подбор методов, основанных на детекции, как на бактериологических, так и на молекулярно-генетических характеристик *A. hydrophila*, для разработки комплексной тест-системы, которая может быть использована при проведении мониторинговых исследований.

Цель исследований – разработать и протестировать комплексную тест-систему выделения и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila*, основанную на бактериологических и молекулярно-генетических методах.

Данная цель достигается выполнением **следующих задач**:

1. Разработать бактериологический компонент тест-системы для выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila*.
2. Разработать молекулярно-генетический компонент тест-системы, включающий полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с детекцией результатов в режиме «реального времени» и метод петлевой изотермической амплификации (LAMP).
3. Провести апробацию комплексной тест-системы для выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila* на объектах ветеринарно-санитарного надзора.
4. Изучить основные физико-биохимические свойства выделенных изолятов *A. hydrophila*, включая манифестацию участков генов, кодирующих факторы вирулентности.
5. Сравнить геномные отпечатки, выделенных изолятов *A. hydrophila*, методами детекции энтеробактериальных повторяющихся межгенных консенсусных последовательностей (ERIC) и BOX-элементов.

Научная новизна

Испытание разработанной комплексной тест-системы для выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila* проводилось на 91 пробе объектов санитарного надзора, позволило сформировать коллекцию из 15 полевых изолятов, 10 из которых были идентифицированы как *A. hydrophila*, 5 - отнесены к роду *Aeromonas* spp., на основании детекции участков генов, кодирующих 16S рРНК и *gyrB*).

Подобраны праймерные системы для идентификации бактерий рода *Aeromonas*, в том числе и *A. hydrophila*, методом ПЦР с детекцией результата амплификации электрофоретическим методом.

Подобрана и оптимизирована система праймеров для идентификации бактерии *A. hydrophila* по специфичному участку, кодирующему ген клеточного деления (*zipA*), методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени».

Впервые разработана в РФ схема детекции ДНК бактерий *A. hydrophila* методом петлевой изотермической амплификации (LAMP).

Впервые представлена молекулярно-генетическая характеристика 10 изолятов *A. hydrophila*, у которых было проанализировано наличие участков генов, кодирующих факторы вирулентности, в частности: гемолизин (*hlyA*), аэролизин (*aerA*), АДФ-рибозилирующий токсин (*aexT*), цитотонический термолабильный энтеротоксин (*alt*), компоненты системы секреции T3SS (*aopB* и *ascV*), ген термостабильного цитотонического энтеротоксина (*ast*), белок, кодирующий субъединицу жгутика (*fla*), липазу (*lip*), эластазу (*ela*), ген шига-токсина (*stx-1*), систему секреция шестого типа (*vasH*).

Изучено генетическое родство референс-штаммов представителей рода *Aeromonas* и полевых изолятов *A. hydrophila* сравнением геномных фингерпринтов методами энтеробактериальных повторяющихся межгенных консенсусных последовательностей (ERIC) и при помощи BOX-элементов.

Разработана комплексная тест-система для детекции и идентификации бактерий *A. hydrophila*, включающая бактериологический и молекулярно-генетический компоненты, использование которой позволяет дополнить теоретическую базу о распространении этого инфекционного агента в объектах окружающей среды и у гидробионтов.

Усовершенствована схема выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila* из объектов окружающей среды и патологического материала, в

основу которой положены морфологические и биохимические особенности метаболизма возбудителей аэромоназа. Схема позволяет типировать искомый вид бактерии в течение 198 часов.

Молекулярно-генетический компонент тест-системы включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с детекцией результатов амплификации в режиме «реального времени» (время исследования - 2 часа) и метод петлевой изотермической амплификации (LAMP) (время исследования - 1,5 часа).

Определены показатели антибиотикорезистентности у выделенных 10 полевых изолятов *A. hydrophila* и проанализировано наличие в их геномах участков генов, кодирующих факторы вирулентности.

Для лабораторной практики предложены методы штаммового типирования изолятов *Aeromonas*, основанные на методах BOX-ПЦР и ERIC-ПЦР.

Разработанный молекулярно-генетический компонент тест-системы для выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila* – протоколы постановки LAMP и ПЦР-РВ - внедрены в работу Самарского филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» (акты о внедрении от 10.10.2024 г).

По результатам диссертации разработаны: «Методические указания по применению набора реагентов для выявления и идентификации ДНК *Aeromonas hydrophila* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» (в соавторстве Н.А. Феоктистовой, 2024); «Методические указания по применению набора реагентов для выявления *Aeromonas hydrophila* методом LAMP (петлевой изотермической амплификации) (в соавторстве с Н.А. Феоктистовой, 2024).

Результаты используются в учебном процессе ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина при чтении лекции по направлениям подготовки: 06.03.01 Биология, 36.03.01 Ветеринарно-

санитарная экспертиза, 36.05.01 Ветеринария, 06.04.01 Биология, 36.04.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза.

Методология и методы исследования

Методология данного исследования заключалась в совершенствовании методов для выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila*. Научная работа проводилась с использованием комплексного анализа и системного подхода. Автором были применены методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, эмпирические методы исследования. Совокупность использованных методов позволила обеспечить достоверность приведённых в работе результатов и выводов. Методологической основой для обработки данных послужили современные и доступные молекулярно-генетические и биоинформационные методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Бактериологический компонент тест-системы позволяет выделить из объектов окружающей среды и провести идентификацию полевых изолятов *A. hydrophila* в течение 198 часов.
2. Разработанная праймерная система для детекции участка гена ДНК-гиразы Б (*gyrB*) позволяет выполнить идентификацию бактерий до рода *Aeromonas*.
3. Разработанные протоколы для идентификации *A. hydrophila* методами ПЦР-РВ и RT-LAMP обладают чувствительностью 1,25 нг бактериальных геномов и 10^2 бактериальных клеток на одну реакцию.
4. Испытание комплексной тест-системы выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila*, основанной на бактериологических и молекулярно-генетических методах, позволило выделить из 91 пробы объектов санитарного надзора 10 штаммов *A. hydrophila*, 1 штамм - *A. bestiarium* и 4 штамма, принадлежащие к роду *Aeromonas*.

5. У 86,67% выделенных штаммов *A. hydrophila* детектированы гены, кодирующие гемолизин А (hlyA), аэролизин А (aerA) и цитотонический термолабильный энтеротоксин (alt).

6. Методы ERIC - и Box - ПЦР позволяют произвести типизацию выделенных изолятов рода *Aeromonas* до уровня штамма.

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. в рамках проведения исследований по научно-исследовательской теме по заданию МСХ РФ в 2023 году № 123031600041-9 «Разработка комплекса мероприятий по борьбе с аэромонозом карпа».

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность работы обеспечена применением общепринятых и широко распространённых методик, многократным повторением экспериментов, воспроизводимостью и соответствием результатов, а также использованием поверенного измерительного оборудования и аттестованных методик исследования.

Результаты диссертационной работы были представлены на: Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Леонида Федоровича Зыкина (Саратов, 2023), Национальной научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты и практические вопросы современной микробиологии и биотехнологии», посвященной памяти профессора Д.А. Васильева (Ульяновск, 2024), X Всероссийской Пушкинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пушино, 2024).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Личный вклад соискателя заключается в формулировании цели и задач проводимых исследований, анализе литературных данных, освоении современных методик исследования, подготовке и проведении экспериментальной части работы, анализе и интерпретации полученных результатов, подготовке к публикации научных статей по теме диссертации и монографии.

Структура и объем диссертации. Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, собственные исследования, состоящие из объектов, материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, приложения. Материалы диссертации изложены на 192 страницах, включают 31 рисунок, 22 таблицы, 2 приложения. Список литературы содержит 420 наименований, в том числе 409 зарубежных.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Таксономия бактерий рода *Aeromonas*

Первое сообщение о изолятах бактерии *A. hydrophila* относятся к 1891 году, которые изначально были типированы как *Bacillus hydrophilus fuscus*. Международный комитет по систематике бактерий в 1943 году отнес вышеназванные бактерии к роду *Stanier*. Затем, в 1965 году, они были отнесены к семейству *Vibrionaceae* вместе с родами *Vibrio* и *Plesiomonas*. В 1986 г., основываясь на анализе генов 16S рРНК и 5S рРНК и на данных по исследованию ДНК-ДНК гибридизации, род *Aeromonas* сформировал отдельную филогенетическую ветвь, название которого дало название семейству - *Aeromonadaceae* [167, 190, 308].

Род *Aeromonas* был разделён в 70-е годы XX века на две основные группы: мезофильные виды, для которых характерна подвижность (являются возбудителями инфекции у человека) и психрофильные неподвижные штаммы. Эти штаммы связаны с заболеваниями рыб, их идентифицируют как «*A. salmonicida*» [189, 385]. Было установлено, что температура культивирования выше 22 °С у этой группы аэромонад вызывает перестройку генома, в частности, выявлена потеря системы T3SS. Этот компонент генома является важным фактором вирулентности [70, 167, 178, 320].

Согласно «Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria» род *Aeromonas* принадлежит к классу *Gammaproteobacteria*, порядку *Aeromonadales*, семейства *Aeromonadaceae*, которое включает рода *Aeromonas*, *Oceanimonas* и *Tolumonas* [250, 336]. Представители рода *Aeromonas* - это оксидазо- и каталазоположительные грамотрицательные палочки, способные к ферментации глюкозы, расщепляющие нитраты, резистентные, за редким исключением [45, 308], к вибростатическому фактору O/129 [190, 340].

Типирование представителей рода *Aeromonas* до вида на основе фенотипических характеристик затруднено из-за нестабильности биологических свойств штаммов, что приводит к путанице и ошибочной идентификации [122].

Молекулярно-генетические методы, к которым относится секвенирование последовательности генов «домашнего хозяйства» и их конкатенированный филогенетический анализ (MLPA), позволили выявить новые виды *Aeromonas*, благодаря преодолению ограничения высокого сходства гена 16S рРНК [167, 252, 273, 274, 312, 313, 415]. Разработка новых инструментов для сравнения и характеристики генома позволила установить некорректную типизацию уже выделенных штаммов *Aeromonas* и определить их роль в окружающей среде [110, 374, 386].

Бактериальная таксономия стала свидетелем логарифмического взрыва количества предлагаемых видов бактерий за последние два десятилетия. Этот взрыв в значительной степени связан с общедоступностью секвенаторов ДНК и относительной легкостью, с которой могут быть определены частичные или полные последовательности гена 16S рРНК, в отличие от более громоздкого и дорогого «золотого» стандарта - гибридизации ДНК-ДНК. С момента появления утвержденных списков в 1980 г. и по сентябрь 2007 г. произошло более чем 450-процентное увеличение числа официально описанных видов бактерий [226, 227].

Род *Aeromonas* также отражает аналогичную тенденцию: с 2002 г. описано семь новых видов. При этом, в настоящее время, во втором издании «Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria» указано видов *Aeromonas* в гораздо меньшем числе [250]. Разница в количестве видов, перечисленных «Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria», и тех, которые находятся в номенклатуре (Интернет), связана не только с недавним описанием новых таксонов, но и с тем, что некоторые названия являются некорректными или

гетеротипическими синонимами ранее описанных видов бактерий [204, 227, 229].

В то время как количество новых видов/подвидов, предложенных в «Международном журнале систематической и эволюционной микробиологии» (IJSEM), продолжает расти, тенденция предлагать новые виды на основе отдельных штаммов (~40%) также существенно возросла. Из недавно опубликованных видов *Aeromonas* лишь *A. molluscorum*, *A. aquariorum* и *A. tecta* были предложены на основе анализа более чем трех штаммов. Это резко контрастирует с четко определенными видами, такими как *A. media*, *A. veronii*, *A. schubertii*, *A. jandaei*, *A. trota* и *A. bestiarum*, где сопоставимые числа намного выше (от 7 до 15 штаммов) в среднем 10,2 штамма/вида). Н. Christensen et al. (2001) поставили под сомнение обоснованность описания нового вида на основе одного штамма (Бактериологический кодекс не даёт никаких рекомендаций) и указывает на потенциальные ловушки при этом. Исследователи предполагали, что минимум пять хорошо охарактеризованных штаммов (охарактеризованных как фенотипически, так и генотипически) должны быть минимальным стандартом, и предлагали пересмотр Рекомендации 30b Бактериологического кодекса [105, 176, 221].

Род *Aeromonas* насчитывает 36 видов, которые считаются автохтонными водными агентами. Их также выделяют из пищевых продуктов, от животных и при различных инфекционных процессах у человека [83, 168, 171, 227, 357].

В настоящее время выделяют следующие виды: *A. allosaccharophila* [25], *A. aquatica* [27], *A. aquatilis* [12], *A. australiensis* [28], *A. bestiarum* [29], *A. bivalvium* [30], *A. cavernicola* [31], *A. caviae* [360], *A. crassostreae* [12], *A. dhakensis* [99, 332], *A. encheleia* [162], *A. enterica* [12], *A. eucrenophila* [360], *A. finlandiensis* [27], *A. fluvialis* [32], *A. hydrophila* [373], *A. intestinalis* [12], *A. jandaei* [58], *A. media* [65], *A. molluscorum* [46], *A. lacus*, *A. lusitana* [45], *A. piscicola* [48], *A. popoffii* [49], *A. rivipollensis* [249], *A. rivuli* [50], *A. salmonicida*

[188], *A. sanarellii* [56], *A. schubertii* [51], *A. simiae* [52], *A. A. sobria* [322], *A. taiwanensis*, *A. tecta* [57], *A. trota* [58] и *A. veronii* [59].

1.2. Распространение бактерий рода *Aeromonas*

Бактерии рода *Aeromonas* можно выделить из любой экологической ниши, к которым относится водная среда, продукты питания, насекомые, птицы, животные [134, 319]. Из-за высокого распространения в экологических нишах, где встречаются бактерии этого рода, происходит постоянное воздействие и взаимодействие между ними и человеком [26].

Бактерии *A. hydrophila* являются пресноводными, факультативно анаэробными хемоорганогетеротрофами [181], этиологическим возбудителем болезней у амфибий, птиц, рыб [33, 115, 227, 287, 409].

1.2.1 . Распространение *Aeromonas* в водной среде

Аэромонады встречаются в водной среде (в поверхностных, подземных, питьевых, остаточных, морских и поливных водах) [68, 227, 269, 283, 291, 293, 357, 365]. При исследовании рек и озер в Финляндии было обнаружено 116 штаммов *Aeromonas*, предположительно связанных с цианобактериями [84, 196, 411]. Была проведена повторная идентификация выделенных штаммов [168], в результате чего было обнаружено три новых вида бактерий рода *Aeromonas*, в частности *A. aquatica*, *A. finlandiensis* и *A. lacus* [167, 237, 293]. Была выявлена высокая распространенность представителей этого рода в сточных водах [22, 151, 329, 346, 405]. Классические методы очистки вод на очистных сооружениях, к которым относятся первичная, вторичная или биологическая очистки, не сильно влияют на количество бактерий *Aeromonas* [357]. При этом стоит отметить, что при проведении третичной обработки при помощи химических методов, к которым относится обработка озоном и хлорирование, а так же использование физических методов (ультрафиолетовое облучение),

приводит к полной инактивации представителей этого рода [111, 164, 238, 239]. Еще одним методом, приводящим к снижению количества бактерий рода *Aeromonas* в среде, является третичная обработка – использование лагун. Этот метод основан на временном хранении сточных вод в мелких прудах или лагунах [164, 167, 344, 394]. Очищенную воду используют для орошения [28, 111, 238]. Сообщалось, что плохо очищенные воды для мелиорации могут являться источником бактерий рода *Aeromonas*, использование таких вод в плодоводстве и овощеводстве приводит к контаминации фруктов и овощей, которые вызывают воспалительные процессы у потребителей [243, 370].

На основе эпидемиологических данных установлено, что вода способствует распространению *Aeromonas*. На основе полученных данных удалось типировать одни и те же изоляты в образцах питьевой воды и в испражнениях людей с клиническими признаками диареи [148, 183, 207]. Сообщалось о многих случаях выделения *Aeromonas* из проб питьевой воды [41, 171, 357]. На увеличение и вторичный рост патогена в водопроводной системе оказывают влияние концентрации питательных веществ и остаточного хлора, а также температура [53]. Энтеропатогенные представители данного рода детектированы в бытовых водопроводах после хлорирования и установлено, что они способны вызывать заболевания людей [41, 154, 292]. Штаммы *A. hydrophila* стали причиной нескольких вспышек гастроэнтерита, они поступили в организм заболевших с питьевой водой. Их концентрация находилась в диапазоне от 1 до 10^4 КОЕ/100 мл [37, 154, 367]. Высокая распространённость *A. hydrophila* в системах питьевого водоснабжения, скорее всего, определяется ростом бентоса в отложениях и наличием биопленок на стенках труб, что в дальнейшем приводит к их миграции в воду. Увеличению *A. hydrophila* могут способствовать температурные условия и питательные органические соединения в системах водоснабжения [53, 154].

Согласно данным, представленным Агентством по охране окружающей среды США, *A. hydrophila* является одним из потенциальных загрязнителем питьевой воды [372]. В Канаде и США проводят мониторинг содержания *Aeromonas* в бутилированной воде [159]. В Нидерландах для оценки качества питьевой воды применяется показатель, основанный на концентрации *Aeromonas*. Он не должен быть выше 20 колониеобразующих единиц на 100 миллилитров (среднее значение за год) [169, 404].

Наличие бактерий *Aeromonas* в воде, которую потребляет человек, представляет собой проблему для общественного здравоохранения. В исследовании S.M. Estupiñán-Torres et al. (2017) было установлено присутствие *Aeromonas* в 63% общественных бассейнов в Боготе (Колумбия) [61].

Для определения наличия *Aeromonas* в 125 образцах воды (скважинной, водопроводной и бутилированной) в муниципальной корпорации Большого Хайдарабада Телангана (Индия) был использован метод ПЦР. В результате исследования было обнаружено, что бактерии *Aeromonas* присутствуют в 52% проб воды из колодцев, в 20% проб водопроводной воды и в 16% проб бутилированной воды. Общая распространённость *Aeromonas* составила 28,8% [19]. В сельских водоёмах было зафиксировано наличие *A. hydrophila*, а также выявлены штаммы, которые оказались невосприимчивы к ампициллину, хлорамфениколу, тетрациклину и сульфаниламидным препаратам [231].

В недавнем исследовании, проведённом К. Bedoya et al. в 2021 году, были изучены микроорганизмы, обитающие в поверхностных водах, предназначенных для употребления. В результате были обнаружены такие бактерии, как *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia / Shigella*, *Legionella*, *Aeromonas*, *Mycobacterium*, *Yersinia*, *Burkholderia*, *Rickettsia*, *Treponema*, *Leptospira*, а также *Corynebacterium*. Авторы исследования продемонстрировали опасность, которую представляют эти источники воды для общества и указали на необходимость включения мер по мониторингу и очистке от бактерий рода

Aeromonas в любые программы по обеспечению безопасности питьевой воды [41, 90].

1.2.2. Распространение бактерий рода *Aeromonas* в продуктах питания

Бактерии *Aeromonas* ассоциируются с такими видами деятельности человека как животноводство [76, 316], очистка сточных вод [111, 193, 243]. Они были выделены из различных пищевых продуктов: рыбы и морепродуктов, фруктов и овощей, молочных продуктов, мяса и колбасных изделий.

Уровень контаминации вышеназванных продуктов питания аэромонадами зависит от температуры, концентрации хлорида натрия и уровня водородного показателя [20, 129, 169, 198, 199, 235, 261, 275, 282]. В ряде научных работ было отмечено, что бактерии *Aeromonas* способны выживать при низких температурах в диапазоне от 2 до 10 градусов Цельсия. Более того, хлорид натрия, широко используемый в качестве консерванта для мясных продуктов и сырой рыбы, не является препятствием для роста представителей этого рода, которые способны развиваться даже при концентрации этого соединения $\geq 4\%$. Было установлено, что бактерии *Aeromonas* способны выживать при значении рН равном 5 [228, 386].

Так как население мира увеличивалось на 1,6% в год за последние 50 лет, уровень потребления рыбы удвоился до 3,2%. В результате чего 31,4% рыбных запасов оказались на биологически неустойчивом уровне. Эта тенденция привела к тому, что аквакультура произвела 73,8 млн. тонн рыбы и морепродуктов в 2014 году, и этот показатель ежегодно растет на 5,8% [306].

Один из самых больших рисков заражения гастроэнтеритом, вызываемым бактериями *Aeromonas*, возникает при потреблении сырых и готовых к употреблению морепродуктов. На рынках морепродуктов *A. hydrophila* была выделена в 28% из 33 видов рыбы и 34% из 536 тушек рыбы, что выше, чем уровень выделения из креветок (17%) [73]. Преобладающий вид, *A. salmonicida*

(не типичный патоген для человека), был выделен из 74% проб суши, при этом *A. hydrophila*, *A. caviae* и *A. dhakensis* обсеменяли от 2 до 5% проб суши каждый. Большинство этих изолятов *Aeromonas* характеризовалось наличием четырех из пяти факторов вирулентности, связанных с гастроэнтеритом (т. е. act, alt, ast, hlyA и aerA) [198]. Известно, что представители *Aeromonas* spp. представляют опасность не только для рыб, но и для устриц, крабов, креветок, где они находятся в биопленках, которые создают большую опасность для потребителей из-за сложности деконтаминации гидробионтов [260].

Основным источником пищевых патогенов в традиционном сельском хозяйстве являются фекалии, переносимые с поливной водой [153]. Хотя рыбы намеренно присутствуют в системе аквапоники, существуют ограниченные исследования, посвященные потенциальной возможности рыбы заносить в воду пищевые патогены. Нильская тилапия (*Oreochromis niloticus*) является наиболее часто выращиваемой рыбой в системах аквапоники в США; *E. coli*, *S. enterica* и *A. hydrophila* были выделены от этих рыб [92]. Установлено, что нильская тилапия может быть хозяином этих патогенов, которые потенциально могут попасть в воду, предназначенную для полива растений, размножаться в ней или образовывать биопленки и, в конечном итоге, попасть в пищевую продукцию через брызги, на поверхности плодов или даже на корнях [244].

Распространённость бактерий *Aeromonas* в готовых к употреблению продуктах питания оценивается в 8–52%, зафиксирована устойчивость выделенных изолятов к клинически значимым антибиотикам [55, 199, 295]. Это вызывает опасения относительно возможности порчи пищевых продуктов и возникновения пищевых инфекций.

В многочисленных научных работах рассматривался вопрос о распространённости *Aeromonas* в мясных изделиях, приводящих при употреблении к инфекционным процессам у людей [167, 216, 325]. В ходе изучения генетических последовательностей (groD и gyrB) было выявлено, что

среди всех видов *Aeromonas* наиболее часто выделяются *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. salmonicida*, *A. simiae* и *A. jandaei* [317].

Существует три риска, связанных с *Aeromonas* spp. и мясом наземных животных: потенциальная возможность заражения гастроэнтеритом, повышение вероятности порчи продуктов питания и создание резервуара для генов устойчивости к антибиотикам. Животные переносят *Aeromonas* spp. как часть своей кишечной флоры. Следовательно, важна качественная санитария во время переработки мяса, а также приготовления пищи. Часто загрязнение осуществляется через обсемененную бактериями рода *Aeromonas* воду, которая используется для мытья туш и разделочных досок [376]. Бактерии *Aeromonas* spp. были выделены из проб мяса, реализуемого в розничной торговле, включая говядину, баранину, свинину, мясо птицы, и продукты их переработки – колбасные изделия [113, 299].

Бактериальное загрязнение может играть определенную роль в порче мяса, включая появление неприятного запаха, проявление признаков протеолитической и липолитической активности контаминанта. Штаммы *A. salmonicida* и *A. hydrophila* идентифицировали как загрязнители мяса куриной грудки, способствующие саркоплазматической и миофибриллярной протеолитической деградации [89].

Сырое молоко продолжают анализировать на количество колиформных бактерий для оценки мер безопасности, поскольку *A. hydrophila* и *A. caviae* являются частыми контаминантами [256], а продукция ими липазы ускоряет порчу продукта [246]. Melas D.S. et al. обнаружили *Aeromonas* spp. в 41% образцов сырого коровьего и 35% образцов овечьего молока, а также в 10% образцов сыра, причем преобладающим видом была *A. hydrophila*. Важно отметить, что пастеризация действительно устраняет загрязнение *Aeromonas* [256]. Сообщается, что все молочные продукты потенциально могут быть

обсеменены вышеназванными бактериями, включая йогурт [262] и мороженое [202], из которых были выделены *A. hydrophila* и *A. caviae*, соответственно.

В процессе научных изысканий было выявлено, что на различных овощных культурах, таких как морковь, томат, салат, огурец, картофель, сельдерей и лук, присутствуют бактерии рода *Aeromonas*. В числе идентифицированных видов *A. hydrophila* и *A. caviae* оказались наиболее часто встречающимися [275, 281, 282]. Эти продукты питания, подвергшиеся воздействию воды, контаминированной бактериями рода *Aeromonas*, представляют собой основной путь передачи данного патогена, провоцирующего диареи у человека [169, 170].

Кроме того, даже в продуктах, хранящихся в холодильнике, некоторые виды *Aeromonas* могут размножаться и вызывать порчу. При 4 °C скорость роста видов *Aeromonas* значительно снижается, поскольку бактерии могут продлить лаг-фазу, во время которой они адаптируются к холодной среде [197, 199]. С другой стороны, представители рода *Aeromonas* чувствительны к теплу. Правильная пастеризация мясных продуктов при 70 °C безопасно инактивирует инфекционный агент [166].

Хотя доза заражения пока достоверно не известна, употребление воды и пищи, загрязнённых всего лишь 3 log КОЕ/грамм *Aeromonas* spp., может вызвать местные и системные инфекции, такие как гастроэнтерит, некротизирующий фасциит, менингит, эндокардит, артрит, остеомиелит и даже геморрагическую септицемию из-за продукции энтеротоксинов и других факторов вирулентности [166, 390]. Нарушения здоровья могут привести к тяжелым или системным инфекциям и даже смерти у людей, особенно у детей, пожилых людей и людей с ослабленным иммунитетом [54, 81, 179, 217, 263, 366].

1.2.3. Распространение бактерий рода *Aeromonas* у гидробионтов и теплокровных животных

Как упоминалось ранее, *Aeromonas* можно выделить из нескольких природных источников [345], особенно из водной среды [285]. Контакт с рыбами и другими гидробионтами развивается непрерывно и почти неизбежно [211, 212].

Мезофильные и психрофильные группы рода *Aeromonas* могут вызывать инфекции у рыб. Считается, что *A. hydrophila*, а также *A. veronii* [265], вызывают геморрагическую септицемию [13]. Образцы радужной форели (*O. mykiss*) подвергались воздействию штаммов различных видов *Aeromonas*; в группе, инфицированной *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. veronii* и *A. bestiarum*, наблюдались нарушения процесса плавания, признаки анорексии и гиперпигментации [305]. Штаммы *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida* и *A. media* были выделены из рыб, у которых наблюдались такие признаки, как кровоизлияния во рту, глазах и других органах; у некоторых также наблюдался отек с наличием аскетической жидкости [381]. У зараженных раков (*P. leniusculus*) были обнаружены небольшие пятна на кутикуле, вялость и слабость [13]. Частота заболеваний и их вспышек может быть связана с географическими различиями, хотя род *Aeromonas* широко распространен [167].

Из всех подвижных аэромонад *A. hydrophila* является преобладающим патогеном у рыб [362]. *A. dhakensis* - ещё один подвижный вид *Aeromonas*, вызывающий заболевания у рыб [96] и ошибочно идентифицированный как *A. hydrophila* [109]. Двадцать шесть штаммов *Aeromonas* были выделены из проб воды аквакультуры [303]. Образцы тамбаки (*S. macropotum*) были искусственно подвергнуты физиологическому стрессу, бактерии *Aeromonas* spp. были выделены из объектов исследований [213].

A. hydrophila - это условно-патогенный микроорганизм, вызывающий заболевания у рыб в условиях стресса [225], вызванного высокой температурой

воды, высоким уровнем аммиака и нитритов, изменениями pH воды, низким уровнем растворенного кислорода, паразитарными инфекциями, высокой плотностью посадки и транспортировкой [172]. Другие исследователи выделяют *A. hydrophila* как основного патогена, вызывающего заболевания на рыбноводческих фермах, сопровождающиеся высокой смертностью и большими экономическими потерями [268, 352].

В литературе это заболевание называют «подвижной септицемией *Aeromonas*» [192], «геморрагической септицемией», «язвенной болезнью», «красной язвой» [18, 223] и «хвостовой и плавниковой гнилью» [88]. По мнению A. Das et al. (2013), септицемия вызвана внеклеточным гемолизином и аэролизином, которые являются основными факторами вирулентности [133, 375]. К чувствительным видам относятся сельдь, золотой карась, золотисто-зелёный чирок, ручьевая форель, радужная форель, чавыча, лосось, карп, канальный сом, клариевый сом, японский угорь, американский угорь, змееголов и тилапия [146]. Также было отмечено, что *A. hydrophila* может вызывать заболевания у пресноводных декоративных рыб, таких как карликовый гурами (*Colisa lalia*), гигантский гурами (*Osphronemus goramy*), дискусовые цихлиды (*Symphysodon* spp), серебряный сом (*Pangasius sutchi*), чёрная тетра (*Gymnocorymbus ternetzi*), пецилия (*Xiphophorus maculatus*), тигровый барбус (*Barbus pentazona hexazona*), гуппи (*Poecilia reticulata*) [240]. Заболевание характеризуется поверхностными поражениями, кровоизлияниями, язвами, абсцессами, пучеглазием, асцитической жидкостью и поражениями печени и почек [174, 375].

В мировом масштабе ежегодные экономические потери аквакультурных объектов из-за болезней составляют миллионы долларов. Интересно отметить, что в Китае потери, приписываемые *A. hydrophila*, *Y. ruckeri* и *V. fluvialis* в период с 1990 по 1992 год, превысили 120 миллионов долларов [418].

Хотя вода является основным ареалом для размножения бактерий *Aeromonas*, их можно выделить и от представителей царства животных, не являющихся обитателями водной среды. *A. hydrophila* является основной причиной синдрома красных ног у земноводных, заболевания, характеризующегося покраснением ног и живота лягушек и саламандр, способствующего анемии, летаргии и другим симптомам [392].

Анализ мазков из клоакальной и глоточной области у птиц выявили наличие трех видов *Aeromonas*: *A. hydrophila*, *A. sobria* и *A. veronii* [21]. Бактерии, принадлежащие к этому роду, могут быть идентифицированы в фекалиях здоровых свиней [298], а также способствуют развитию бронхопневмонии с гнойным экссудатом у диких кабанов [283].

Что касается рептилий, *A. hydrophila* обнаружена как часть бактериального разнообразия, существующего в ротовой полости ядовитых змей [232]. Тот же вид был также идентифицирован как вызывающий сепсис у двух типов крокодилов. Анализ тканей выявил обширные поражения дыхательных путей и кишечника [43, 398]. *A. hydrophila* также была единственным представителем рода, выделенным от домашних рептилий [334].

Сообщалось о способности этих бактерий колонизировать насекомых, поскольку штаммы *A. hydrophila* и *A. veronii* были идентифицированы в образцах кишечника домашних мух (*Musca Domestica* L.) [314].

После вспышек заболеваний на фермах, где разводят кроликов, а также в экскрементах собак, кошек, лошадей, свиней, овец и коров, были обнаружены бактерии рода *Aeromonas* [60, 87, 155, 419].

В ряде научных работ *Aeromonas* упоминается как патоген, вызывающий заболевания у иглокожих. Также есть сведения о её связи с веслоногими рачками - копеподами [104].

1.3. Анализ эпизоотической ситуации по аэромонозу на территории Российской Федерации

С целью исследования частоты встречаемости аэромоноза на территории страны был проведён анализ данных статистической отчётности Департамента ветеринарии Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, информации Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору и сведений, полученных от подведомственных ей лабораторий.

В результате анализа данных об эпизоотических очагах на рыбноводческих предприятиях и в рыбопромысловых водоёмах было выявлено, что наибольшее количество случаев заболевания аэромонозом наблюдалось в 2000 году. К числу регионов, где были зафиксированы случаи заболевания относятся Кемеровская, Курганская, Московская, Оренбургская, Свердловская, Тамбовская, Белгородская, Владимирская, Иркутская и Тверская области, а также Краснодарский край, Башкортостан, Мордовия, Хакасия, Северная Осетия, Бурятия и Татарстан [7].

В период с 2000 по 2005 год было зафиксировано следующее количество неблагополучных ситуаций: в 2000 году - 34, в 2001 году - 34, в 2002 году - 37, в 2003 году - 32, в 2004 году - 24, а в 2005 году - 179. В Московской области было зарегистрировано больше всего вспышек данного заболевания [6].

Случаи выделения у рыб штаммов *A. hydrophila*, *A. media*, *A. schubertii*, *A. sobria* были зафиксированы в Бурятии в 2012 году [10].

В результате анализа статистических данных ФГБУ «Центр ветеринарии» по заболеваемости аэромонозом среди лососевых и карповых рыб в рыбноводных хозяйствах России в период с 2017 по 2023 годы, было установлено, что случаи данного заболевания отмечаются периодически.

В 2017 году в Московской, Кировской и Оренбургской областях были выявлены хозяйства, неблагополучные по аэромонозу. В одном из рыбопромысловых водоёмов, расположенном на территории деревни Большие

Кулики муниципального образования Верхошижемское городское поселение Верхошижемского района Кировской области, была зафиксирована вспышка аэромоноза, в связи с чем были введены карантинные ограничения.

Бактерии рода *Aeromonas* были выделены из водных объектов на территории Ульяновской области в 2009 году [2] и 2017 году [3]; в Тюменской области - 2015 и 2018 годах - из водоёмов и клинического материала [1].

В 2018 году в Центральном, Южном, Северо-Кавказском и Приволжском федеральных округах были зафиксированы вспышки инфекции. В 2018–2019 годах аэромоноз был установлен в Москве и Московской области, а также в Оренбургской, Кировской и Волгоградской областях.

На Камчатке были выделены штаммы *A. salmonicida* от лососей в 2020 году [9]; 25 штаммов бактерий рода *Aeromonas* были выделены из Невы и отнесены к пяти видам (*A. caviae*, *A. popoffii*, *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. bestiarum*) [8]. В акватории Нижнего Дона, на участке реки от Ростова-на-Дону до Азова (включая часть дельты реки), было обнаружено распространение бактерий рода *Aeromonas*. В ходе исследования было выявлено присутствие шести видов бактерий данного рода: *A. veronii*, *A. caviae*, *A. jandaei*, *A. hydrophila*, *A. ichthiosmia* и *A. schubertii* [4].

В 2021 году вспышки заболевания регистрировались в Челябинской, Кировской, Тверской и Свердловской областях. В 2020 году - в Оренбургской области, в 2022 году в Курской области были выявлены очаги неблагополучия по аэромонозу. В 2023 году имела место вспышка этого заболевания на территории Ростовской области.

В этой связи представляется крайне значимым осуществлять систематическое наблюдение за эпизоотической обстановкой в водных экосистемах, а также отслеживать состояние здоровья их обитателей. Эти меры позволят оценить ветеринарно-санитарное качество воды и предотвратить распространение инфекционных заболеваний [7].

1.4. Биологические свойства бактерий рода *Aeromonas*

Представители вида *Aeromonas* - грамотрицательные, неспорообразующие, палочковидные бактерии с закругленным концом, размером 0,3-1,0×1,0-3,5 мкм в поперечнике [248], факультативно-анаэробные, оксидазо-, каталазо- и глюкозоположительные, ферментирующие, устойчивые к вибриостатику 0/129 и хемоорганотрофные [106, 247, 336].

Бактерии рода *Aeromonas* способны расти на обычных питательных средах, используемых в лабораторной практике, таких как агар с овечьей кровью (SBA), шоколадный агар. Известно, что данные бактерии вызывают гемолиз на агаре с овечьей кровью [26, 101], растут на питательных средах, используемых для изоляции кишечных бактерий, таких как агар МакКонки и агар XLD. Они также растут на цефсулодин-иргасан-новобиоцин агаре (CIN), который изначально был разработан для *Y. enterocolitica*, образуя колонии с розовым центром [47, 93, 278]. Другой культуральной средой для селективного выделения аэромонад является ампициллиновый кровяной агар, который используется для их выделения из фекалий и содержит 20 мкг/мл ампициллина [248].

Бактерии рода *Aeromonas* могут расти при температуре от 22 до 37 °C, и было замечено, что даже при низких температурах (4 °C) эти микроорганизмы могут размножаться. Хотя эта переменная окружающей среды, по-видимому, не предотвращает рост бактерий, она может влиять на скорость репликации [157].

Сообщалось, что изоляты *Aeromonas* продуцируют амилазу, ДНКазу, хитиназу, эластазу, эстеразы, пептидазы, ариламидазу, липазу и другие гидролитические ферменты [241, 396, 362]. Из *A. hydrophila* была выделена аденилатциклаза 2 с термофильными свойствами и последовательностями, сходными с белками гипертермофильных археев [34]. Есть новые доказательства того, что представители рода *Aeromonas* могут проявлять

способности к анаэробному дыханию и диссимиляционному восстановлению металлов [204].

Опубликованы многочисленные крупномасштабные фенотипико-биохимические исследования бактерий *Aeromonas* [20, 65]. В биохимических исследованиях, в которых изучались представители всех известных групп гибридизации, было установлено, что представители HGs 1–15 (включая подвижные мезофильные HG 3 *A. hydrophila*-подобные штаммы) имели ряд общих черт, помимо образования кислоты из глюкозы, оксидазной и каталазной активности и восстановления нитратов [155, 227]. К ним относятся: производство кислоты из D-трегалозы, отказ от использования малоната или слизи в качестве единственного источника углерода; неспособность ферментировать адонит, дульцит, эритрит, инозитол и D-ксилозу; рост в питательном бульоне, содержащем 0 и 3% NaCl. Результаты тестов других фенотипических свойств почти всегда были положительными (98–99%) и включали подвижность, активность β -галактозидазы и устойчивость к O/129; менее 2% испытанных штаммов гидролизовали мочевины, разлагали пектин или производили кислоту из арабита, D-раффинозы или D-амигдалина. Переменные результаты были получены для 36 тестов, которые включали производство ацетилметилового эфира и утилизации карбинола (тест Фогеса-Проскауэра), индола, фенилпировиноградной кислоты, ацетата, цитрата и аскорбата; продуцирование эластазы, гемолизина, стафолизина, дезоксирибонуклеазы и липазы кукурузного масла; гидролиза эскулина и желатина; роста в бульоне KCN (цианистый калий); активности орнитин- и лизиндекарбоксилаз, аргининдигидролазы и пиразинамидазы; образование H_2S в среде GCF (желатин-цистеин-тиосульфат) и пигмента при 25°C, окисление глюконата; восприимчивость к цефалотину и ампициллину; производство кислоты в результате ферментации L-арабинозы, целлобиозы, глицерина, лактозы, α -метилглюкозида, мальтозы, D-маннита, D-маннозы, мелибиозы, L-

рамнозы, салицина и сорбита [251]. Исследователи определили девять тестов как достаточно дискриминационные, чтобы их можно было использовать в качестве первоначальной основной группы тестов для отделения аэромонад от наиболее часто выделяемых видов в клинической лаборатории [103, 204,251].

Существует вариабельность продукции гемолизина как внутри, так и между видами [44], а также различия в наличии и/или типе гемолиза в зависимости от типа используемых эритроцитов. В одном исследовании из эритроцитов девяти протестированных видов животных наиболее чувствительная среда с кровяным агаром содержала эритроциты мыши, а эритроциты овцы были одними из наименее чувствительных к выявлению β -гемолиза. *A. hydrophila* и *A. veronii* являются двумя наиболее часто выделяемыми видами, характеризующимися явно выраженным β -гемолизом на агаре с овечьей кровью, при этом редко выделяемые виды аэромонад часто характеризовались наличием β -гемолиза [204].

Сообщалось что, штаммы *A. hydrophila* утилизируют сахарозу, лактозу, фруктозу, декстрозу, глюкозу, D-мальтозу, D-галактозу, D-рибозу, глицерин, сорбит, трегалозу, крахмал, рамнозу, L-аргинин, салицин, D-маннозу, амигдалин и арабинозу, способны к ферментации раффинозы. Они не растут на питательной среде с содержанием 4,8% NaCl, но растут в питательном бульоне и других питательных средах с 0,2% NaCl [358,362].

Для выделения *A. hydrophila* используют питательный агар, модифицированный прил-ксилозо-ампициллином (PXAm), желчный агар с инозитом и бриллиантовым зелёным (IBV), агар с желчью и бриллиантовым зелёным (BBG), МА-агар, агар для теста на ДНКазу с толуидиновым синим, крахмально-желчный агар, агар МакКонки с трегалозой, а так же декстрин-фуксин-сульфитный агар [361,362,369].

1.5. Устойчивость к антибактериальным препаратам бактерий рода *Aeromonas*

Определение устойчивости бактерий к антибиотикам имеет отношение к здоровью человека из-за важности зоонозных заболеваний, а также необходимости прогнозирования появления резистентных патогенных микроорганизмов [79]. Характер чувствительности к антибиотикам также важен для селективного выделения микроорганизмов. Общеизвестно, что аэромонады обладают устойчивостью к пенициллинам (пенициллину, ампициллину, карбенециллину и тикарциллину) в течение довольно долгого времени [97]. В дополнение к выбору антибактериальной терапии в клинических условиях модели чувствительности к антибиотикам иногда полезны в качестве фенотипических характеристик для идентификации видов, особенно для клинических изолятов [177].

Большая часть бактерий рода *Aeromonas* проявляет чувствительность к аминогликозидам, тетрациклину, хлорамфениколу, триметоприму-сульфаметоксазолу и хинолонам [78,82]. Представители этого рода чувствительны к цефалоспорином второго и третьего поколения, пиперациллину, а также к азлоциллину [200]. Имеются сообщения об испытаниях на чувствительность к антибиотикам 164 штаммов *Aeromonas*, при этом наблюдалась устойчивость к налидиксовой кислоте (54-62%), ципрофлоксацину (12–22%) и норфлоксацину (14-19%) [155].

Исследователями была зафиксирована устойчивость к антибиотикам у бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из эвтрофного озера в Англии. Также была выявлена устойчивость к антибиотикам триметоприму (42%), пипемидовой кислоте (67%), стрептомицину (65%), цефалотину (93%), цефокситину (56%), тикарциллину (87%), сульфаметоксазолу (90%), налидиксовой кислоте (59%), ампициллину (99%), оксолиновой кислоте (67%) и тетрациклину (14%) у видов *Aeromonas*, выделенных из европейских рек.

Есть данные, что чувствительность аэромонад к фторхинолонам различается от 54% до 98%. Большинство бактерий рода *Aeromonas* чувствительны к ципрофлоксацину, фосфомицину, колистину, гентамицину, котримоксазолу, цефотаксиму, хлорамфениколу, тобрамицину и имипенему, а городские сточные воды считаются фактором, способствующим повышению уровня устойчивости к антибиотикам у аэромонад в окружающей среде [77, 203, 343].

При проведении изучения устойчивости к антибиотикам 20 штаммов *A. hydrophila*, выделенных из водоёмов в Бангладеш, было установлено, что они обладали устойчивостью к хлорамфениколу, стрептомицину и тетрациклину [216]. Более высокая степень устойчивости к ампициллину и цефалоридину наблюдалась наряду с самой высокой активностью клавулановой кислоты при анализе субингибирующих концентраций в сочетании с ампициллином [75].

Данные экспериментов по определению минимальных ингибирующих концентраций 22 антимикробных агентов для 60 штаммов трех видов *Aeromonas* методом микроразведения показали, что цефалоспорины, такие как моксалактам, цефотаксим и цефоперазон, аминогликозиды и хлорамфеникол, тетрациклин, нитрофурантоин и триметоприм-сульфаметазол ингибируют большинство штаммов этого рода, а изоляты *A. hydrophila* более устойчивы, чем *A. caviae* или *A. sobria* к протестированным антибиотикам [216].

Данные ученых о степени антибактериальной резистентности 34 штаммов *Aeromonas* spp., выделенных из различных видов тропических рыб, импортированных из Сингапура, показали, что все штаммы обладали множественной устойчивостью, чаще всего к ампициллину и карбенициллину, рифампицин был наиболее активным антибиотиком среди этих штаммов [156].

Была выявлена растущая устойчивость аэромонад к антибиотикам на Тайване [216]. При изучении антибиотикочувствительности 234 изолятов *Aeromonas* (преимущественно *A. hydrophila*) было обнаружено, что более 90% изолятов были чувствительны к моксалактаму, цефтазидину, цефепиму,

азтреонаму, имипенему, амикацину и фторхинолонам, но более устойчивы к тетрациклину, триметоприму-сульфаметоксазолу, цефалоспорином и аминогликозидам [282].

Проведено исследование по наблюдению за чувствительностью бактерий к пяти антимикробным препаратам в течение одного года, продемонстрировавшее высокий уровень индивидуальной и множественной антимикробной резистентности у аэромонад [131].

В исследовании чувствительности к антибиотикам *A. hydrophila* и *A. sobria*, выделенных из выращиваемого карпа (*Cyprinus carpio*), установлено, что из 21 исследованного изолята все 100% были устойчивы к ампициллину и пенициллину и чувствительны к триметоприм-сульфамидам, оксолиновой кислоте, флумехину, хлорамфениколу, норфлоксацину, линкомицину и перфлорксацину [191].

Из проб рыбы, реализуемой на рыбном рынке в Анкаре (Турция), было выделено 132 штамма *Aeromonas*, среди которых преобладали *A. cavaie* (66%), *A. hydrophila* (22,6%) и *A. veronii biovar sobria* (11,6%). Все аэромонады были устойчивыми к ампициллину, цефалотину и триметоприму, ципрофлоксацину и цефтриаксону, наименее устойчивы к хлорамфениколу (9,0%) [294].

В рамках эксперимента было проведено тестирование 51 изолята *Aeromonas*, выделенного от 20 особей радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*). Целью исследования было определение чувствительности этих штаммов к различным группам β -лактамов антибиотиков: пенициллинам, цефалоспорином, монолактамам и карбапенемам. В ходе эксперимента было выявлено, что наиболее высокий уровень устойчивости наблюдался к ампициллину, карбенициллину и тикарциллину [350]. Полученные данные подтверждаются результатами исследования устойчивости к противомикробным препаратам у различных видов аэромонад. Было отмечено, что устойчивость к ампициллину, амоксициллину, цефалексину и

эритромицину была широко распространена, но все штаммы были высокочувствительны к ципрофлоксацину [62].

Во многих исследованиях сообщалось о высокой устойчивости изолятов *Aeromonas* к стрептомицину, эритромицину, цефотаксиму, амикацину, налидиксовой кислоте, канамицину и сульфаметоксазолу [106, 324]. Аналогичный вывод сделали N. N. Fauzi et al. (2021), сообщив о резистентности *Aeromonas* к канамицину и согласившись с данными O. A. Odeyemi и A. Ahmad (2017), в которых описывалась резистентность к пенициллину [296, 330]. Высокая чувствительность изолятов *A. hydrophila* к тетрациклину, доксициклину и ципрофлоксацину была описана в статье M. Z. Rahman et al. (2021) [267]. Результаты этого исследования не совпадают с данными нескольких исследований, в которых была зафиксирована устойчивость выделенных штаммов *Aeromonas* к ампициллину [74].

Расхождения данных о резистентности или чувствительности бактерий *Aeromonas* в литературных источниках могут быть обусловлены различиями в типах противомикробных препаратов и кратности их применения для лечения определенных заболеваний в разных географических регионах [282].

Устойчивость к антибиотикам у *A. hydrophila* опосредована как хромосомами, так и плазмидами; они несут стабильную плазмиду, играющую основную роль в устойчивости микроорганизмов. Устойчивость к β -лактамам антибиотикам может быть обусловлена продукцией β -лактамаз, которая может кодироваться плазмидами или интегронами [78]. Устойчивость к хинолонам, таким как налидиксовая кислота, может быть вызвана хромосомными мутациями в генах *gugA* и *parC*, которые кодируют целевые ферменты (ДНК-гиразу и топоизомеразу IV) [64, 324].

Между видами *Aeromonas* были зарегистрированы множественные вариации чувствительности к противомикробным препаратам, которые зависят от различных источников выделения изолятов, использования антимикробных

агентов и конкретной географической локации. Таким образом, необходимо изучать действие противомикробных препаратов на штаммы *A. hydrophila*, так как это необходимо для повышения эффективности лечебных мероприятий и снижения экономических потерь в аквакультуре [80, 356].

1.6. Характеристика геномов бактерий *A. hydrophila*

По состоянию на 2 сентября 2019 года в базе данных GenBank было зарегистрировано 410 геномов *Aeromonas*, из которых 63 являются полными. Размер геномов бактерий рода *Aeromonas* колеблется от 3,90 мегабайт (*A. fluvialis*) до 5,18 мегабайт (*A. piscicola*), средний размер составляет 4,51 мегабайта. Кроме того, процентное содержание G+C в геномах *Aeromonas* варьируется от 58,1% (*A. australiensis*) до 62,8% (*A. taiwanensis*), а среднее значение составляет 60,2% [167].

Виды *Aeromonas* известны своим высоким уровнем однородности, что затрудняет идентификацию этих видов только по фенотипам [109, 121]. Из-за этого, маркерные гены, такие как 16S рРНК, гены *groD* и *guyB*, ненадежны для различения близкородственных видов *Aeromonas* [145] или для идентификации *Aeromonas* на видовом уровне из-за их низкой гетерогенности [128]. Например, поскольку 16S рРНК не позволяет однозначно отличить *A. dhakensis* от *A. caviae* [349], такая неточная идентификация вида может привести к неправильной оценке фактического патогенного потенциала [96, 128].

В статье R. Beaz-Hidalgo, M.J. Figueras (2013) были опубликованы полные геномы пяти видов *Aeromonas*, а именно два штамма *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* и *A. aquariorum*. Геномы *A. salmonicida subsp. salmonicida* (A449), выделенной из радужной форели, и *A. hydrophila* (ATCC 7966T), выделенной из молока, дали более полное представление о метаболических свойствах этих бактерий. О том, как они адаптируются к

различным экосистемам и как они взаимодействуют и проникают в клетки-хозяева, опосредованные большим количеством генов вирулентности [98,185].

Известно, что геномы бактерий *Aeromonas*, сходны по размеру (4,43–4,81 Мб), установлено наличие плазмид и генов, кодирующих белок, псевдогенов (гены, не функционирующие и не экспрессированные), инсерционных последовательностей (IS, т. е. подвижные элементы ДНК, которые могут вызывать реаранжировку ДНК) и генов вирулентности. Определено 88 IS и 170 псевдогенов (в хромосоме или в двух больших плазмидах) в гене *A. salmonicida* (A449) [98, 318]. Хромосома *A. hydrophila*, не имеет IS и имеет 7 семь псевдогенов, отличных от *A. salmonicida*. Обилие вставок и псевдогенов предполагает, что геном *A. salmonicida* является результатом эволюции и адаптации этой бактерии к очень специфической рыбе-хозяину. Напротив, геном *A. hydrophila* (ATCC 7966T) с генами, кодирующими несколько метаболических способностей, отражает универсальность этой бактерии для жизни в различных средах, включая водные экосистемы и более широкий круг хозяев (т. е. людей, животных, включая рыба) [336, 382, 242].

Сообщается, что среди всех геномов, общедоступных в GenBank до 2022 года, изоляты *A. hydrophila* были выделены из видов рыб, таких как золотая рыбка, карп, змееголов, угорь, тилапия, сом, синежаберник, большой желтый горбыль, осетр и лосось [351]. Согласно литературным данным, размеры 17 полных геномов *A. hydrophila* варьируются от 0,54 МБ (как это наблюдалось у штамма ATCC 7966, имеющего самый минимальный геном (4,74 МБ)), до 5,28 МБ – определенного у штамма NJ-35, характеризующегося максимальным геномом [323]. Число кодирующих последовательностей (CDS) в этих геномах также различалось среди описанных полных геномов всех штаммов *Aeromonas* (диапазон: 3782–5161 с общей разницей 36,46%) и внутри геномов *A. hydrophila* (диапазон: 4091–5134 с общей разницей в 36,46%). Разница составляла 25,49%. Суммарное содержание гуанина и цитозина (содержание G+C) в геномах

Aeromonas spp. варьировалось от 57,9% до 62,9%, тогда как у *A. hydrophila* диапазон составлял 60,4–62,0% с относительно небольшими вариациями между штаммами. Значительные различия наблюдались также в количестве тРНК среди всех геномов *Aeromonas* spp. [416].

Полный геном референс-штамма *A. hydrophila* ATCC 7966T состоит из одной кольцевой хромосомы 4744448 п.н. с содержанием G+C 61,5% и кодирует 5195 предсказанных кодирующих последовательностей (CDS). Предполагаемые функции удалось приписать 72,3% CDS, в то время как 21,5% обладали сходством с генами с неизвестной функцией, а для 6,2% CDS функция не была установлена. Всего в геноме предсказано 128 генов тРНК, что является относительно высокой долей по сравнению с большинством других секвенированных геномов. Кроме того, у *A. hydrophila* многие из этих тРНК, по-видимому, возникли в результате тандемной дупликации, причем их антикодоны преимущественно соответствуют гидрофобным аминокислотам (например, Met, Gly, Leu и Val)[127,184, 355].

Был секвенирован еще один штамм *A. hydrophila* (ML09-119), который был выделен при вспышке заболевания сома на коммерческой ферме. ML09-119 содержит геном ДНК размером 5,02 МБ с содержанием GC 60,8% и 4577 предсказанными генами (инвентарный номер GenBank CP005966.1). Всего предсказано 112 тРНК и 10 оперонов рРНК. В дополнение к полному пути утилизации инозитола, отсутствующему в ATCC 7966, ML09-119 обладает уникальным кластером генов биосинтеза O-полисахарида длиной 33 т.п.н. с 29 предсказанными ORF, 24 из которых не имеют никакого сходства с генами ATCC 7966 [241].

Полный геном *A. hydrophila* НХ-3 включает одну кольцевую хромосому из 4941513 п.н. с содержанием G+C 61,0%. Геном содержит 4483 предсказанных гена, из которых 4318 являются кодирующими

последовательностями ДНК (CDS). В ходе анализа генома НХ-3 плазмид обнаружено не было [127].

Штамм *A. hydrophila* Y-SC01 имеет геном размером 4,72 Мб с содержанием GC 58,55%, состоящий из одной кольцевой хромосомы и одной кольцевой плазмиды и содержащий 128 тРНК (общая длина 9945 п.н.), 31 рРНК (общая длина 45 465 п.н.) и 4364 гена (средняя длина гена 925 к.н.). Длина гена составляла 4 716 245 п.н., а длина плазмиды - 7 435 п.н. Среди 4364 генов, кодирующих белки, были аннотированы 1752 записи Gene Ontology (GO) и 2606 путей KEGG. Плотность кодирования белков генома составила 92,3% [126].

Штамм *A. hydrophila* Ah27, бактерия с множественной лекарственной устойчивостью, была выделена из печени сома (*Ictalurus punctatus*) в провинции Гуйчжоу, Китай. Геном *A. hydrophila* Ah27 был секвенирован с использованием платформ секвенирования PacBio RS и Illumina. Полный геном *A. hydrophila* Ah27 состоит из кольцевой хромосомы с 5 102 912 п.н. и плазмиды с 6 162 п.н. Среднее содержание GC в хромосоме составляет 60,75 %. Результаты исследований показали, что хромосома содержала 4726 кодирующих генов, включая 4505 кодирующих белок последовательностей, 119 генов тРНК, 31 ген рРНК, 7 некодирующих РНК и 64 псевдогена. Согласно анализу аннотаций, штамм Ah27 кодирует гены устойчивости к β -лактамам, аминогликозидам, хинолонам, макролидам, сульфонидами, тетрациклинам и четырем значимым типам генов эффлюксных насосов [125].

1.7. Факторы вирулентности бактерий *Aeromonas hydrophila*

Известно, что *A. hydrophila* – важный зоонозный патоген водного происхождения [311]. Он имеет многофакторные факторы вирулентности, такие как системы секреции типа III, типа IV и типа VI (Т3SS, Т4SS и Т6SS соответственно), экзотоксины и эндотоксины [95,119,165,383].

Известно, что у бактерий *Aeromonas* имеются каскады генетической регуляции, которые приводят к ситуативной экспрессии факторов вирулентности, но эти взаимодействия остаются относительно малоизученной областью исследований у филогенетически подтвержденных штаммов *A. hydrophila* [412]. Например, обычно считается, что вспышки *A. hydrophila* связаны с изменениями восприимчивости хозяина, вызванными изменениями окружающей среды, такими как недостаток кислорода и чрезмерные уровни нитритов в выращиваемой рыбе, а также повышением температуры, которое связано с выработкой факторов вирулентности, таких как цитотоксины и гемолизины [152, 279, 362, 409].

Установлено, что клинические штаммы *A. hydrophila* могут расти при температурах, превышающих оптимальную температуру роста изолята, составляющую 28°C [409]; однако при повышении температуры до 37°C активность протеаз снижается, а активность цитотоксина и гемолизина возрастает [152]. Известно, что изоляты из окружающей среды хорошо адаптированы к низким температурам и могут беспрепятственно расти при температуре до 4°C, температуре, которая ограничивает рост клинических изолятов [289]. Некоторые из наиболее изученных регуляторных эффектов - это связь между ощущением кворума и образованием биопленок, которая не только опосредует экспрессию факторов вирулентности, но и регулирует плотность клеток [39]. Полярные жгутики у *A. hydrophila* экспрессируются конститутивно; имеются регуляторы, которые запускают экспрессию латеральных жгутиков [258, 400]. Учитывая широкое влияние этих регуляторных факторов на заболевание рыб, экспериментальные исследования, раскрывающие эти взаимодействия, имеют фундаментальное значение для развития знаний в области *A. hydrophila* в целом [409].

Патогенность и токсичность бактериальных патогенов определяются факторами вирулентности [401]. К факторам вирулентности *A. hydrophila*

относятся аэролизины (aer), цитотоксические энтеротоксины (act, ast), цитотонные энтеротоксины (alt), полярные жгутики (fla), сериновая протеаза (ser, ahp), эластаза (ahyB), липаза (lip), гемолизин (hlyA), ДНКазы (exu), глицерофосфолипидный холестеринхолестерин ацилтрансфераза (gcaT) и система секреции III типа (ascV), которые играют весомую роль в бактериальном патогенезе [137]. Кроме того, известно, что *A. hydrophila* способны образовывать биопленки [391].

Известно, что бактерии *A. hydrophila* секретируют многочисленные деградирующие и потенциально токсигенные внеклеточные белки, многие из них обладают множественными секреторными механизмами, включая системы секреции типа I, типа II, типа III и типа VI [399].

Установлено, что *A. hydrophila* секретирует широкий спектр внеклеточных ферментов и токсинов [67]. Системы секреции типа I способны секретировать экзотоксины и ферменты посредством одностадийного процесса от цитоплазмы к внешней мембране. T1SS состоит из трех основных компонентов: транспортеров АТФ-связывающей кассеты (ABC), белка слияния мембран (MFP) и фактора внешней мембраны (OMF) [187]. Все описанные в литературе геномы *A. hydrophila* несут основные компоненты T1SS [120].

Консервативная система секреции типа II (T2SS) присутствует у всех известных представителей *A. hydrophila* и является неотъемлемой частью внеклеточной секреции широкого спектра факторов вирулентности, включая аэролизин, амилазы, ДНКазы и протеазы [409]. Системы секреции типа II (T2SS) обнаружены у множества патогенов человека, животных и растений, а секреция типа II (T2SS) опосредует множество патогенных процессов, включая адгезию и инвазию хозяина, разрушение клеток хозяина и некроз тканей [114]. Хотя роль T2SS в патогенности бактерий была основным предметом исследований, T2SS также имеет решающее значение для выживания микроорганизмов в окружающей среде [95]. Хотя гены этого и иных факторов

вирулентности, которые взаимодействуют с T2SS, присутствуют у представителей *A. hydrophila*, вклад этой системы в вирулентность остается неопределенным [234]. T2SS представляет собой большой трансоболочный аппарат, кодируемый набором из 12-16 основных генов. Он расположен во внешней мембране и транспортирует свернутые белки из периплазмы во внеклеточную среду [380]. T2SS отличается от T1SS, который высвобождает белки во внешнюю среду, и T3SS, T4SS и T6SS, которые являются контактно-зависимыми [389]. T2SS секретирует специфические токсины, эффекторы и крупные белки, которые иначе не могли бы секретироваться бактериям-хозяевам или конкурентам [120].

У бактерий *Aeromonas* были определены два типа гемолизинов (α и β), различающихся по функциональным и физиологическим свойствам [38]. Оба обладают способностью образовывать поры в мембране клетки-хозяина, тем самым вызывая осмотический лизис [132]. Аэролизин, т. е. прототип гемолизина рода, кодируемого геном *aerA* [167], секретируется системой T2SS [233]. Порообразующие токсины (PFT), секретируемые бактериями *Aeromonas*, являются основными факторами вирулентности, используемыми для модуляции апоптоза клеток-хозяев и вызывания инфекций [1, 160]. Они способны вызывать различные типы гибели клеток-хозяев [208]. PFT действуют, вызывая повреждение мембраны клеток-хозяев, что активирует различные сигнальные пути в клетках [254, 321].

T2SS имеет сходство последовательностей с системой пилуса типа 4 (T4P), которая отвечает за подвижность, передачу сигналов и адгезию. T4P не был тщательно изучен у *A. hydrophila*. T4P и T2SS демонстрируют высокую степень сходства своих компонентов, а один из генов, кодирующих компонент T2SS, *gspO*, расположен в локусе, кодирующем T4P [288].

Система секреции типа III (T3SS) - это система, более тесно связанная с вирулентностью аэромонад. Она считается системой наноинъекции,

собираемой и регулируемой примерно сорока белками [402], которая транспортирует белки внутри цитоплазмы целевых клеток и является жизненно важной системой грамотрицательных бактерий для индукции инфекции. T3SS, обнаруживаемая чаще у клинических изолятов, чем у изолятов, выделенных от гидробионтов и из водоемов [290], действует как молекулярная игла, вводящая эффекторные токсины в клетки-хозяева [304]. Многие грамотрицательные патогены используют систему секреции типа III (T3SS) для инъекции детерминант вирулентности, так называемых эффекторов, в цитозоль клетки-хозяина. Наличие T3SS было отмечено у штаммов *A. hydrophila* и *A. salmonicida*. На данный момент идентифицированы два эффекторных белка *A. hydrophila* (AexT и AexU) и четыре эффекторных белка *A. salmonicida* (AexT, AopP, AopH и AopO) [35].

Примечательно, что присутствие генов T3SS менее систематично у *A. hydrophila*, по сравнению с *A. salmonicida*, поскольку только некоторые штаммы бактерии несут все гены для функционального T3SS. Однако секвенирование кластера генов *A. hydrophila* АН-3 с использованием праймеров, полученных из последовательностей у *A. salmonicida*, выявило наличие 35 генов T3SS, 20 из этих генов были гомологичны генам у *A. salmonicida*, половина из оставшихся 15 белков оказались новыми для бактерий рода *Aeromonas* [337].

Многочисленные исследования *A. hydrophila* связали T3SS и его эффекторные белки с вирулентностью. У *A. hydrophila* АН-1 (изолят голубого гурами (*Trichopodus trichopterus*)) с общедоступными нуклеотидными данными), инсерционный мутагенез *aopB* (транслокатор T3SS) и *aopD* (интегральный трансмембранный компонент T3SS), вызывает снижение цитотоксичности и увеличение фагоцитоза, поскольку T3SS больше не способен перемещать эффекторные белки [409]. Аналогичным образом, у *A. dhakensis* SSU гены связаны с вирулентностью, которая включает связанный с T3SS экзоферментный эффектор (AexU), который разрушает актинин и

является летальным [107, 403]. Шаперон AcrH образует комплексы с AopB и AopD [409]. Предполагается, что мутанты *acrH* обладают пониженной вирулентностью [343]. Установлено, что гены *aexU* и *acrH* присутствуют у меньшинства *A. hydrophila*, и не было проведено никаких экспериментальных исследований, чтобы установить их соответствующую роль в вирулентности. Хотя никаких экспериментальных манипуляций не проводилось, последующее исследование сравнило клинические и экологические изоляты *A. hydrophila* и показало, что структурные гены T3SS *aopB* и *ascV* наиболее распространены в клинических изолятах *A. hydrophila* [259].

В совокупности эти результаты указывают на то, что T3SS является весомым фактором, повышающим вирулентность бактерий *Aeromonas* spp. Однако геномный анализ патогенных изолятов *A. hydrophila* показывает, что альтернативные секреторные механизмы также могут иметь решающее значение для патогенеза, учитывая, что гипервирулентные изоляты *A. hydrophila*, заражающие рыбу, лишены основных компонентов [214; 290].

Система секреции типа VI (T6SS) - *vas* (virulent-associated secretion) — это механизм, используемый бактериями для защиты [406]. Эта система функционирует аналогично хвосту фага, позволяя инъецировать факторы вирулентности в клетки-хозяева через белки валин-глицинового повтора G (VrgG) и корегулируемый гемолизин белок (Hcp), который действует как противомикробный порообразующий белок при секретировании или в виде структурного белка [336]. У *A. dhakensis* SSU регулятор транскрипции *vasH* и спиральный трансмембранный белок *VasK* связаны с секрецией Hcp. При этом мутанты *vasH* и *vasK* приводят к снижению антифагоцитарной активности и ослаблению вирулентности. Однако, есть данные, что T3SS и T6SS не является обязательными для *A. hydrophila* [343]. Например, некоторые представители недавно описанного гипервирулентного патотипа пресноводных рыб *A. hydrophila* имеют полный T6SS, в то время как другие сохраняют только 4/13

основных компонентов [116, 290]. Учитывая распространение в 26 из 37 штаммах *A. hydrophila*, перечисленных в GenBank, роль T6SS в вирулентности может быть специфичной для способа заражения бактериями, которые содержат полную T6SS, обладающей большей антимикробной активностью [409].

За последние несколько лет у грамотрицательных бактерий была описана новая система секреции, называемая типом 0. Эта система высвобождает молекулы внутри частиц, полученных из внешней мембраны, называемых везикулами внешней мембраны (OMV), во внеклеточную среду [91]. OMVs представляют собой сферические наночастицы диаметром от 50 до 250 нм. Они образованы липидным биослоем, фосфолипидами и белками внешней мембраны. Везикулы возникают, когда в мембране развивается выступ, который в конечном итоге высвобождается в виде везикулы. Было описано несколько функций ВМВ, включая транспорт ДНК. Хотя OMV были тщательно изучены у бактериальных патогенов, данные об их составе все еще неполны. Были проведены исследования протеома с целью определения состава очищенных OMV из *A. hydrophila* ATCC 7966 и их влияние на клетки-хозяева. В результате исследования было выявлено 211 уникальных белков в OMV. Среди них белок HcpA, токсин rtxA и гемолизин ahh1 являются известными факторами вирулентности [393].

Патогенез инфекций, вызываемых *Aeromonas*, считается многофакторным. Понимание роли факторов, определяющих вирулентность, таких как внеклеточные гемолизины, аэролизины и эффекторные белки/токсины, имеет значение. Эти знания позволяют получить ценные сведения о механизмах развития болезни. Наличие генов, которые кодируют факторы и регулируют гены, способные изменять вирулентность бактерий, связано с высокой степенью изменчивости между штаммами и видами. Экспрессия генов в пределах видов *Aeromonas* также может быть

дифференцирована в зависимости от условий окружающей среды. Системы секреции белков имеют решающее значение для бактериальной вирулентности и взаимодействия с другими организмами. Бактерии рода *Aeromonas* используют различные системы секреции, например, двухступенчатую систему T2SS, для секреции бактериальных токсинов и пептидаз, включая GCAT и аэролизин [254].

1.8. Схемы выделения и идентификации бактерий рода *Aeromonas*

Выделение бактерий *Aeromonas* spp. из образцов окружающей среды представляет собой сложную задачу из-за присутствия конкурирующих бактерий [155, 280].

Доступно множество различных транспортных сред (например, среда Кэри-Блера, среда Эмиса, модифицированная среда Стюарта и забуференный глицерин в физиологическом растворе) для образцов, которые потенциально могут быть контаминированы аэромонадами. Предварительное обогащение щелочной пептонной водой перед субкультивированием в селективной среде является эффективным для выделения *Aeromonas* из воды (например, колодезной) или пищевых продуктов, где количество искомым бактерий невелико [238,357].

Аэромонады растут на лабораторных средах (например, бульоне Лурия, триптическом соевом бульоне и бульоне Мюллера-Хинтона) и большинстве дифференциальных сред для кишечных микроорганизмов, за исключением агара с тиосульфатом, цитратом, желчными солями и сахарозой. Однако рост на данных средах можно не заметить из-за того, что обычная микрофлора представлена лактозоферментирующими штаммами. Аэромонады можно выделить из неэнтеральных клинических образцов на среде Римлера-Шоттса [369].

Представлен метод 1605 «*Aeromonas* в очищенной воде методом мембранной фильтрации с использованием агара ампициллин-декстрин с ванкомицином (ADA-V)» используемый в программах сбора и мониторинга данных Агентства по охране окружающей среды (EPA) от 2001 года. Этот метод использует селективную среду, которая частично подавляет рост нецелевых видов бактерий, позволяя при этом расти большинству видов *Aeromonas*, которые предположительно идентифицируются по образованию кислоты при ферментации декстрина и наличию желтых колоний на агаровой среде ампициллин-декстрин с ванкомицином (ADA-V). Жёлтые колонии подсчитываются и подтверждаются путем тестирования на наличие цитохрома С (тест на оксидазу) и способности ферментировать трегалозу и вырабатывать индол. Лабораториям не разрешается изменять среду ADA-V или процедуры, связанные с фильтрацией [155].

Среда крахмал-глутамат-ампициллин-пенициллин (SGAP-10) использовалась для изоляции аэромонад из осадка сточных вод. Эта среда являлась высокоселективной и применялась для изоляции аэромонад из пищевых продуктов (параметры инкубации: при 35° С в течение 24–48 часов). Колонии типировали с помощью точечного теста на оксидазу и идентифицировали по биохимическим свойствам [280].

В настоящее время в литературе представлены разные методы для детекции бактерий *A. hydrophila*. Классические бактериологические культивирования точны, но требуют много времени. Однако, как указывалось ранее, идентификация на основе биохимических методов сложна, материалоемкая и трудозатратна. Из-за узкого спектра биохимических тестов можно обнаружить только типичные штаммы и, следовательно, некорректно установить видовую принадлежность. Иммуноферментный анализ (ИФА), дот-блоттинг и серотипирование обладают низкой диагностической чувствительностью [15].

Разработан метод иммуоферментного анализа для обнаружения *A. hydrophila* O:11 в образцах пищи. Этот анализ был высокоспецифичным для целевого антигена, и другие виды или серотипы *A. hydrophila* не были обнаружены [63, 159].

Для выделения видов *Aeromonas* из мяса и рыбы рекомендовано обогащение щелочно-пептонной водой (APW) и последовательное высевание на две селективные среды – кровяной агар с 30 мкг/мл ампициллина (ASBA 30) и VIBG-агар [159].

После культурального выделения аэромонады легко распознаются с помощью простых точечных тестов, включая положительные реакции на цитохромоксидазу и индол. Многие штаммы также вызывают β -гемолиз или двухзонный гемолиз (внешняя неполная зона гемолиза, внутренняя полная зона) на средах, содержащих овечью кровь. Дальнейшая проверка может быть достигнута с помощью автоматизированных систем обнаружения, таких как система API-20E, API-32GN и идентификационная карта Vitek 2 ID-GNB [336].

Несколько коммерческих систем идентификации (MicroScan Walk/Away, ID69-Phoenix, BBL Crystal Enteric/Nonfermenter и система микропланшетов GN2-Omnilog) доступны для идентификации *Aeromonas*. Эти коммерческие наборы дороги и обеспечивают неточную идентификацию из-за устаревших баз данных, слабых алгоритмов и исключения ключевых субстратов, необходимых для дифференциации видов [280].

Описан протокол выделения и идентификации *Aeromonas sp.* от рыб, где первый этап - гомогенизация органов исследуемой рыбы, второй этап – посев на среду Лурии-Бертани (LB). Чашки с образцами инкубировались при 37 °C в течение 24–48 часов. Колонии на этой среде вырастали гладкие, выпуклые и округлые, желто-коричневого цвета [397].

Для молекулярной идентификации штаммов используется протокол для установки полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), полученных из 16S рДНК [180, 397].

Для выявления бактерий рода *Aeromonas* при инфекционных процессах у людей предложен протокол «UK SMI ID 19 Identification of *Vibrio* and *Aeromonas* species». С транспортной среды параллельно производится посев на кровяной агар, культивирование производится аэробно при 35-37°C в течение 18–24 часов, а также на агар цефсулодина-иргасана-новобиоцина (CIN) или агар Мак-Конки, инкубирование на котором проводят аэробно при 35-37°C в течение 24–48 часов. На кровяном агаре колонии отчетливо круглые, большие, приподнятые и имеют диаметр 1–3 мм, на агаре CIN - колонии выглядят как розовые из-за ферментации D-маннита, а на агаре МакКонки – колонии обычно не ферментируют лактозу, хотя некоторые виды способны к ферментации данного углевода. Однако некоторые виды, такие как штаммы *A. salmonicida*, не растут при температуре 35–37°C, а растут при температуре 22–28°C. Дальнейшую идентификацию штаммов проводят на основе окраски по методу Грамма, теста на оксидазу, а также на основании постановки реакции на чувствительность к птеридину O129. Виды *Aeromonas* устойчивы к вибростатическому соединению O/129 (диски 150 мкг). Для дальнейшей идентификации могут быть использованы такие тесты, коммерческие системы для идентификации, а также тест на гидролиз орнитиндекарбоксилазы, тест Фогеса-Проскауэра, или матричная лазерная десорбция/ионизация - времяпролетная (MALDI-TOF) масс-спектрометрия. Согласно этим рекомендациям MALDI-TOF MS использовалась для определения идентификации на уровне рода с точностью 100% и идентификации на уровне вида с точностью 90% для клинических изолятов рода *Aeromonas*. Для дальнейшей идентификации при наличии показаний могут быть использованы коммерческие системы идентификации или осуществлена отправка в

референтную лабораторию. Однако, коммерческие системы для идентификации бактерий, как известно, неточны для идентификации *Aeromonas* spp., поскольку они не включают ключевые субстраты, необходимые для правильной идентификации [23, 199].

Установлено, что система MicroScan более надежна, чем ее конкуренты, поскольку она полагается на большее количество субстратов для идентификации бактерий. Вопреки этим выводам, сообщалось, что система MicroScan/WalkAway правильно идентифицировала только 14,8% изолятов, в то время как система BBL Crystal Enteric/Nonfermenter правильно идентифицировала 20,3% изолятов, первоначально отнесённых к видам с помощью анализа полиморфизма длины фрагмента рестрикции гена 16S рНК. Большинство ошибочных идентификаций помещали *Aeromonas* spp. в род *Vibrio*, хотя один штамм *A. veronii* был идентифицирован как *Burkholderia ceracia* системой BBL [130].

За последние два десятилетия возросло количество применений полимеразной цепной реакции (ПЦР) и генетических зондов для прямого обнаружения бактерий *Aeromonas* в широком диапазоне образцов и матриц. Молекулярные методы имеют преимущество использования стабильных генотипических характеристик, являются простыми, воспроизводимыми, быстрыми, специфичными, более чувствительными, независимыми от культуры и обладают высокой производительностью и дискриминационной способностью [338]. В литературе описаны ПЦР-системы для детекции *A. hydrophila* с электрофортической детекцией и в режиме «реального времени» из разных образцов, таких как вода, пробы рыбы, сырого молока [144, 277, 354, 363]. Известен метод ПЦР для обнаружения *A. hydrophila* в сыром молоке. Предел обнаружения составил $2 \log_{10}$ КОЕ/г [241].

В настоящее время на рынке доступны коммерческие наборы для проведения полимеразной цепной реакции, которые используются для

идентификации аэромонад. Среди них можно выделить «VIASURE *Aeromonas* + *Yersinia enterocolitica*» (Испания) и AccuPower® *Aeromonas hydrophila* (Испания). Также существуют тест-системы для определения наличия *A. hydrophila* с использованием метода ПЦР, например, PCRmax и Bioformula. За последнее десятилетие было создано множество методов изотермической амплификации. К ним относятся рекомбиназная полимеразная амплификация, амплификация по принципу катящегося кольца и амплификация, зависящая от геликазы [307].

За последнее десятилетия было разработано большое количество анализов, основанных на технологии ПЦР, для обнаружения *A. hydrophila* путем воздействия на ген вирулентности [14, 136, 140, 341].

При этом стоит отметить, что представленные исследователями праймерные системы не позволяют произвести точную идентификацию до вида *A. hydrophila*, это обусловлено, тем, что произошло таксономическое изменение внутри рода *Aeromonas*. В частности, в отдельный вид были вынесены *Aeromonas dhakensis* [99]. Другие же праймерные системы направлены на детекцию участков генов вирулентности, характерных для ряда представителей рода *Aeromonas*. Поэтому актуальным является подбор праймеров для детекции и идентификации *A. hydrophila* методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени».

В 2000 году был разработан новый метод изотермической амплификации для амплификации ограниченного количества копий ДНК до миллиона копий в течение часа. Этот метод известен как петлевая изотермическая амплификация (LAMP) [245].

LAMP — это новый молекулярный метод амплификации нуклеиновых кислот, при котором набор из четырех (или шести) различных праймеров связывается с шестью (или восемью) различными областями целевого гена, что делает его высокоспецифичным. Этот набор праймеров состоит из двух

внешних (F3 и B3) праймеров, двух внутренних праймеров (прямой внутренний праймер (FIP) и обратный внутренний праймер (BIP)) и петлевых праймеров (петля вперед и петля назад). Реакция LAMP может быть проведена в изотермических условиях с использованием ДНК-полимеразы Bst, которая имеет высокую активность смещения [236, 371].

На настоящий момент в литературе описан ряд праймеров для детекции бактерий рода *Aeromonas*. Известен метод LAMP-HNB для быстрого обнаружения *Aeromonas salmonicida*, показавший высокую специфичность, чувствительность и предел обнаружения $3,077 \times 10^{-6}$ нг/мкл без каких-либо ложноположительных или ложноотрицательных результатов, детекция результата производилась колориметрическим методом при помощи красителя гидроксинафтолового синего [342].

Попытки связать клинические и экологические изоляты требовали методов типирования, таких как изоферментный анализ, или молекулярно-генетических методов, таких как паттерны рестрикции рДНК (риботипирование), анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP), гель-электрофорез в импульсном поле (PFGE) или полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для идентификации штаммов из клинических образцов были разработаны различные методы быстрого типирования; к ним относятся молекулярные методы, такие как электрофорез в геле в импульсном поле (PFGE), типирование мультилокусной последовательности (MLST), анализ тандемных повторов с переменным числом локусов (MVLA), полиморфизм длины флуоресцентно амплифицированных фрагментов (FAFLP) и секвенирование всего генома (WGS). Все эти подходы позволяют проводить субтипирование неродственных штаммов, но делают это с разной точностью, дискриминационной способностью и воспроизводимостью [105, 129, 134, 161, 175, 338, 359].

Оценка анализа полиморфизма длин усиленных фрагментов (AFLP) как метода ДНК-фингерпринтинга в бактериальной таксономии включала *Aeromonas* как один из первых тестовых случаев [204]. Первоначально основанный на автордиографии, а затем на флуоресценции, как средство обнаружения, AFLP оказался высоко дискриминационным методом в генотипической классификации видов *Aeromonas* [207]. Кроме того, AFLP-фингерпринтинг использовался для изучения положения видов с неясным таксономическим статусом, включая *A. eucrenophila*, *A. encheleia*, *Aeromonas* HG11, *A. ichthiosmia*, *A. enteropelogenes*, *A. allosaccharophila*. А также для выделения новых таксонов *Aeromonas*, таких как *A. popoffii*, *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, *A. hydrophila* subsp. *ranae*, *A. molluscorum*, *A. bivalvium* [30, 57] и *A. diversa* [332]. Хотя во многих случаях группировка AFLP согласуется с результатами ДНК-ДНК гибридизации, исключения были зарегистрированы и обсуждены [204]. Например, AFLP-фингерпринтинг использовался для изучения выживаемости генетически маркированного штамма *A. hydrophila* в пресных водах и водах с низким содержанием питательных веществ. Для оценки клональных отношений между набором штаммов *A. hydrophila* HG3, собранных из шведского питьевого колодца в течение 4-летнего исследования, и для определения генетической изменчивости среди нетипичных изолятов *A. salmonicida*, выделенных от морских рыб [204].

Вышеперечисленные наборы для детекции аэромонад иностранного производства, поэтому есть необходимость в разработке собственных лабораторных инструментов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты, материалы и методы

Объекты исследований: 91 проба объектов санитарного надзора, включающая 5 проб гидробионтов (рыба) и 86 проб воды из водоёмов, находящихся на территории Ульяновской и Самарской областей и Республики Чувашия.

Для экспериментов были использованы штаммы: *Aeromonas veronii* ATCC 9071, *A. caviae* ATCC 15468, *A. salmonicida* ATCC 33658, *A. hydrophila* ATCC 49140, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Pseudomonas fluorescens* B-1138, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Yersinia ruckeri* 46-123, *Flavobacterium spp.* 2, *Proteus mirabilis* 5, *Acinetobacter calcoaceticus* B-5971, *Alcaligenes sp.* B-5269, *Escherichia coli* K12, *Klebsiella pneumoniae* C6, находящиеся на хранении в музее микроорганизмов кафедр микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы и микробиологии, биотехнологии и молекулярной диагностики ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

Исследования по изучению фенотипических характеристик изолятов *Aeromonas* (морфологических, культуральных и биохимических свойств) были проведены с использованием бактериологических методов идентификации микроорганизмов, опираясь на алгоритм, разработанный для типирования аэромонад (Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб: часть 1. Инструкция о мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб. - Москва, Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998. с. 142–150; Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб: часть 1. Методические указания по определению патогенности аэромонад по степени ДНКазной активности. - Москва, Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998. с. 150–152; SMI ID 19: identification of *Vibrio* and *Aeromonas* species (Public Health England, 2015).

Для оценки роста на питательных средах бактерии культивировали при температурах 19–20, 30–31, 36–37, 41–42 °С.

В работе применяли агар бактериологический (Испания), питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), бульон LB по Lennox (Диаэм, Россия), агар бактериологический (Диаэм, Россия), среду Симмонса (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), нитратный агар (Himedia, Индия), уреазный агар Кристенсена (Himedia, Индия), гемоглобин сухой (Tmedia, Индия), XLD-агар для дифференциации патогенных энтеробактерий (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), селективный агар для псевдомонад и аэромонад (GSP) (Aldrich Sigma, США), питательную среду № 15 ГРМ для контроля микробной загрязненности (для определения индола) (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск (Россия), набор для определения ацетоина в реакции Фогес-Проскауэра (НИЦФ, Россия), BD *Aeromonas Yersinia* агар (Becton Dickinson GmbH, Германия), агар *Aeromonas* (RYAN) (Conda, Испания), агар Макконки с лактозой желчными кислотами (Conda, Индия), бульон с лизином/орнитином/аргинином (Himedia, Индия), агар для определения ДНКазы (Conda, Испания), среду Кларка (глюкозофосфатный бульон) (Биокомпас-С, Россия), среду Гисса (Биотехновация, Россия), селективный агар для аэромонад (BSIBG) (Himedia, Индия).

Для биохимической идентификации использовали набор НЕФЕРМтест 24 (Erba Lachema, Чехия). В качестве селективного компонента для селективных агаров для аэромонад (GSP и RYAN) использовали ампициллин (NoeFroxx, Германия).

Использовали в работе: раствор сульфаниловой кислоты (Himedia, Индия), альфа-нафтиламиновый реактив (Himedia, Индия), реактив Эрлиха (НИЦФ, Россия), «Набор для окраски мазков по Граму» (НИЦФ, Россия), гидролизат казеина (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), хлорид бария (НеваРеактив, Россия), пептон ферментативный (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), хлорид

аммония (НеваРеактив, Россия), нитрат калия (ЛенРеактив, Россия), дрожжевой экстракт (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), сульфат магния семиводный (ЛенРеактив, Россия), карбонат кальция (ЛенРеактив, Россия), глюкозу (Диаэм, Россия), натрий цитрат 2-водный (Диаэм, Россия), N, N-диметилп-фенилендиамин (Aldrich, США), раствор теллурита калия 1% (Aldrich, США), глюконат натрия (Aldrich-Sigma, Германия), натрий додецилсульфат (PanReasAppliChem, Германия), сукцинат натрия (Aldrich-Sigma, Германия), мальтозу (Диаэм, Россия), глутамат натрия (Aldrich-Sigma, Германия), дигидрофосфат калия (PanReasAppliChem, Германия), натрия хлорид (PanReasAppliChem, Германия), бромтимоловый синий (Ленреактив, Россия), пролин-L (neoFroxx, Германия), β -аланин (Acros Organics), тирозин-L (CDH, Индия), L-метионин (PanReasAppliChem, Германия), DL-молочную кислоту (85%) (Acros Organics), аммоний фосфорнокислый 1-замещенный (Merck).

В рамках исследования была проанализирована возможность использования изолятами *Aeromonas* таких веществ, как глутамат натрия, сукцинат натрия, пролин-L (neoFroxx, Германия), β -аланин (Acros Organics), тирозин-L (CDH, Индия) и L-метионин (PanReasAppliChem, Германия) в качестве единственного источника углерода. В качестве основы для солей использовался следующий состав: хлорид аммония - 0,08 г/л, сульфат магния - 0,002 г/л, хлорид натрия - 4 г/л. Для проведения теста на оксидазу был использован 1% раствор N-N-диметил-парафенилендиамина. Каталазную активность определяли с помощью 3% раствора перекиси водорода.

Для определения культуральных, биохимических и морфологических свойств бактерий *Aeromonas* были использованы тесты, указанные в руководстве Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (2007) [251].

Для определения способности бактерий утилизировать DL-лактат использовалась среда следующего состава на 1 литр: DL-молочная кислота

(60%) - 2,5 мл; NaCl - 5 грамм, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ - 1 г; K_2HPO_4 - 1 грамм; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2 грамм; агар - 15 грамм; 0,2% бромтимоловый синий - 40 мл; pH 6,8.

Для изучения гемолитической активности штаммов применяли колумбийский агар с добавлением 5% дефибрированной крови барана или раствора гемоглобина.

Для изучения антибиотикорезистентности выделенных бактериальных изолятов штаммы *Aeromonas* культивировали при 30°C в течение 24 часов на бульоне LB по Miller (Диаэм, Россия). Исследование было выполнено по МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Для изучения резистентности к антибактериальным препаратам использовали индикаторные диски с антибиотиками: амоксициллин, бензилпенициллин, ампициллин, цефтриаксон, цефуроксим, полимиксин, кларитромицин, доксициклин, эритромицин, амикацин, неомицин, гентамицин, ломефлоксацин, норфлоксацин, фурадонин, триметоприм/сульфаметоксазол, флуконазол, линкомицин (НИЦФ, Россия) и мупироцин (Himedia, Индия).

Для выделения ДНК использовали набор реагентов «M-CORB-OOM» (Синтол, Россия). Для определения чувствительности разработанного протокола было проведено измерение концентрации НК референс-штамма *A. hydrophila* ATCC 49140 на приборе EPPENDORF BioSpectrometer kinetic (Eppendorf, Германия) при $\lambda = 260/280$ нм. Концентрацию до показателя 250 мкг/мл доводили деионизированной водой (New England Biolabs, США). Для постановки реакции фингерпринтинга ДНК изучаемых штаммов концентрацию доводили до показателя 50 мкг/мл.

Подбор праймеров для детекции бактерий *A. hydrophila* методами ПЦР-РВ и RT-LAMP был выполнен на основе геномов бактерий рода *Aeromonas*, представленных в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и на сайте Американской коллекции типовых культур (ATCC). Поиск и подбор

специфического участка выполнен при помощи программы UGENE V 44.0 (<http://ugene.net>) и сайта NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Конструирование праймеров для детекции бактерий методом ПЦР выполнено при помощи интернет-ресурса Primer3plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). Конструирование праймеров детекции бактерий методом LAMP проведено при помощи Explore V5 (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>). Специфичность разработанных праймеров подтверждена в системе BLAST на сервере Национального центра биотехнологической информации (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

В исследованиях использовали ДНК-полимеразу Bst (Диаэм, Россия), смесь dNTP (100mM) (ЕвроГен, Россия), воду свободную от нуклеаз (New England Biolabs, США), 2,0% агарозный гель.

В ходе проведения полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекции были использованы: реакционная смесь БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (БиоЛабмикс, Россия), 10x трис-боратный буфер, агароза (Россия), набор реагентов «ПРОБА-РАПИД» для выделения ДНК (ДНК-технологии, Россия), 1% раствор бромистого этидия (AppliChem, США).

В качестве положительных контролей использовали референс-штаммы: *A. salmonicida* ATCC 33568, *A. caviae* ATCC 15468, *A. veronii* ATCC 9071, *A. hydrophila* ATCC 49140; в качестве отрицательного контроля - *S. aureus* ATCC 6538, *E. faecalis* ATCC 29212, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *P. fluorescens* B-1138, *Y. enterocolitica* ATCC 23715, *Y. ruckeri* 46-123, *Flavobacterium* spp. - 2, *Pr. mirabilis* 5, *A. calcoaceticus* B-5971, *Alcaligenes* spp. B-5269, *E. coli* K12.

Аmplификацию проводили на термоциклерах ДТпрайм (ДНК-технология, Россия) и Bio-Rad T100 (Bio-Rad, США). Для проведения электрофорезирования использовали 10-х TBE буфер. Ампликоны разделяли методом электрофорезирования в 2% агарозном геле.

Для детекции результатов амплификации был использован «Метод обнаружения амплификации путем высвобождения гасящей реакции (DARQ-detection of amplification by release of quenching)».

Электрофорезограммы, полученные методами ERIC- и BOX-ПЦР, были проанализированы с использованием программного обеспечения PyElph версии 1.4 (доступно по адресу <https://sourceforge.net/projects/pyelph/>). В данной программе были созданы дендрограммы. Кластеризацию бактериальных изолятов проводили на основе метода невзвешенных парных групп с анализом среднего арифметического (UPGMA) и коэффициента Дайса.

Праймерные системы для детекции участков генов, кодирующих факторы вирулентности бактерий рода *Aeromonas*: гемолизин (hlyA), аэролизин (aerA), АДФ-рибозилирующий токсин (aehT), цитотоксический термолабильный энтеротоксин (alt), компоненты системы секреции T3SS (aopB и ascV), ген термостабильного цитотонического энтеротоксина (ast), белок, кодирующий субъединицу жгутика - (fla), липазу (lip), эластазу (ela), ген шига-токсина (stx-1), систему секреция шестого типа (vasH), были подобраны автором на основе анализа литературных данных и синтезированы, как и все системы праймеров в данном исследовании, ООО «Синтол» (РФ). В качестве филогенетических маркеров *A. hydrophila* были использованы гены «домашнего хозяйства» и ген 16S рРНК. Исследование проводили методом ПЦР с детекцией продуктов амплификации электрофоретическим методом.

Исследования проводились в реакционной смеси общим объемом 25 мкл. На каждую реакцию праймеры добавлялись объемом 2 мкл, концентрация каждого составляла 10 пмоль. Для постановки реакции использовали 2,5 x реакционную смесь (Синтол, Россия), на одну реакцию вносили 5 мкл ДНК исследуемого бактериального штамма, доведение до оптимального объема осуществляли водой для молекулярной биологии (Neofroxx, Германия).

Полученные результаты экспериментов обрабатывали методами вариационной статистики с использованием сервисных программ и статистических функций программы Microsoft Excel с определением критерия достоверности по Стьюденту.

Оборудование: микроскоп ZEISS Primo Star, Германия; тринокуляр с видеосистемой; термостат ТС-80М-2; термостат ТСО-1/80, СКТБ, автоклав ГК-100-3; шкаф сушильно-стерилизационный ШСС-80п УХЛ 424; установка бактерицидная УГД-2; лабораторная посуда общего назначения, мерная лабораторная посуда.

2.2. Результаты исследований и их обсуждение

2.2.1. Биологические свойства референс – штамма *A. hydrophila*

Экспериментально установлено, что штамм *A. hydrophila* ATCC 49140 проявляет биологические свойства, характерные для мезофильных представителей рода *Aeromonas*. Это грамотрицательные подвижные палочки, располагающиеся в окрашенных бактериологических мазках единично/парами.

Этот штамм способен к росту на LB-бульоне по Lennox, *A. hydrophila* при культивировании в присутствии 3% хлорида натрия при 30 °С через 24 часа культивирования растет с помутнением всего столбика среды, при тех же условиях культивирования при 5% хлорида натрия рост штамма отсутствовал. На LB-агаре по Lennox колонии имели кремово-белового цвета диаметром 1–2 мм, с ровным краем, выпуклые, глянцевые схожую морфологию через 24 часа инкубирования при 30 °С.

На Колумбийском агаре с добавлением 5% бараньей крови через 24 часа культивированная у штамма *A. hydrophila* выявлен β-гемолиз.

На CIN-агаре *A. hydrophila* при 30 °С через 24 часа наблюдали рост колоний малинового цвета, диаметром 1–2 мм, выпуклых глянцевых с ровным краем. При культивировании через 48 часов происходило изменение цвета среды и колоний на желтый.

На RYAN бактерии *A. hydrophila* росли через 24 часов культивирования при 30 °С в виде сине-зеленых колоний диаметром 1–2 мм, выпуклых, глянцевых с ровным краем.

На BSIBG-агаре штамм бактерии *A. hydrophila* ATCC 49140 росли в виде мелких, диаметром менее 1 мм, жёлтого цвета выпуклых колоний с ровным краем колоний (через 24 часа культивирования при 30 °С) (Рисунок 1).

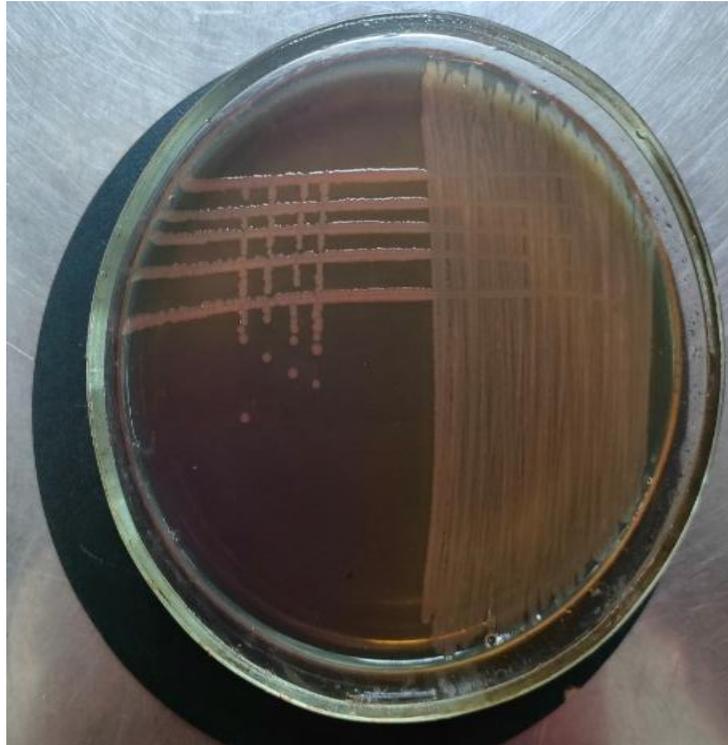


Рисунок 1 – Рост штаммов *A. hydrophila* ATCC 49140 на селективном агаре для аэромонад (BSIBG-агаре) через 24 часа при 30 °С

Селективность данной среды обусловлена наличием таких источников углеводов, как крахмал и глютамат натрия; для дифференциации бактерий по типу метаболизма в среде работает крезоловый красный. Бактерии *A. hydrophila* при росте используют крахмал как основной источник углеводов, тем самым среда приобретает желтый цвет, в случае роста бактерий рода *Pseudomonas*, использующих в качестве основного источника углеводов глютамат, среда приобретает фиолетовый цвет. В качестве дополнительного селективного агента в составе среды есть пенициллин G.

На агаре МакКонки с лактозой, данный штамм рос в виде кремовые колонии диаметром 1–2 мм, выпуклые глянцевые с ровным краем.

На Иерсиния-агаре бактерии дают рост через 24 часа культивирования при температуре 30 °С; колонии на этой среде имели следующую морфологию: желтые, диаметром 1–2 мм, глянцевые выпуклые с ровным краем.

Штамм *A. hydrophila* ATCC 49140 проявлял биологические свойства характерные для мезофильных штаммов этого рода. Штамм был способен к росту в широком температурном диапазоне от 10 до 42°C, на LB-бульоне в присутствии 3% хлорида натрия, к ферментации глюкозы, мальтозы, маннитола, сахарозы, фруктозы; к утилизации пролина, β -аланина, тирозина-L, L-метионина, сукцината, глутамата натрия и DL-лактата. Исследуемый штамм характеризовался положительной реакцией на продукцию оксидазы, нитратов, индола, ДНКазу, желатиназы. Штамм *A. hydrophila* обладал аргининдекарбоксилазной активностью и продуцировал 2-кетоглюконат.

Отрицательными были следующие характеристики: рост на LB-бульоне с 5% NaCl (хлорида натрия) и на LB-агаре с 320 мг/л теллурита калия, образование пигмента, утилизация цитрата на среде Кристенсена, ацетата и тартрата; уреазная активность. Штамм не обладал ферментативными свойствами в отношении следующих углеводов: рамнозы, сорбита, ксилозы.

В таблицах 1 и 2 представлены результаты собственных исследований по изучению физиолого-биохимических свойств *A. hydrophila* ATCC 49140 в сравнении с данными, описанными в главе *Aeromonas* книги Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (2015) [251].

Штамм *A. hydrophila* ATCC 49140 был способен расти в широком температурном диапазоне от 10 до 42°C, на LB-бульоне в присутствии 3% хлорида натрия; он ферментировал глюкозу, мальтозу, маннитол, сахарозу, фруктозу; утилизировал пролин, β -аланин, L-тирозин, L-метионин, сукцинат, глутамат натрия и DL-лактат. Исследуемый штамм продуцировал оксидазу, нитраты, индол, ДНКазу, желатиназу, 2-кетоглюконат; характеризовался аргининдекарбоксилазной активностью.

Таблица 1 – Физиолого-биохимические свойства *A. hydrophila* ATCC 49140 в сравнении с данными, описанными в главе *Aeromonas* «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria» (2015) [251]

Свойство	<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	<i>A. hydrophila</i> *	<i>A. bestiarum</i> *	<i>A. sobria</i> *	<i>A. veronii</i> <i>bv.veronii</i> *	<i>A. veronii</i> <i>bv.sobria</i> *	<i>A. caviae</i> *	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> *
1. Окраска по Граму	-	-	-	-	-	-	-	-
2. Подвижность	+	+	+	-	+	+	+	-
3. Оксидаза	+	+	+	+	+	+	+	+
4. 10°C	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+
5. 20°C	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+
6. 30°C	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+
7. 35°C	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	-
8. 42°C	+	ND	-	-	ND	ND	ND	-
9. Реакция Фогеса-Проскауэра	+	+	d	-	d	D	-	-
10. Рост при 3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+
11. Рост при 5% NaCl	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12. Рост на LB-агар с 320 мг/л теллурита калия	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13. Лизиндекорбоксилаза	+	+	d	+	+	+	-	d
14. Аргениндекорбоксилаза	+	+	d	-	-	+	+	+
15. Орнитиндекорбоксилаза	-	-	-	-	+	-	-	-
16. Продукция нитратов	+	+	+	+	+	+	+	+
17. Образование пигмента	-	-	-	-	+	-	-	+
18. Ацетат	-	+	+	+	+	+	+	+
19. Индол	+	+	+	+	+	+	+	-
20. Среда Симмонса на цитрат	-	d	d	+	d	+	d	d
21. Среда Кристенсена на цитрат	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22. Уреазный агар Кристенсена	-	-	-	-	-	-	-	-
23. ДНКаза	+	+	d	-	d	d	d	d
24. Желатиназа	+	+	d	-	d	d	d	d

Примечание – «+» положительная реакция, «-» отрицательная реакция, «ND» данные отсутствуют, d -вариабельная активность.

Таблица 2 – Физиолого-биохимические свойства *A. hydrophila* ATCC 49140 в сравнении с данными, описанными в главе *Aeromonas* «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria» (2015) [251]

	Свойство	<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	<i>A. hydrophila</i> *	<i>A. bestiarum</i> *	<i>A. sobria</i> *	<i>A. veronii</i> <i>bv. veronii</i> *	<i>A. veronii</i> <i>bv. sobria</i> *	<i>A. caviae</i> *	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> *
25.	О/Ф глюкозы	F	+	+	+	+	+	+	+
26.	Лактоза	–	d	d	–	d	d	d	+
27.	Мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	+
28.	Маннитол	+	+	+	+	+	+	+	+
29.	Рамноза	–	d	d	–	–	–	–	–
30.	Сорбит	–	–	–	–	–	–	–	–
31.	Салицин	–	d	d	–	+	–	+	+
32.	Ксилоза	–	–	–	–	–	–	–	–
33.	Сахароза	+	+	+	+	+	+	+	+
34.	Арабиноза	+	–	–	–	–	–	–	–
35.	Фруктоза	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
36.	Галактоза	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	+
37.	γ-глутамилтрансфераза	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
38.	Фосфатаза	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
39.	Эскулин	+	+	+	–	+	–	+	D
40.	Сукцинат натрия	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
41.	Глутамат натрия	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
42.	Пролин -L	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
43.	β- Аланин	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
44.	Трирозин-L	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
45.	L-метионин	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
46.	Тартарт	–	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Примечание – «+» положительная реакция, «-» отрицательная реакция, «ND» данные отсутствуют, «d» переменная активность.

Результаты изучения основных биологических свойств штамма *A. hydrophila* ATCC 49140 стали основой для разработки схемы выделения и идентификации *A. hydrophila* из объектов окружающей среды и патологического материала.

2.2.2. Разработка бактериологического компонента тест-системы

Для выделения штаммов бактерий *A. hydrophila* нами была предложена следующая схема выделения и идентификации, основанная на физиолого-биохимических характеристиках.

Эмпирически была подобрана среда для накопления и первичной идентификации бактерий *A. hydrophila* - А.в.1-УлГАУ, имеющая следующий состав: D-мальтоза моногидрат - 3 г, фосфат калия двухосновный - 1 г, натрия хлорид - 5 г, пептон сухой ферментативный - 1 г, хлорид бария - 1 г, додецилсульфат натрия - 5 г, бромтимоловый синий - 0,08 г на 1 литр.

Селективность данной среды обусловлена наличием в ней додецилсульфата натрия. Эмпирически было установлено, что данное соединение оказывает ингибирующий эффект на ряд грамположительных бактерий, в частности на бактерии: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*. На среде накопления А.в.1-УлГАУ так же не было детектировано роста и ряда грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, *Alcaligenaceae* spp., *Acinetobacter calcoaceticus*. Для подавления роста флюоресцентной группы бактерий рода *Pseudomonas* в состав среды был включен хлорид бария.

На данный момент представлен ряд сред для идентификации бактерий *A. hydrophila*, в частности, агар МакКонки с лактозой, цефсулодин-иргасан-новобицин агар (CIN-агар), глутамат-крахмальный агар (*Pseudomonas-Aeromonas* агар/GSP-агар), XLD-агар, BSIBG-агар, агар для выделения и идентификации *Aeromonas* (RYAN).

Для исследования дифференциально-диагностических свойств этих сред был произведен высеивание на них бактерий: *S. aureus* ATCC 6538, *E. faecalis* ATCC 29212, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *P. fluorescens* B-1138, *Y. enterocolitica* ATCC 23715, *Y. ruckeri* 46-123, *K. pneumoniae* C6, *Flavobacterium* sp.-2, *P. mirabilis* 5, *A. calcoaceticus* B-5971, *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071, *A. caviae*

ATCC 15468, *A. salmonicida* ATCC 333658. Бактерии культивировали при температуре 30 °С в течение 24 часов на LB-бульоне, за исключением *V. parahaemolyticus*, который инкубировали на LB-бульоне с добавлением 3% хлорида натрия. Штамм *A. salmonicida* ATCC 33658 культивировали при 20°С в течение 24 часов на LB-бульоне.

На агаре МакКонки не был выявлен рост бактерий: *S. aureus* ATCC 6538, *E. faecalis* ATCC 29212, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *A. salmonicida* ATCC 33658, *Flavobacterium* sp. (параметры культивирования: температура – 30 °С, время - 24–48 часов). Штаммы *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. veronii* ATCC 9071, *P. fluorescens* B-1138, *Y. enterocolitica* ATCC 23715, *Y. ruckeri* 46-123, *P. mirabilis* 5, *A. calcoaceticus* B-5971 имели схожую морфологию роста (Рисунок 2). При этом колонии *A. caviae* ATCC 15468 имели розовый цвет из-за их способности разлагать лактозу. На этой среде через 24 часа был зафиксирован рост штамма *K. pneumonia* С6.

A. hydrophila, *A. veronii*, *A. caviae* имели схожую морфологию колоний на агаре с цефсулодином-иргасаном-новобиоцином (CIN). Это малиновые, с уплотнением в центре, диаметром 2 мм, выпуклые глянцевые с ровным краем белого цвета колонии (параметры культивирования: температура – 30 °С, время - 24 часа). Аналогичную морфологию имел штамм *Y. enterocolitica* ATCC 23715.

Схожая картина была выявлена на GSP-агаре для штаммов родов *Yersinia* и *Aeromonas*, при этом на данной среде присутствовал рост *P. fluorescens*. Колонии были фиолетового цвета, что обусловлено тем, что представители рода псевдомонад используют глутамат натрия в качестве основного источника углевода.

Экспериментально было установлено, что CIN-агар, XLD-агар и RYAN - агар не обеспечивают дифференциацию штаммов *A. hydrophila* от иных представителей рода *Aeromonas* и от других бактерий - ассоциантов.

Недостатком сред RYAN-агара и GSP-агара является наличие в их составе антибиотиков, на настоящий момент многие бактериальные штаммы не проявляют устойчивости к антимикробным препаратам.

Считаем, что наиболее подходящей питательной средой для скрининга бактерий *A. hydrophila* является BSIBG-агар, несмотря на то, что на ней был детектирован рост бактерий *P. fluorescens* B-1138, *Y. enterocolitica* ATCC 23715, *Y. ruckeri* 46–123, данные бактерии характеризовались уникальной морфологией колоний.

Результаты культивирования анализируемых бактерий на агаре МакКонки с лактозой, CIN-агаре, GSP-агаре, XLD-агаре, RYAN-агаре, и BSIBG-агаре в течение 48 часов при температуре 30 °С представлены в таблицах 3 и 4.

Исходя из данных, представленных в таблицах 3 и 4, в качестве дифференциально - диагностической среды для выделения видов *A. hydrophila* рекомендуется использовать агар с желчными солями и иргасановым бриллиантовым зеленым (BSIBG agar).

После инкубирования бактерий в течение 48 часов при температуре 30°С, проводили дальнейшую типизацию колоний, имеющих характерную для представителей рода *Aeromonas* морфологию.

Для дальнейшей бактериологической идентификации и получения чистой культуры использовали ГРМ-агар с добавлением 1% ксилозы и 0,08% бромтимолового синего. Бактерии инкубировали в течение 24 часов при температуре 30 °С, в качестве дифференциального признака выступала неспособность бактерий вида *A. hydrophila* к ферментации ксилозы. Затем колонии синего цвета культивировали на ГРМ-бульоне в течение 24 часов при таком же температурном режиме.

Таблица 4 – Подбор селективной среды для выделения бактерий *A. hydrophila*

Штамм	Агар МакКонки с лактозой	CIN-агар	GSP-агар	XLD-агар	RYAN-агар	BSIBG-агар
<i>P. fluorescens</i> В-1138	Колонии желтого цвета, d 1-2 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Рост отсутствует	Колонии фиолетового цвета, диаметром менее 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии малиновые цвета, диаметром менее 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии желтого цвета, диаметром менее 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии малинового цвета, диаметром около 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 23715	Колонии желтого цвета, d около 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии малинового цвета, диаметром около 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии желтого цвета, диаметром менее 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии желтого цвета, диаметром менее 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии желтого цвета, диаметром менее 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии желтого цвета, диаметром около 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем
<i>Y. ruckeri</i> 46-123	Колонии кремового цвета, d 1 около мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Рост отсутствует	Колонии желтого цвета, диаметром менее 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии желтого цвета, диаметром менее 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии желтого цвета, диаметром менее 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии желтого цвета, диаметром около 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем
<i>Flavobacterium sp.-2</i>	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует
<i>Proteus mirabilis</i> 5	Колонии кремового цвета, d 1 около мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Рост отсутствует	Колонии желтого цвета, диаметром 1-2 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии желтого цвета, диаметром менее 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии желтого цвета, диаметром менее 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Рост отсутствует
<i>A. calcoaceticus</i> В-5971	Колонии кремовые цвета, диаметром около 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии белого цвета, диаметром около 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии прозрачные цвета, диаметром около 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии желтого цвета, диаметром менее 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Колонии желтого цвета, диаметром менее 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем	Рост отсутствует

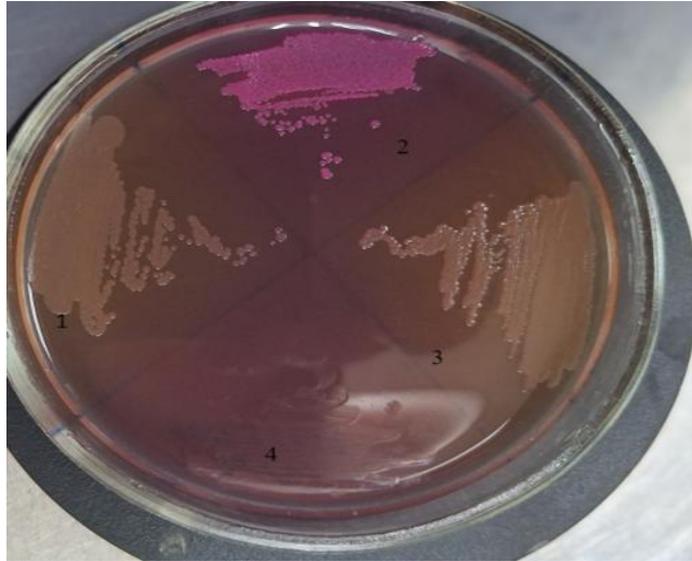


Рисунок 2 – Рост штаммов 1. *A. hydrophila* ATCC49140, 2. *A. caviae* ATCC 15468, 3. *A. veronii bv.sobria* ATCC 9071, 4. *A. salmonicida* ATCC 33658 на агаре МакКонки с лактозой (при 30 °С через 24 часа культивирования)

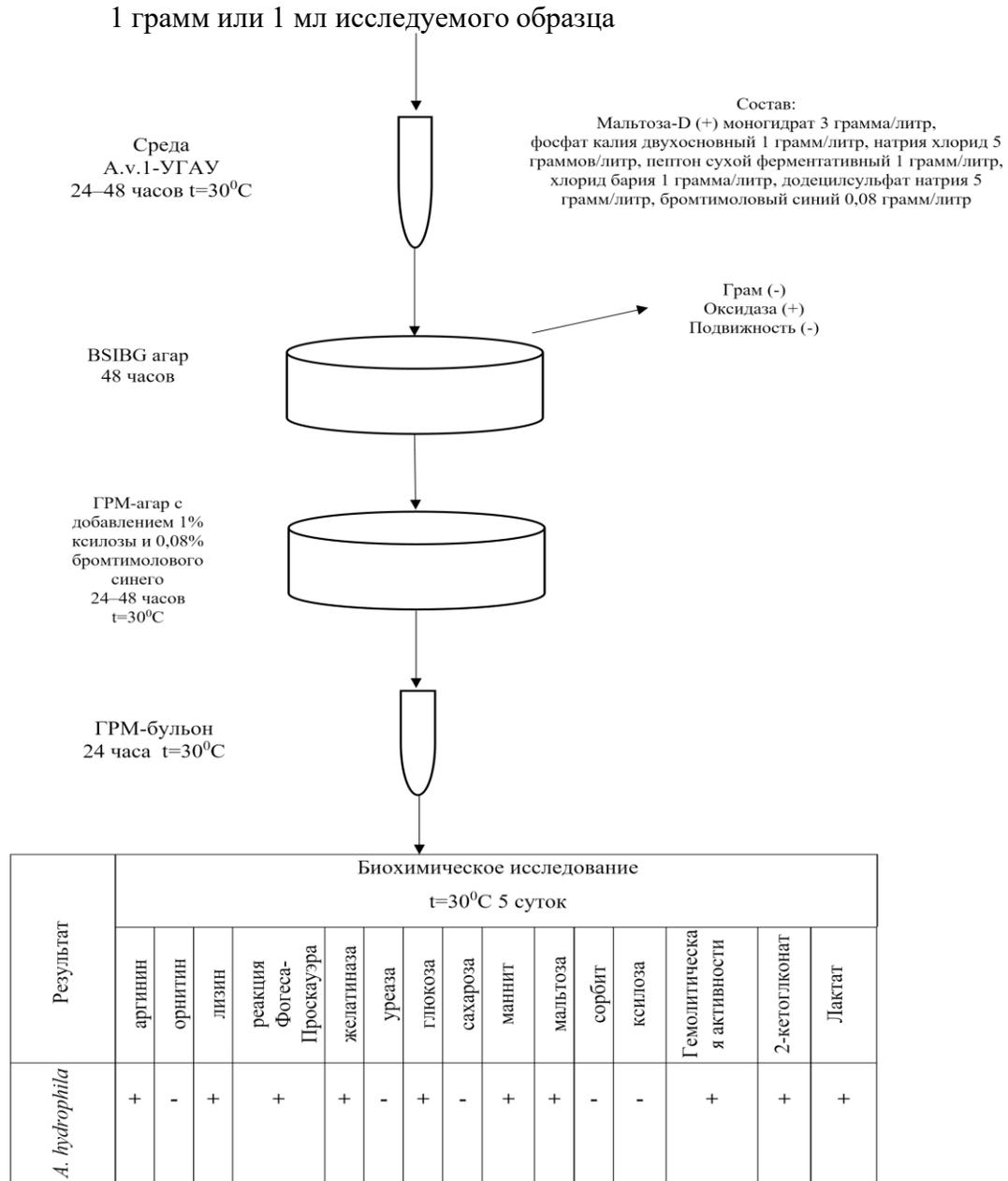
Завершающим этапом бактериологической идентификации является изучение у выделенных штаммов способности вырабатывать аргинингидролазу, орнитиндекарбоксилазу и лизиндекарбоксилазу.

Также ставится реакция Фогеса-Проскауэра, проверяется утилизация DL-лактата, определяется наличие ферментов желатиназы и уреазы.

Кроме того, исследуется способность бактерий к ферментации углеводов, таких как глюкоза, сахароза, маннит, мальтоза, сорбит и ксилоза.

Также проводится реакция на восстановление глюконата.

На Рисунке 3 представлен разработанный бактериологический компонент схемы выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila*.



Примечание – «+» положительная реакция, «-» отрицательная реакция.

Рисунок 3 – Бактериологический компонент схемы выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila*

В результате работы был выполнен подбор компонентов для составления схемы выделения и идентификации бактерий вида *A. hydrophila* из объектов окружающей среды и патологического материала. Компоненты бактериологической схемы позволяют произвести дифференциацию *A.*

hydrophila от ряда представителей рода *Aeromonas* (*A. salmonicida*, *A. veronii*, *A. caviae*) и бактерий-ассоциантов (время исследований - 192–264 часа).

2.2.3. Разработка молекулярно-генетического компонента тест-системы

2.2.3.1. Метод ПЦР с электрофоретической детекцией результата амплификации

Из-за сложного типирования бактерий рода *Aeromonas* в качестве дополнительного инструмента для родовой идентификации был произведен подбор праймерной системы для выявления участка гена, характерного для *Aeromonas* spp.

В качестве таргетных участков при подборе праймеров для идентификации бактерий рода *Aeromonas* был выбран ген «домашнего хозяйства», кодирующий субъединицу ДНК-гиразы В (*gyrB*).

Подобрана система праймеров: прямой праймер (F) CCAGAACAAGACCCCGATCC; обратный (R) GTCAGCGCGGTACGGAAAC для детекции *gyrB*.

Протокол амплификации: предварительная денатурация - 950С в течение 5 минут, 1 цикл, денатурация- 950С в течение 5 сек, отжиг- 60 0С в течение 15 сек, 40 циклов.

В качестве положительных контролей были использованы рефференс-штаммы бактерий рода *Aeromonas* (*A. hydrophila* ATCC 49140, *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071, *A. caviae* ATCC 15468, *A. salmonicida* ATCC 33658).

Для установления родовой специфичности подобранной праймерной системы использовались ДНК бактерий: *S. aureus* ATCC 6538, *E. faecalis* ATCC 29212, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *P. fluorescens* B-1138, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Y. ruckeri* 46-123, *Flavobacterium* sp. 2, *P. mirabilis* 5, *A. calcoaceticus* B-5971, *Alcaligenes* sp. B-5269, *K. pneumoniae* C6, *S. enterica* ATCC 130763.

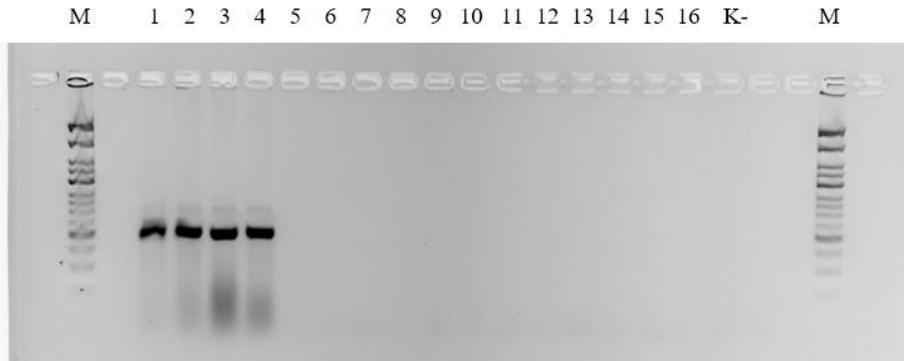


Рисунок 4 – Изучение специфичности праймерной системы для идентификации бактерий рода *Aeromonas*: 1. *A. hydrophila* ATCC 49140, 2. *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071, 3. *A. caviae* ATCC 15468, 4. *A. salmonicida* ATCC 33658, 5. *S. aureus* ATCC 6538, 6. *E. faecalis* ATCC 29212, 7. *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, 8. *P. fluorescens* B-1138, 9. *Y. enterocolitica* ATCC 23715, 10. *Y ruckeri* 46-123, 11. *Flavobacterium* sp. 2, 12. *P. mirabilis* 5, 13. *A. calcoaceticus* B-5971, 14. *Alcaligenes* sp. B-5269, 15. *K. pneumoniae* C 6, 16. *S. enterica* ATCC 130763, «К-» - отрицательный контроль, «М» - маркер

В результате экспериментов подобраны праймерные системы, позволяющие установить родовую принадлежность полевых изолятов бактерий к роду *Aeromonas*, которые показали специфичность в отношении штаммов *A. hydrophila*.

2.2.3.2. Метод ПЦР-РВ

В качестве целевого участка генома был выбран ген, кодирующий белок zipA, который участвует в делении клеток. Этот белок стабилизирует протофиламенты ftsZ, связывая их поперечно, и служит якорем для цитоплазматической мембраны, удерживая Z-кольцо. Кроме того, zipA

необходим для привлечения в септальное кольцо других белков, участвующих в делении клеток.

При помощи программного обеспечения UGEGA и информационного ресурса NCBI MSA Viewer 1.25.0 было выполнено выравнивание участка гена *zipA* штамма *A. hydrophila* ATCC 7966 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CP000462.1?report=fasta&from=1337458&to=1338570>) с аналогичными участками бактерий данного рода. В результате исследования, при использовании ресурса Primer3Plus version: 3.3.0, был произведен подбор праймерной системы для идентификации бактерий вида *A. hydrophila*, представленный в таблице 5.

Таблица 5 – Праймерная система для детекции бактерий *A. hydrophila* методом ПЦР в режиме «реального времени»

Название бактерии	Целевой ген	Праймеры	Длина продукта
<i>A. hydrophila</i>	<i>zipA</i>	Прямой праймер AAGCCCGCCCAGGTCATT	161 п.н.
		Обратный праймер TATTTCGGGAGCGGCAACC	
		Зонд Fam TGCAACCGCTGGACGAAGAG BHQ1	

После синтеза праймеров был подобран протокол для постановки реакции. Реакционная смесь для постановки амплификации имела финальным объемом на одну реакцию 25 мкл: 2,5 мкл 10x ПЦР-буфер Б (Синтол, Россия); 0,2 мкл HS-ДНК-полимеразы Taq, (Диаэм, Россия); 2,5 мкл смеси dNTP 2,5 мМ (Синтол, Россия); 2,5 мкл MgCl₂ 25мМ (Синтол, Россия); 11,3 мкл деионизированной воды (New England Biolab, Великобритания); 1 мкл смеси праймеров с концентрацией 10 пМ прямого и обратного праймера и 4 пМ зонда; 5 мкл образца ДНК. Протокол проведения амплификации представлен в таблице 6. Детекцию сигнала флюоресценции проводили после каждого цикла «Отжиг» по каналу Fam.

Таблица 6 – Протокол амплификации праймеров для детекции бактерий *A. hydrophila* методом ПЦР с детекцией результата по каналу Fam

Номер цикла	Название цикла	Время	Количество циклов	Оптическое измерение
1.	Предварительная денатурация	5 минут	1	
2.	Денатурация	5 секунд	50	
	Отжиг	15 секунд		X

Для определения специфичности разработанной праймерной системы была изучена ее способность к дифференциации *A. hydrophila* от других видов бактерий рода *Aeromonas* (*A. veronii* ATCC 9071, *A. caviae* ATCC 15468, *A. salmonicida* ATCC 33658), а так же бактерий других родов (*S. aureus* ATCC 6538, *E. faecalis* ATCC 29212, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *P. fluorescens* B-1138, *Y. enterocolitica* ATCC 23715, *Y. ruckeri* 46-123, *Flavobacterium* sp. 2, *P. mirabilis* 5, *A. calcoaceticus* B-5971, *Alcaligenes* sp. B-5269, *E. coli* K12). В результате серии экспериментов установлено, что данная система эффективна для идентификации бактерий *A. hydrophila*.

Следующим этапом исследования было изучение чувствительности разработанного протокола амплификации. Для этого была определена концентрация выделенной ДНК штамма *A. hydrophila* ATCC 49140 при помощи спектрофотометра при длине волны 260/280 нм, и доведена при помощи деионизированной воды до 250 мкг/мл.

Проверка специфичности подобранных праймерных систем, где в качестве контролей выступали как штаммы представителей рода *Aeromonas*, так и ряд бактерий-ассоциантов, показала, что разработанная система праймеров специфична для *A. hydrophila*. Чувствительность составила 1,25 пг на реакцию, показатель - Ct 34.0

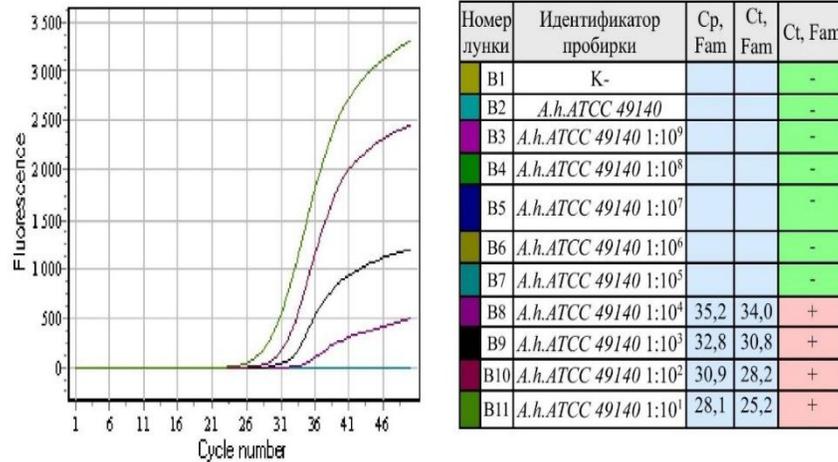


Рисунок 5 – Изучение чувствительности разработанной ПЦР тест-системы для детекции и идентификации бактерий *A. hydrophila* ATCC 49140 (детекция по каналу Fam)

Эмпирически установлено, что подобранная праймерная система и протокол амплификации позволяют установить принадлежность полевых изолятов к виду *A. hydrophila* на основе детекции специфичного участка гена *zipA* в течение 80 минут.

2.2.3.3. Метод RT-LAMP

Для выполнения этой задачи выбран участок ДНК, кодирующий ген клеточного деления *zipA*.

Поиск характерного для бактерий вида *A. hydrophila* участка данного гена был подобран после выполнения множественного выравнивания (Рисунок 6).

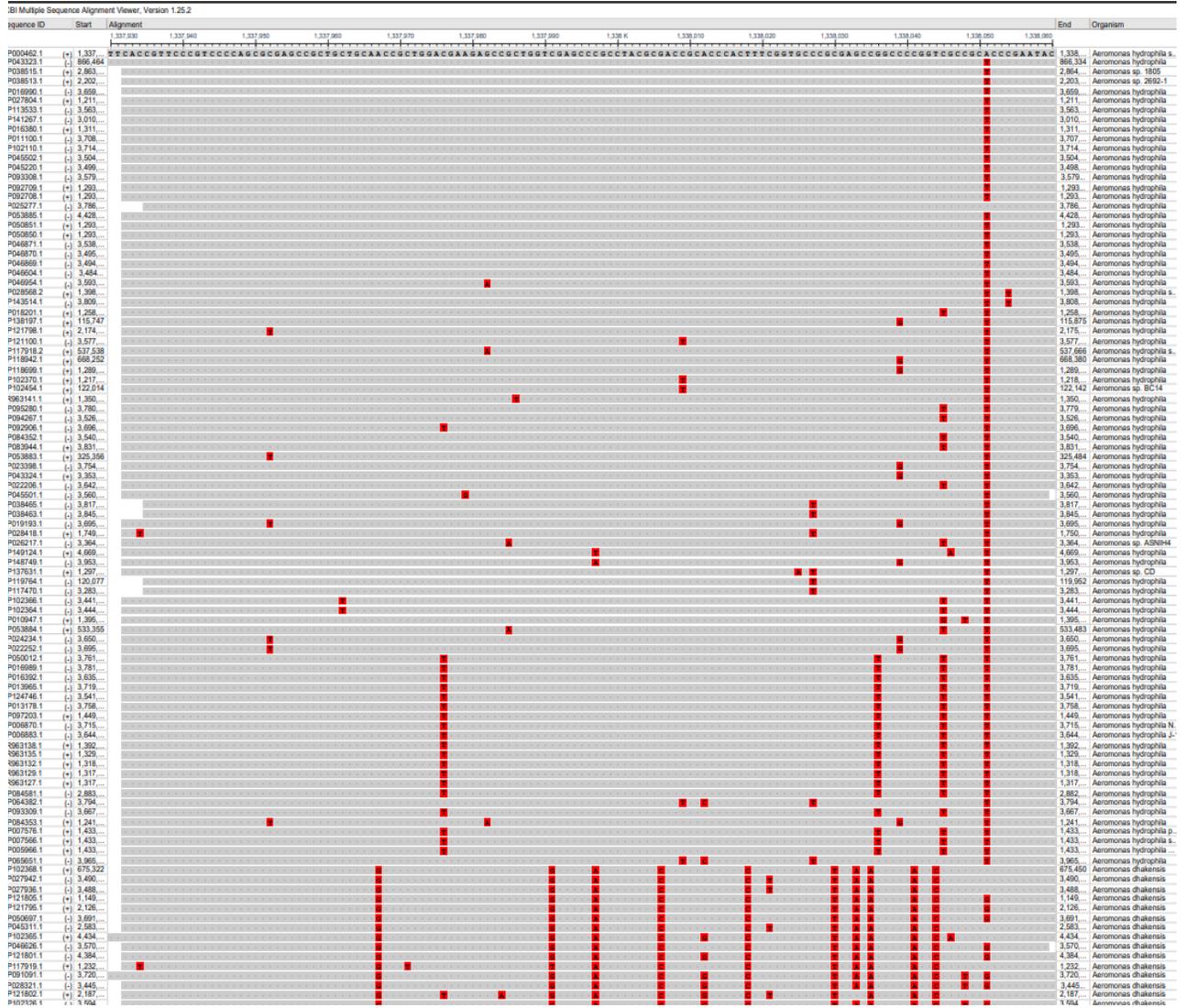


Рисунок 6 – Анализ гена клеточного деления *zipA* у бактерий рода *Aeromonas* методом множественного выравнивания

Подбор праймерных систем был осуществлен при использовании ресурса NEB LAMP Primer Design Tool (<https://lamp.neb.com/>). Праймеры представлены в таблице 7. При использовании интернет-ресурса NCBI primer blast была доказана специфичность данных праймеров методом *in-silico*.

Таблица 7 – Список праймеров для создания протокола постановки LAMP для детекции *A. hydrophila*

Праймер	Длина	Последовательность
AhF3	16	CTCGGGGGCTGCATGA
AhB3	18	CAGGTCATTCGCCGTACC
AhFIP	36	CGCGACCGCACCCACTTT GTATTCGGGAGCGGCAAC
AhVIP	34	GCTCGACCAGCGGCTCTT TCCACCGTCCCGTCC

Для подбора параметров, первым этапом был произведен подбор оптимальной температуры амплификации. Для постановки реакции был использован следующий протокол (на 1 реакцию): смесь дезоксинуклеотидов (dNTP) (10 mM) концентрацией 1,5 mM каждого, 1x буфер, сульфат магния (200mM) - 15 mM, праймеры FIP и VIP - 4,0 mM каждого, F3 и B3 - 0,5 mM каждого, MBst- полимеразу 8 ед, 5 мкл ДНК-матрицы. Для визуализации результата был применён интеркалирующий краситель SYBR Green I (50X) в количестве 0,3 мкл на одну реакцию, объем довели до 20 мкл деионизированной водой. Количество циклов амплификации составило 120, длительность одного цикла составила 30 секунд, детекцию результатов проводили по каналу Fam. Подбор температуры проводили в диапазоне 59-65⁰C. В результате серии экспериментов было установлено, что при 59⁰C, 60⁰C, 61⁰C и 65⁰C реакция отсутствовала. Было установлено, что температуры, при которых шла реакция амплификации, составили 62-64⁰C, с оптимумм составляющем 63 ⁰C.

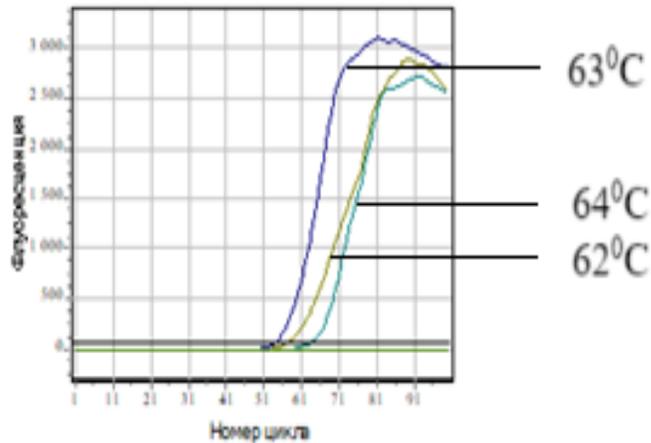


Рисунок 7 – Подбор оптимальной температуры для постановки петлевой изотермической амплификации для детекции и идентификации бактерий *A. hydrophila*

Следующим этапом был произведен подбор оптимальной концентрации праймеров. Для этого был сделан раствор праймеров, имеющий следующий состав: FIP и VIP - 16 мМ каждого, F3 и B3 - 5 мМ каждого. Для постановки эксперимента были использованы следующие концентрации праймеров: 1х (FIP и VIP - 1,6 мМ каждого, F3 и B3 0,5 мМ каждого), 1,5х (FIP и VIP - 2,4 мМ каждого, F3 и B3 - 0,75 мМ каждого), 2х (FIP и VIP - 3,2 мМ каждого, F3 и B3 - 1 мМ каждого) и 2,5 х (FIP и VIP - 4,0 мМ каждого, F3 и B3 - 1,25 мМ каждого). Концентрации остальных компонентов реакционной смеси были использованы те же, что и ранее. В результате серии экспериментов было установлено, что при концентрации праймеров 1х и 1,5х от объема реакционной смеси не было выявлено реакции, а при количестве 2х и 2,5х были выявлены аналогичные результаты. Исходя из полученных данных в дальнейших исследованиях концентрация праймеров на одну реакцию была следующая: FIP и VIP 3,2 мМ каждого, F3 и B3 1 мМ каждого.

Так же был произведен подбор оптимальной концентрации сульфата магния. Для постановки реакции были использованы следующие концентрации:

6, 8, 10 и 15 мМ. В результате экспериментов было выявлено, что для оптимального протекания реакции следует использовать 15 мМ $MgSO_4$ на 1 реакцию.

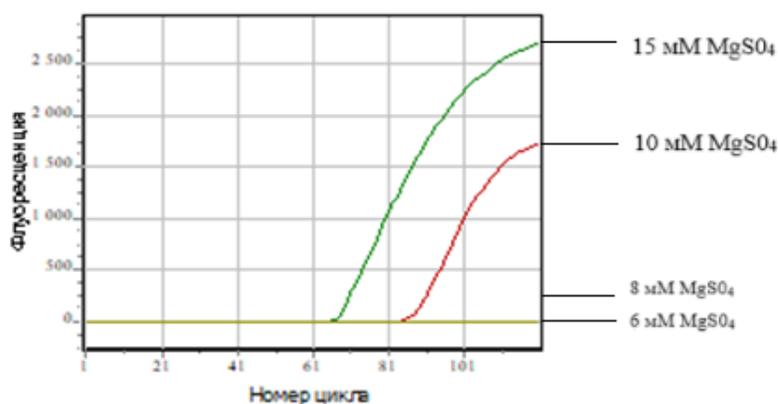


Рисунок 8 – Подбор оптимальной концентрации сульфата магния для постановки петлевой изотермической амплификации для детекции и идентификации бактерий вида *A. hydrophila*

Произведен подбор оптимальной концентрации MBst- полимеразы. Для этого к реакционной смеси с подобранными концентрациями компонентов были внесены следующие концентрации фермента: 2, 4, 6 и 8 единиц на одну реакцию. Было установлено, что при количестве MBst- полимеразы 2 единицы не было результатов амплификации, а при концентрации 4, 6 и 8 единиц были выявлены аналоги пороговых чисел циклов при начале реакции. Следовательно, для постановки реакции в дальнейших исследованиях для постановки петлевой изотермической реакции будет использован фермент в количестве 4 единицы на одну реакцию.

Для детекции результатов амплификации так же используется метод обнаружения амплификации путем высвобождения гасящей реакции (DARQ-detection of amplification by release of quenching). В методе DARQ использовался частично двуцепочечный линейный ДНК-зонд. Зонд разработан путем

маркировки гасителя на 5' конце FIP и добавления дополнительного 3'-флуорофор-меченого зонда, который комплементарен F1c FIP. Принцип основан на том, что в отсутствии целевой ДНК флуоресцентный сигнал от двуцепочечного линейного ДНК-зонда не генерируется. Во время амплификации LAMP вновь синтезированная цепь ДНК вытесняет 3'-флуорофор-меченый зонд, чтобы высвободить флуоресцентный сигнал. Для достижения этой цели был подобран зонд для детекции и идентификации *A. hydrophila*, который представлен в таблице 8.

Таблица 8 – Зонд для создания протокола для детекции и идентификации бактерий *A. hydrophila* методом петлевой изотермической реакции в режиме «реального времени» (RT-LAMP) по каналу Rox

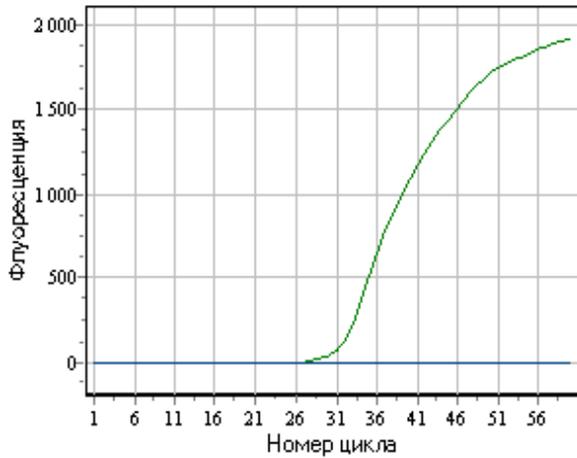
Зонды для детекции <i>A. hydrophila</i>	Q-Rox-5'- CGCGACCGCACCCACTTT GTATTTCGGGAGCGGCAAC -3'
	Fd:5'-CTGCCGTCCCCGCCTTTGA-BHQ1-3'

Сначала дуплекс зонда-гасителя, QPD, гибридизовали путем инкубации последовательностей в концентрации 8 мМ каждого из данных праймеров при 95 °С в течение 5 мин в тепловом блоке и последующего медленного охлаждения до комнатной температуры (RT). Затем были определены температуры плавления дуплекса зонда-гасителя в концентрациях 4 мМ, 8 мМ, 16мМ. Для этого изучаемые концентрации дуплекса были добавлены к 20 мкл буфера для изотермической амплификации и была поставлена реакция для определения «кривой плавления». В результате эксперимента было установлено, что в концентрации 4 мМ температура плавления зонда была ниже, чем оптимальная температура самой реакции амплификации и составила 57,6⁰С. Наиболее стабильный результат при изучении «кривой плавления» был

выявлен при количестве зонда 16 мМ. Следовательно, в дальнейших исследованиях будет использована концентрация 16 мМ.

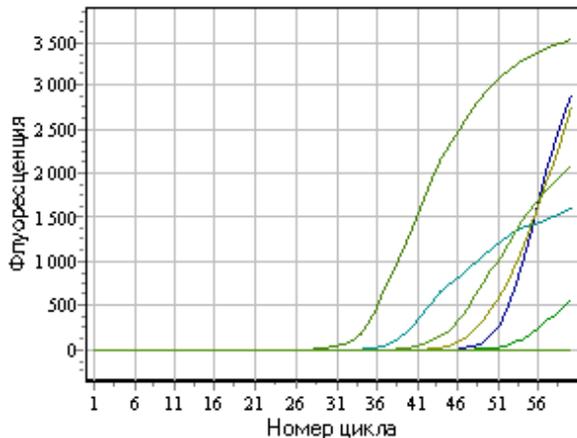
Для изучения специфичности был использован следующий протокол постановки реакции: FIP 1,6 мМ, QPD- Cy5 1,6 мМ, VIP 3,2 мМ, F3 и B3 1 мМ каждого, смесь дезоксинуклеотидов (dNTP) (10 мМ) с концентрацией 1,5 мМ каждого, 1x буфер, сульфат магния (200мМ) - 15 мМ, MBst- полимеразы - 4 ед., 5 мкл ДНК-матрицы. Объем доводили до 20 мкл деионизированной водой. Амплификацию приводили при 63 °С в течение 60 циклов, длительность каждого цикла составлял 50 секунд. Флуоресцентный сигнал снимали после каждого цикла по каналу Rox. Для определения специфичности реакции для *A. hydrophila* использовали ДНК бактерий: *A. veronii* ATCC 9071, *A. caviae* ATCC 15468, *A. salmonicida* ATCC 33658, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Pseudomonas fluorescens* B-1138, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Yersinia ruckeri* 46-123, *Flavobacterium* sp. 2, *Proteus mirabilis* 5, *Acinetobacter calcoaceticus* B-5971, *Alcaligenes* sp. B-5269, *Escherichia coli* K12. В результате серии экспериментов была установлена специфичность данного протокола (Рисунок 9).

Последним этапом исследования было выполнено определение чувствительности разработанного протокола. Для этого было выполнено выделение ДНК *A. hydrophila* ATCC 49140 после 24 часов культивирования при 30 °С на LB-бульоне по Lennox. Параллельно было установлено, что концентрация бактерий составляла $2,72 \cdot 10^8$ КОЕ на 1 мл. Было выполнено серийное десятикратное разведение ДНК и поставлена реакция по подобранным ранее параметрам.



Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ct, Rox	Результат
B1	K+	31,4	+
B2	<i>A. veronii</i>		-
B3	<i>A. salmonicida</i>		-
B4	<i>St. aureus</i>		-
B5	<i>Alcaligenes spp</i>		-
B6	<i>V. parahaemolyticus</i>		-
B7	<i>Y. enterocolitica</i>		-
B8	<i>Flavobacterium sp.</i>		-
B9	<i>P. mirabilis</i>		-
B10	<i>P. fluorescens</i>		-
B11	<i>Y. ruckeri</i>		-
B12	<i>A. calcoaceticus</i>		-
C1	<i>E. faecalis</i>		-
C3	<i>E. coli K12</i>		-
C4	K-		-

Рисунок 9 – Изучение специфичности разработанного протокола для идентификации бактерий *A. hydrophila* методом петлевой изотермической амплификации (LAMP) с детекцией результата в режиме «реального времени» (канал Rox)



Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ct, Rox	Результат
A1	1:10 ¹⁰		-
A2	1:10 ⁹		-
A3	1:10 ⁸		-
A4	1:10 ⁷		-
A5	1:10 ⁶		+
A6	1:10 ⁵		+
A	1:10 ⁴		+
A8	1:10 ³		+
A9	1:10 ²		+
A10	1:10 ¹		+
A11	K-		-

Рисунок 10 – Изучение чувствительности праймерной системы для детекции и идентификации бактерии *A. hydrophila* методом петлевой изотермической амплификации (LAMP) с детекцией результата в режиме «реального времени»

В результате серии экспериментов установлена специфичность данного протокола для *A. hydrophila*. Чувствительность реакции составила $2,72 \times 10^2$ бактериальных генома на одну реакцию (Рисунок 10).

Установлено, что время детекции бактерий *A. hydrophila* методом RT-LAMP составляет 50 минут.

2.2.4. Разработка комплексной тест-системы для выделения и идентификации *A. hydrophila*

В результате проведённой работы была сконструирована комплексная тест-система для выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila*, основанная на бактериологических и молекулярно-генетических методах, включающая 2 этапа (Рисунок 11):

- этап – пробоподготовка – 1 миллилитр или 1 грамм исследуемого образца помещается в стерильные пробирки для сбора материала согласно МУК 4.2.1884-04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов». Патологический материал с клиническими аэромоназа обрабатывается стерильным ватным тампоном, который помещается в физиологическом раствор (срок хранения: 24 часа при $t = +30^{\circ}\text{C}$);

2 этап – идентификация, основанная на различных методологических приемах, выбор которых зависит от исследуемого субстрата:

А) выделение бактерий *A. hydrophila* из объектов внешней среды с применением комбинированного метода – бактериологического компонента тест-системы (первичный посев на среду накопления А.V.1-УлГАУ (параметры культивирования: 24 часа при $t = 30^{\circ}\text{C}$), вторичный посев на дифференциально-диагностическую среду BSIBG-агар (параметры культивирования: 24 часа при $t = 30^{\circ}\text{C}$). Для получения чистой культуры схожие по морфологии колонии культивируют на LB-агаре с 10 % ксилозы и

0,08 % бромтимолового синего (параметры культивирования: 24 часа при $t = 30^{\circ}\text{C}$).

Для определения видовой принадлежности изолята производится изучение биохимических свойств бактерий.

В качестве альтернативного (дополнительного) варианта идентификации используется молекулярно-генетический компонент. После культивирования на среде накопления предлагается использовать разработанную ПЦР-систему для выявления и идентификации *A. hydrophila* в режиме «реального времени».

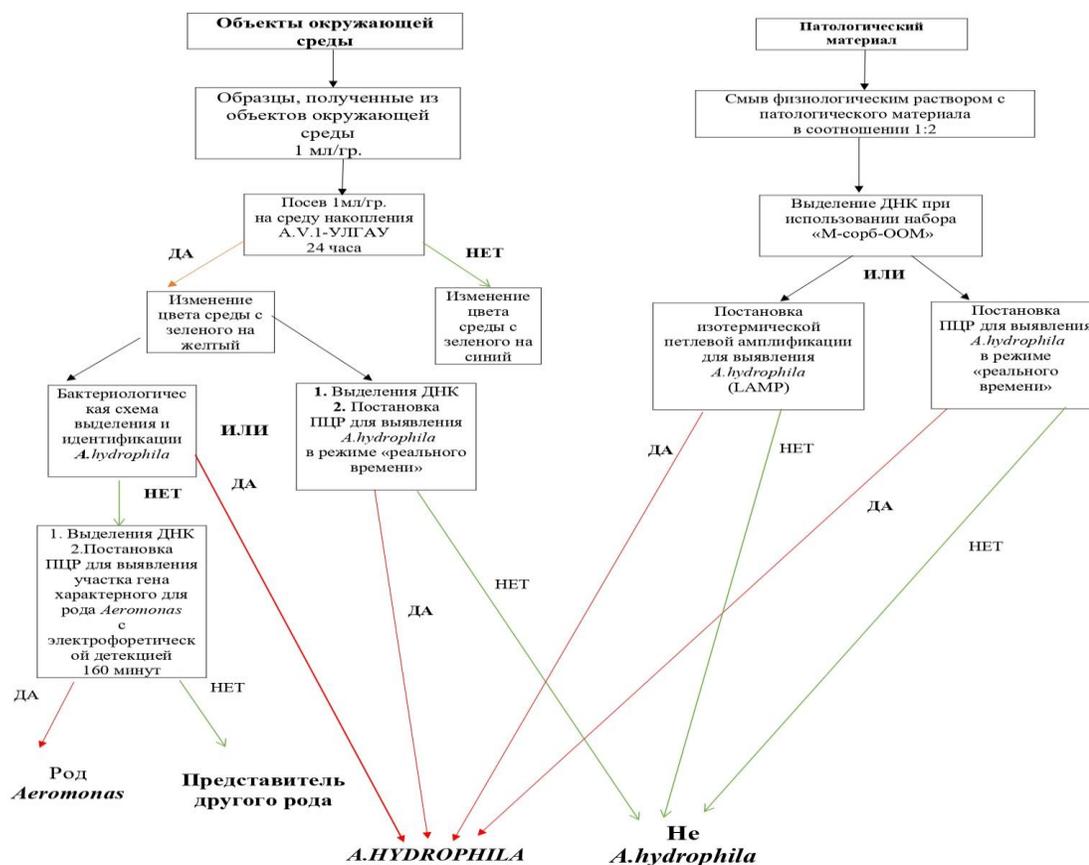


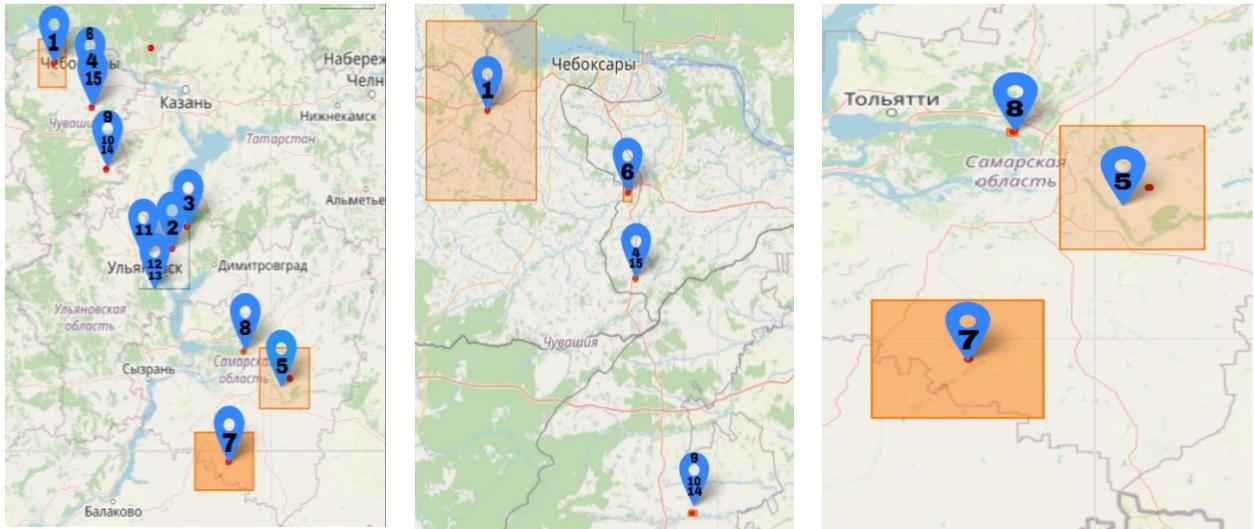
Рисунок 11– Модификации схемы выделения и идентификации штаммов *A. hydrophila* из образцов окружающей среды и патологического материала с признаками аэромоноза

Для выявления и идентификации бактерий *A. hydrophila* в патологическом материале (пробы рыбы) предлагается использовать метод LAMP с детекцией результата амплификации как в режиме «реального времени» методом DARQ. Для этого первым этапом производится забор патологического материала с признаками аэромоноза при помощи стерильного ватного тампона, затем он помещается в физиологическом раствор, на котором образец можно хранить в течение 24 часов. Затем производится выделение ДНК при использовании набора для выделения геномной ДНК из бактериальных клеток, достигается к ее максимальная концентрация после выделения. Следующим этапом производится подготовка реакционной смеси для петлевой изотермической амплификации, и выполняется ее постановка в термоцикле при $t=63\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 60 циклов, по 50 секунд каждый. Возможно также использование вместо протокола RT-LAMP ПЦР-системы для выявления изучаемого инфекционного агента.

2.2.5. Апробация разработанной схемы выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila*

Испытание комплексной тест-системы для выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila* было проведено на 91 пробе объектов санитарного надзора. Результаты исследований позволили сформировать коллекцию из 15 полевых изолятов, 10 из которых были идентифицированы как *A. hydrophila*, 5 – были отнесены к роду *Aeromonas* spp. (Рисунок 12, Таблица 9).

У всех выделенных штаммов был детектирован участок гена *gylB*, характерный для бактерий данного рода (Рисунок 13). Только штаммы *A. hydrophila* дали положительную реакцию на при типизации при помощи подобранных праймеров для детекции и идентификации бактерий методами ПЦР-РВ (Рисунок 14) и петлевой изотермической реакцией (LAMP).

Рисунок 12 – Источники выделение штаммов *Aeromonas*Таблица 9 – Источники выделение штаммов *Aeromonas*

№	Штамм	Место выделения
1.	<i>Aeromonas hydrophila</i> 11	пруд Сюткюль, Моргаушский муниципальный округ, Чувашская Республика, 2023 год
2.	<i>Aeromonas hydrophila</i> 12	озеро Большое, Чердаклинский район, Ульяновская область, 2023 год
3.	<i>Aeromonas hydrophila</i> 13	Красная река Старомайинский район, Ульяновская область, 2023 год
4.	<i>Aeromonas hydrophila</i> 14	пруд, д. Малая Андреевка, Чувашская Республика, 2023 год
5.	<i>Aeromonas hydrophila</i> 15	Михайловские пруды, Кинельский район, Самарская область, 2023 год
6.	<i>Aeromonas hydrophila</i> 16	пруд Кортик, Цивильский муниципальный округ, п. Молодежный, Республика Чувашия, 2023 год
7.	<i>Aeromonas hydrophila</i> 17	пруд, Пестравский район Самарской области, недалеко от села Тростянь, 2023 год
8.	<i>Aeromonas hydrophila</i> 18	пруд, Волжский район, Самарская область, недалеко от с. Сухая Вязовка, 2023 год
9.	<i>Aeromonas hydrophila</i> pA	каarp, пруд, с. Новое Ахпердино Батыревский район, Республика Чувашия, 2022 год
10.	<i>Aeromonas hydrophila</i> A1	каarp, пруд, с. Новое Ахпердино Батыревский район, Чувашская республика, 2022 год
11.	<i>Aeromonas bestiarium</i> ЧР	Черное озеро, Засвияжский район, Ульяновск, Ульяновская область, 2023 год
12.	<i>Aeromonas sp.</i> АК	Озеро Атца, Сенгилеевский район, Ульяновская область, 2022 год
13.	<i>Aeromonas sp.</i> АМ	Озеро Атца, Сенгилеевский район, Ульяновская область, 2022 год
14.	<i>Aeromonas sp.</i> 2ВН	каarp, пруд, с. Новое Ахпердино Батыревский район, Чувашская Республика, 2022 год
15.	<i>Aeromonas sp.</i> M1	Пруд д. Малая Андреевка 2 Чувашская Республика, 2022 год

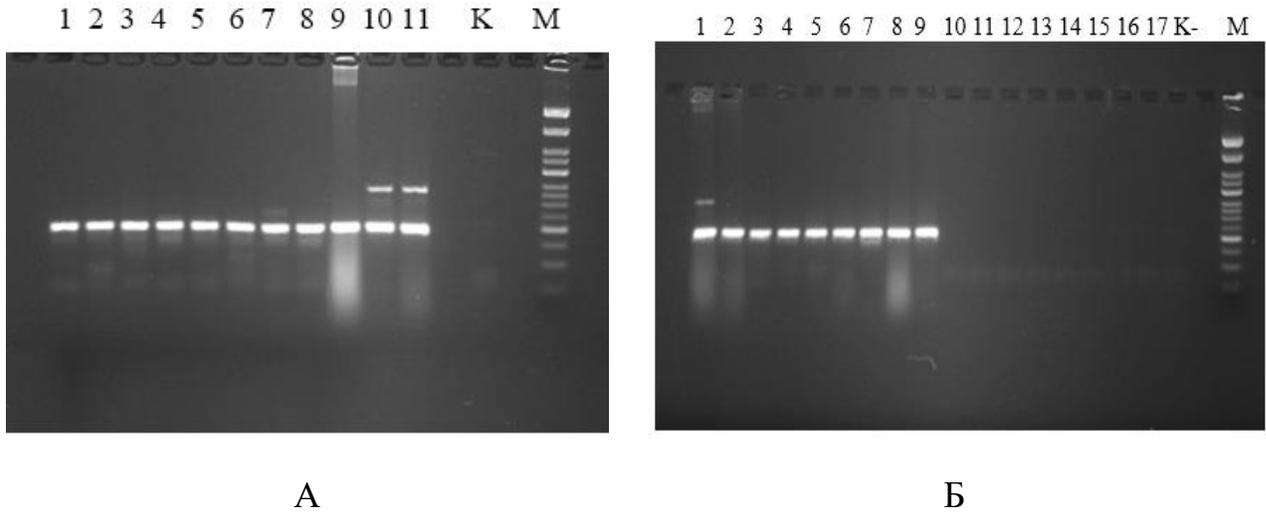
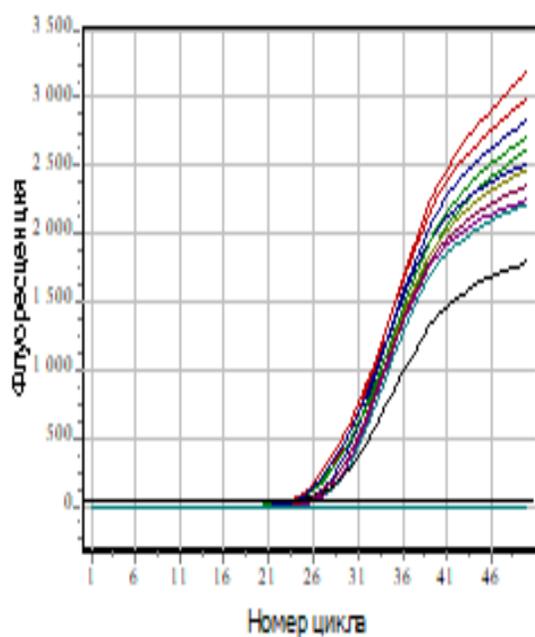


Рисунок 13 – Результат амплификации фрагмента гена субъединицы ДНК-гиразы В (*gyrB*), характерного для представителей рода *Aeromonas*: А. 1.*A.hydrophila* 11, 2. *A.hydrophila* 12, 3. *A.hydrophila* 13, 4. *A.hydrophila* 14, 5. *A.hydrophila* 15, 6. *A.hydrophila* 16, 7. *A.hydrophila* 17, 8. *A.hydrophila* 18, 9. *A.hydrophila* A1, 10. *A.hydrophila* pA, 11. *A.hydrophila* ATCC 49140. Б. 1. *A.hydrophila* ATCC 49140, 2. *A.caviae* ATCC 15468, 3. *A.veronii* ATCC 9071, 4. *A. salmonicida* ATCC 33658, 5. *Aeromonas bestiarium* ЧР, 6. *Aeromonas* sp. АК, 7. *Aeromonas* sp. AM, 8. *Aeromonas* sp. 2BH, 9. *Aeromonas* sp. M1. 10. *S. aureus* ATCC 6538, 11. *E. faecalis* ATCC 29212, 12. *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, 13. *Pseudomonas fluorescens* B-1138, 14. *Y. enterocolitica* ATCC 23715, 15. *Yersinia ruckeri* 46-123, 16. *Flavobacterium* sp.-2, 17. *Acinetobacter calcoaceticus* B-5971, «К-» - отрицательный контроль, М-маркер



Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ct, Fam	Результат
A1	A.h.11	23,3	+
A2	A.h.12	23,7	+
A3	A.h.13	24,9	+
A4	A.h.14	25,3	+
A5	A.h.15	25,7	+
A6	A.h.16	25,8	+
A7	A.h.17	24,6	+
B1	A.h.18	23,3	+
B2	A.h.A1	23,7	+
B3	A.h.pA	23,8	+
B4	K+	24,0	+
B5	K-		-

Рисунок 14 – Изучение эффективности тест-системы на основе метода полимеразной цепной реакции с детекцией результата в «режиме реального времени» для детекции и идентификации бактерий *A. hydrophila*

На следующем этапе исследований было установлено, что в геноме всех штаммов *A. hydrophila*, *Aeromonas sp.* ЧР, *Aeromonas sp.* 2ВН, *Aeromonas sp.* М1 есть фрагмент гена фланкируемый праймерной системой детектирующей аэролизин, характерный для выделенной филогенетической группы аэромонад.

Это было установлено при помощи праймеров: F- GATGGCGATGGCTGGGTGAT, R- TGGCGATCAGACTGGGTСАС. Определено, что все исследуемые штаммы характеризуются наличием данного участка гена. При помощи праймерной системы для идентификации бактерий *Aeromonas bestiarium*, что *Aeromonas sp.* ЧР относится к данному виду (Рисунок 15). Используемые в эксперименте праймеры указаны в таблице 10.

Таблица 10 – Разработанные системы праймеров для идентификации бактерий рода *Aeromonas*

Название бактерии	Целевой ген	Праймеры	Длина продукта
<i>A. bestiarium</i>	<i>zipA</i>	Прямой праймер CATAACGGGCCTGCTTGATTC	92 п.н.
		Обратный праймер CCTGGTCGAACCGGCTTATG	

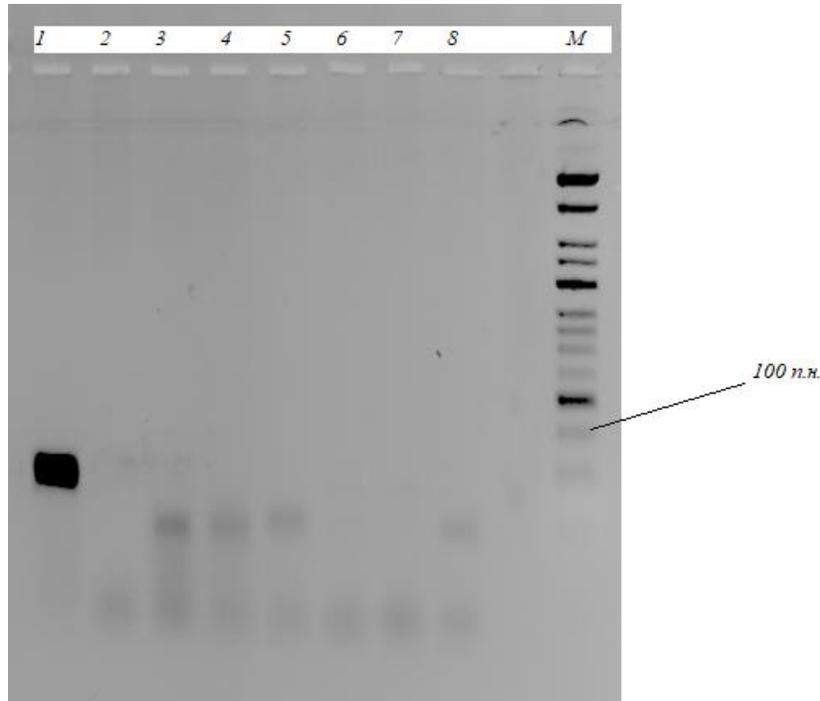


Рисунок 15 – Результат электрофорезирования продукта амплификации видоспецифичной праймерной для детекции бактерий вида *A. bestiarium*
 Расположение проб : 1. *A. bestiarium* ЧР, 2. *A. hydrophila* ATCC 49140,
 3. *A. veronii* ATCC 9071, 4. *A. caviae* ATCC 15468, 5. *A. hydrophila* A1, 6.
A. hydrophila pA, 7. *Aeromonas sp* M1, 8 - Отрицательный котроль, М - маркер

Микроскопия окрашенных по методу Грама бактериологических мазков, приготовленных из выделенных изолятов, как и *A. hydrophila* ATCC 49140, это грамотрицательные подвижные палочки, располагающиеся в мазках единично или парами. Данные штаммы бактерий способны к росту на LB-бульоне по

Lennox, при культивировании в присутствии 3% хлорида натрия при 30 °С через 24 часа культивирования также сохраняли ростовые характеристики, при тех же условиях культивирования, но при 5% хлорида натрия рост изолятов отсутствовал.

В результате исследований установлено, что все выделенные штаммы - это грамотрицательные, каталазо- и оксидазоположительные палочки, располагающиеся в окрашенных бактериологических мазках парами. Изоляты *A. hydrophila* были способны декарбоксиллировать лизин и аргинин, продуцировать ДНКазу и желатиназу, ферментировать глюкозу, мальтозу, маннит, сахарозу, арабинозу, трегалозу и галактозу. Они характеризовались положительной реакцией Фогеса-Проскауэра и гемолитической активностью, продуцировали фосфатазу, эскулин, N-ацетил- β -D-глюкозаминидазу, β -глюкозидазу, γ -глутамилтрансферазу, β -галактозидазу.

Все исследуемые штаммы не обладали следующими свойствами: способностью к росту при 5% NaCl и 320 мг/л теллурита калия, декарбоксиллировать орнитин, продуцировать уреазу, α - галактозидазу, способностью к утилизации малоната и цитрата на среде Кристенсена, ферментации рамнозы, сорбита, ксилозы. Вариабельная реакция был установлена у штаммов на ферментацию лактозы и салицина, утилизацию цитрата.

Результаты исследований представлены в таблицах 11-12.

Таблица 11 – Биологическая характеристика выделенных изолятов *A. hydrophila*

	Свойство	<i>Aeromonas N=10</i>										
		<i>A. hydrophila</i> 11	<i>A. hydrophila</i> 12	<i>A. hydrophila</i> 13	<i>A. hydrophila</i> 14	<i>A. hydrophila</i> 15	<i>A. hydrophila</i> 16	<i>A. hydrophila</i> 17	<i>A. hydrophila</i> 18	<i>A. hydrophila</i> pA	<i>A. hydrophila</i> AI	«%» + реакция
1.	Окраска по Граму	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0
2.	Подвижность	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
3.	Оксидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
	Рост при											
4.	20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
5.	30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
6.	42°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
7.	Рост при 3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
8.	Рост при 5% NaCl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0
9.	Реакция Фогеса-Проскауэра	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
10.	Продукция нитратов	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
11.	Образование пигмента	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0
12.	Ацетат	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0
13.	Индол	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
14.	Среда Симмонса на цитрат	–	+	–	–	–	–	–	–	+	–	20
15.	Уреазный агар Кристесена	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0
16.	ДНКаза	+	–	+	–	–	–	–	+	+	+	100
17.	Желатиназа	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
18.	О/Ф глюкозы	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
19.	Лактоза	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	20
20.	Мальтоза	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	100
21.	Маннит	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	100
22.	Рамноза	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0
23.	Сорбит	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	0
24.	Салицин	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	20
25.	Ксилоза	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	0
26.	Сахароза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
27.	Арабиноза	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	100
28.	Лизиндекарбоксилаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
29.	Аргениндекарбоксилаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100

Примечание – «+»- положительная реакция, «-»- отрицательная реакция.

Таблица 12 – Биологическая характеристика выделенных изолятов *A. hydrophila*

	Свойство	<i>Aeromonas N=10</i>										
		<i>A. hydrophila</i> 11	<i>A. hydrophila</i> 12	<i>A. hydrophila</i> 13	<i>A. hydrophila</i> 14	<i>A. hydrophila</i> 15	<i>A. hydrophila</i> 16	<i>A. hydrophila</i> 17	<i>A. hydrophila</i> 18	<i>A. hydrophila</i> pA	<i>A. hydrophila</i> AI	«%» + реакции
30.	Орнитиндекабоксилаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
31.	β-гемолиз	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
32.	DL-лактат	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
	2-кетоглюконат											
33.	Фенилаланин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
34.	Ацетамид	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	0
35.	β-глюкозидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
36.	N - ацетил - β- D-глюкозаминидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
37.	Трегалоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
38.	α- галактозидаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
39.	β- галактозидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
40.	Малонат	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
41.	Галактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
42.	Целлобиоза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
43.	γ-глютаминилтрансфераза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
44.	Фосфатаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
45.	Эскулин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
46.	Сукцинат натрия	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
47.	Глутамат натрия	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
48.	Пролин -L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
49.	β- Аланин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
50.	L-метионин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
51.	LB-агар с 320 мг/л теллурида калия	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

Примечание – «+» положительная реакция, «-» отрицательная реакция.

Нетипированным штаммам бактерий тоже была дана биологическая характеристика, данные изоляты характеризовались физиолого-биохимическими свойствами, которые позволяют отнести их к роду *Aeromonas* (Рисунок 16-18).

Штамм *A. bestiarium* ЧР, как и штамм *Aeromonas* sp.2ВН, проявил свойства схожие с бактериями *A. hydrophila*. Однако оба этих штамма, как было установлено, не утилизируют DL-лактата, а *Aeromonas* sp.2ВН, в отличие от представителей рода, ферментировал сорбит. Отличительным свойством штамма *Aeromona* sp М1 является отсутствие способности накапливать ацетоин (реакция Фогеса-Проскауэра), продукция ацетамида и β -галактозидазы, эскулина. Только два штамма *Aeromonas* sp. АК и *Aeromonas* sp. АМ не обладали гемолитической активностью, не продуцировали 2-кетоглюконат, при этом выявлена положительная реакция при ферментации лактозы у *Aeromonas* sp. АМ. Результаты исследований представлены в таблице 13.

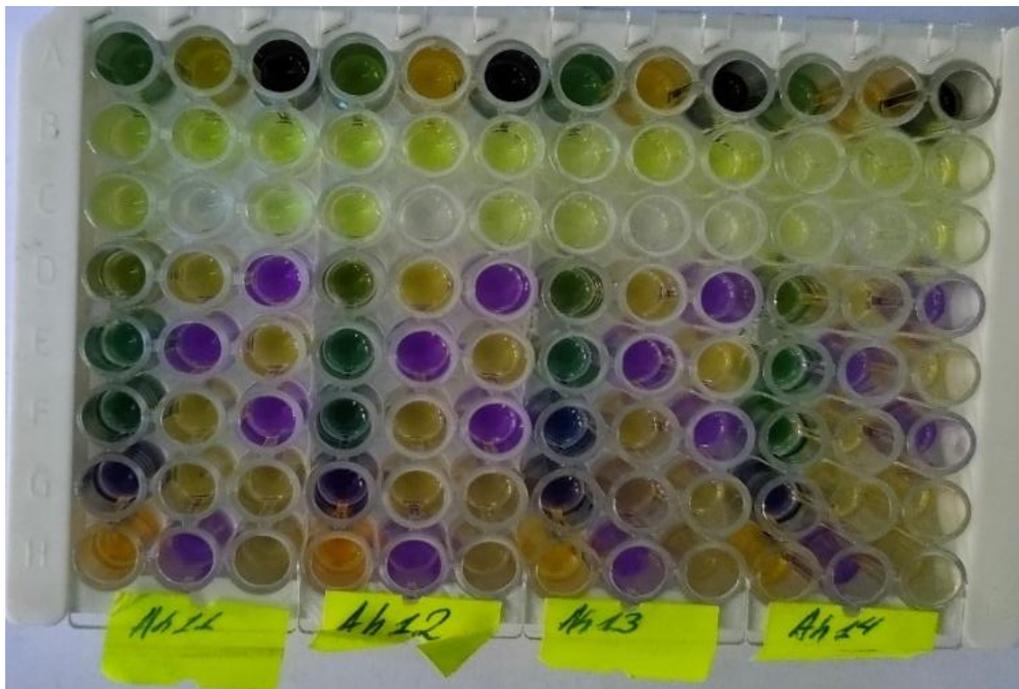


Рисунок 16 – Изучение биохимических свойств штаммов *A. hydrophila* 11, *A. hydrophila* 12, *A. hydrophila* 13, *A. hydrophila* 14 при использовании НЕФЕРМтест 24 (через 24 часа при температуре культивирования 30 °С)



Рисунок 17 – Изучение способности штаммов бактерий *Aeromonas* sp.2BH и *Aeromonas* sp.AM утилизировать сорбит (через 24 часа при температуре культивирования 30 °С)

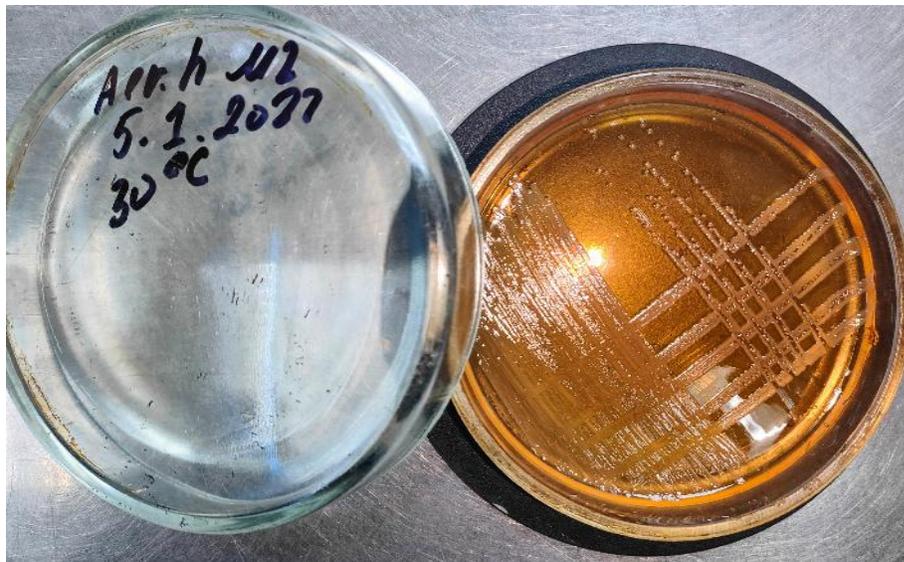


Рисунок 18 – Рост штамма *Aeromonas* sp. M1 на агаре BSIBG (через 24 часа при температуре культивирования 30 °С)

Таблица 13 – Биологические свойства выделенных штаммов бактерий рода *Aeromonas*

№	Свойство	<i>A. bestiarium</i> ЦР	<i>Aeromonas</i> sp. М1	<i>Aeromonas</i> sp. АК	<i>Aeromonas</i> sp. АМ	<i>Aeromonas</i> sp. 2ВН
1.	Окраска по Граму	–	–	–	–	–
2.	Подвижность	+	+	+	+	+
3.	Оксидаза	+	+	+	+	+
4.	Фогеса-Проскауэра	+	–	–	–	+
5.	Рост при 3% NaCl	+	+	+	+	+
6.	Рост при 5% NaCl	–	–	–	–	–
7.	Продукция нитратов	+	+	+	+	+
8.	Образование пигмента	–	–	–	–	–
9.	Ацетат	–	–	–	–	–
10.	Индол	+	+	+	+	+
11.	Среда Симмонса на цитрат	+	+	+	+	+
12.	Среда Кристенсена на цитрат	–	–	–	–	–
13.	Уреазный агар Кристенсена	–	–	–	–	–
14.	ДНКаза	+	+	+	+	+
15.	Желатиназа	+	+	+	+	+
16.	Глюкоза	+	+	+	+	+
17.	Лактоза	–	–	–	+	–
18.	Мальтоза	+	+	+	+	+
19.	Маннитол	+	+	+	+	+
20.	Рамноза	–	–	–	–	–
21.	Сорбит	–	–	–	+	+
22.	Салицин	+	–	–	–	+
23.	Ксилроза	–	–	–	–	–
24.	Сахароза	+	+	+	+	+
25.	Арабиноза	+	+	–	–	+
26.	Лизиндекорбоксилаза	+	+	–	–	+
27.	Аргениндекорбоксилаза	+	+	+	+	+
28.	Орнитиндекорбоксилаза	–	–	–	–	–
29.	20°C	+	+	+	+	+
30.	30°C	+	+	+	+	+
31.	35°C	+	+	+	+	+
32.	42°C	+	+	+	+	+
33.	β-гемоллиз	+	+	–	–	+
34.	DL-лактат	–	+	+	–	–
35.	2-кетоглюконат	+	+	–	–	+
36.	фенилаланин	+	+	+	+	+
37.	Ацетамид	–	–	–	–	–
38.	β-глюкозидаза	+	–	+	+	+
39.	N - ацетил - β- D- глюкозаминидаза	+	+	+	+	+
40.	Трегалоза	+	+	+	+	+
41.	α- галактозидаза	–	–	–	–	–
42.	β- галактозидаза	+	+	+	+	+
43.	Малонат	–	–	–	–	–
44.	Галактоза	+	+	+	+	+
45.	Целлобиоза	–	–	+	+	+
46.	γ-глутамилтрансфераза	+	+	–	+	+
47.	Фосфатаза	+	+	–	+	–
48.	Эскулин	+	–	+	+	+
49.	Сукцинат натрия	+	+	+	+	+
50.	Глутамат натрия	+	+	+	+	+
51.	Пролин -L	+	+	+	+	+
52.	β- Аланин	+	+	+	+	+
53.	L-метионин	+	+	+	+	+
54.	LB-агар с 320 мг/л теллурида калия	–	–	–	–	–

Примечание – «+» положительная реакция, «–» отрицательная реакция.

2.2.6. Изучение антибиотикорезистентности выделенных бактериальных ИЗОЛЯТОВ

Следующим этапом исследования было определение устойчивости выделенных штаммов к антибактериальным препаратам. В качестве контроля был использован референс-штамм *A. hydrophila* ATCC 49140. Результаты представлены на рисунках 19–25.

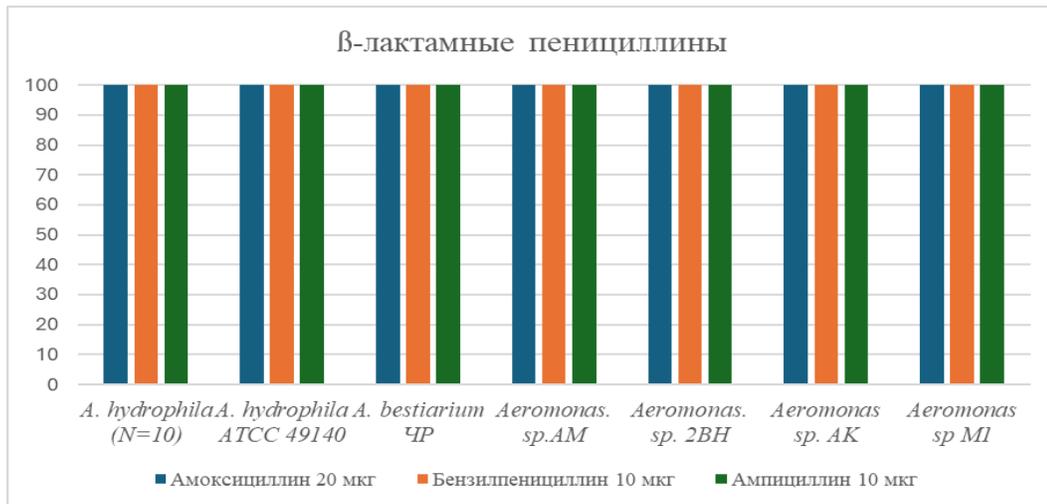


Рисунок 19 – Изучение устойчивости выделенных изолятов *Aeromonas* к β-лактамным пенициллинам

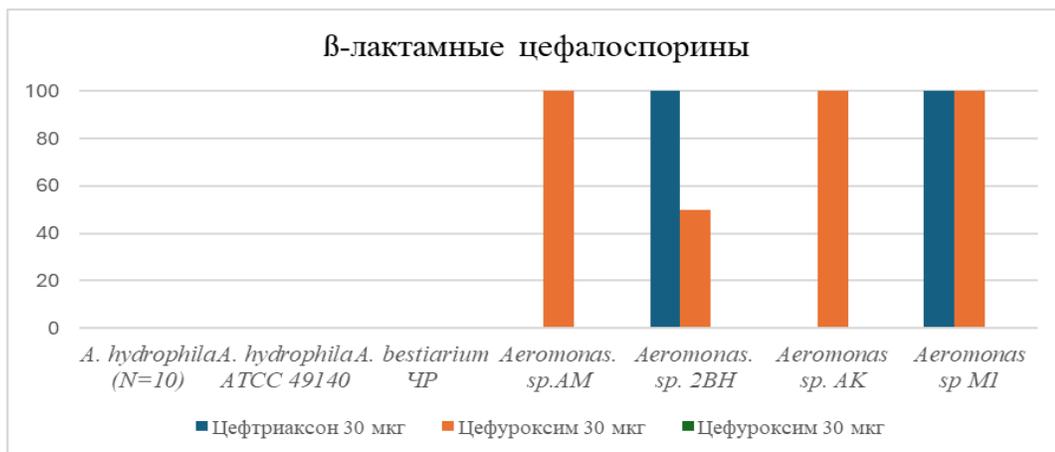


Рисунок 20 – Изучение устойчивости выделенных изолятов *Aeromonas* к β-лактамным цефалоспорином

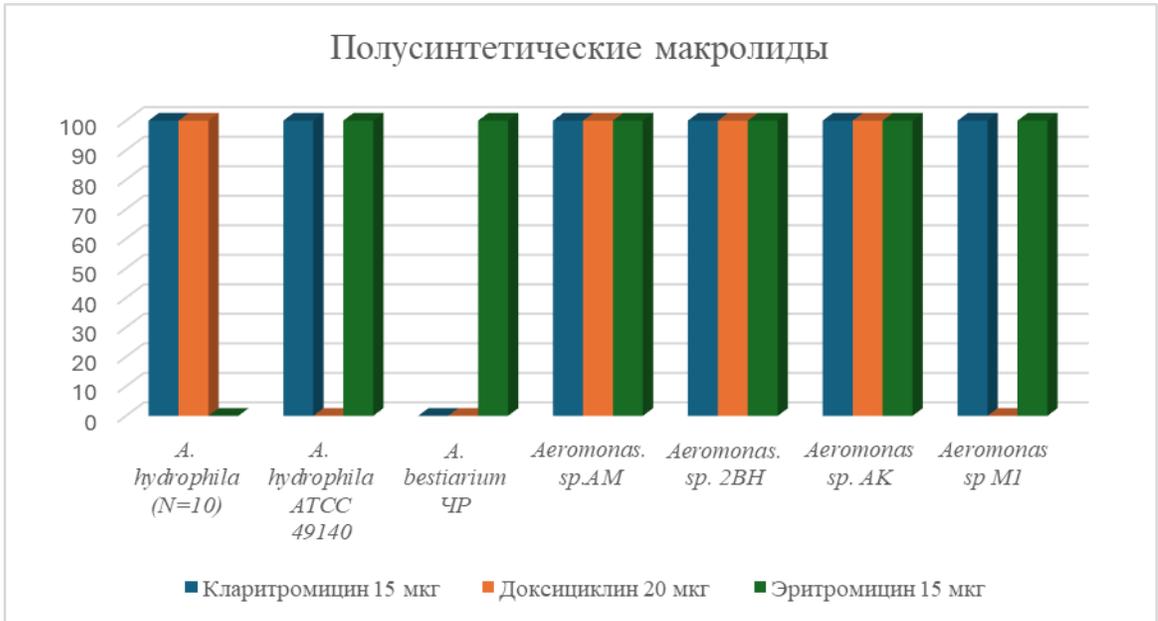


Рисунок 21 – Изучение устойчивости выделенных изолятов *Aeromonas* к полусинтетическим макролидам

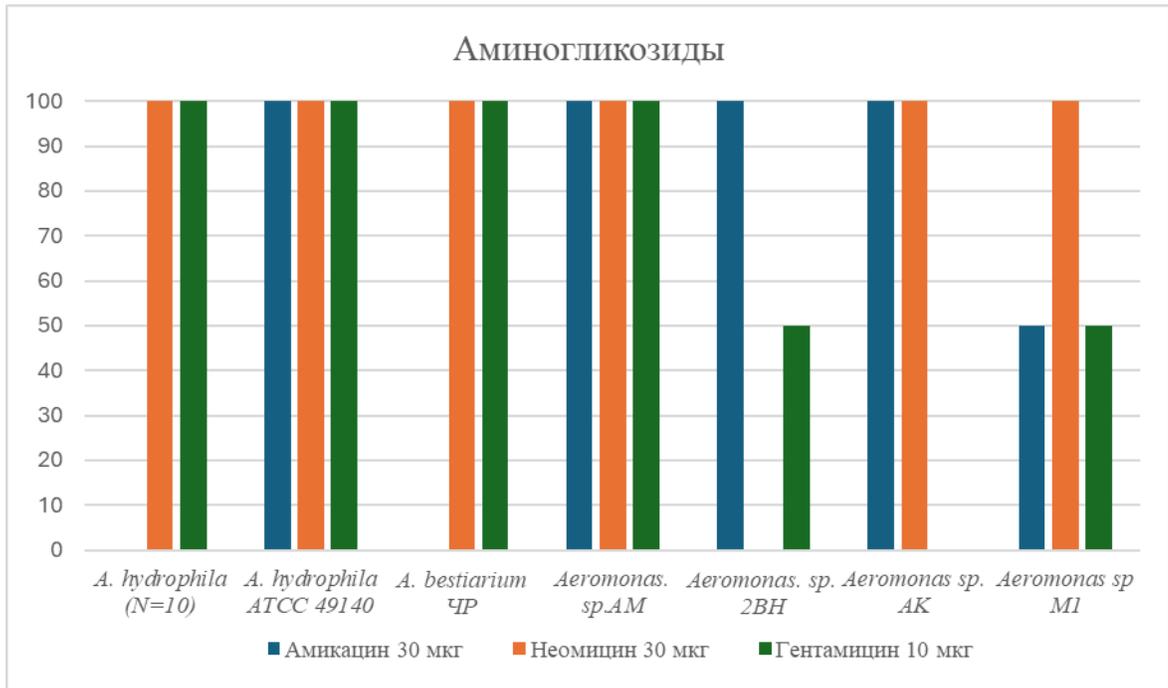


Рисунок 22 – Изучение устойчивости выделенных изолятов *Aeromonas* к аминогликозидам



Рисунок 23 – Изучение устойчивости выделенных изолятов *Aeromonas* к фторхинолонам

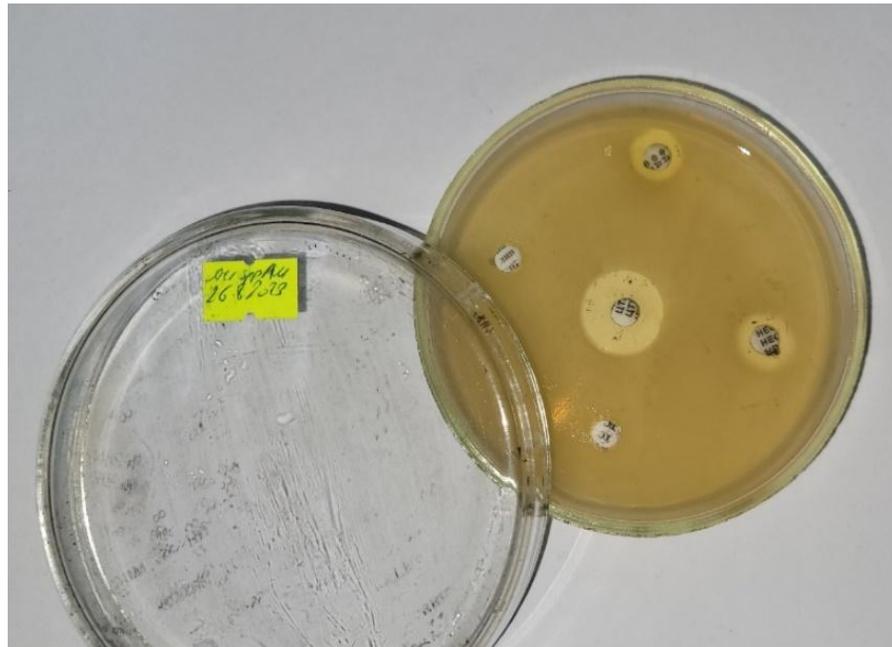


Рисунок 24 – Изучение устойчивости к антибактериальным препаратам (цефуроксиму, триметоприм/сульфаметоксазолу, линкомицину, фурадонин и неомицину) штамма *Aeromonas* sp. AM (через 24 часа при температуре культивирования 30 °C)

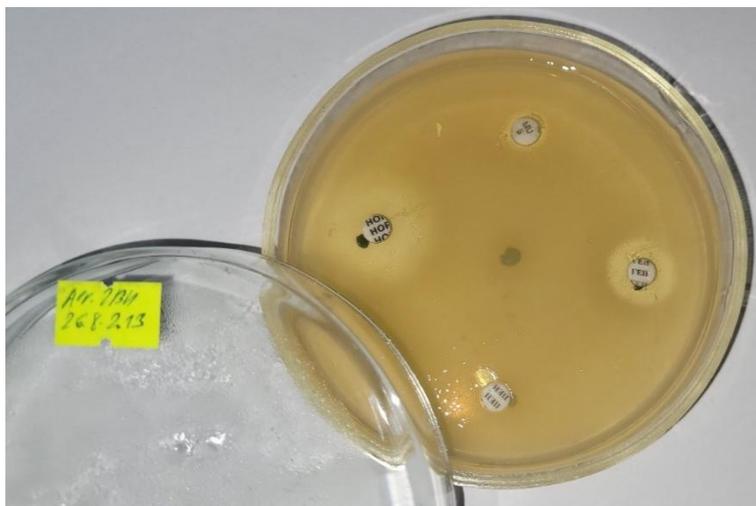


Рисунок 25 – Изучение устойчивости к антибактериальным препаратам (норфлоксацину, мупироцину, гентамицину, ампициллину,) штамма *Aeromonas* sp.2BH (через 24 часа при температуре культивирования 30 °C)

Установлено, что выделенные изоляты *Aeromonas* обладают резистентностью к β -лактамным пенициллинам, не устойчивы к мупироцину и эритромицину. Бактерии штаммов *A. hydrophila* и *A. bestiarum* чувствительны к β -лактамным цефалоспорином, к ряду фторхинолонов (лomeфлoксацину, норфлoксацину), при этом *Aeromonas*. sp. 2BH, *Aeromonas* sp M1 обладают устойчивости к этой группе антибиотиков. Штаммы проявили чувствительность к фторхинолонам (лomeфлoксацин и норфлoксацин), за исключением штамма *Aeromonas* sp AK. Все изученные штаммы обладали устойчивостью к аминогликозидам, линкозамидам и производные нитрофуранам.

Было установлено, что все исследуемые изоляты проявляли устойчивость к мупироцину и линкомицину, так же штаммы проявляли устойчивость к флуконазолу, за исключением изолята *Aeromonas* sp. AM, на который он оказывал угнетающее рост действие.

Штаммы *A. hydrophila* 11, *A. hydrophila* 12, *A. hydrophila* A1, *A. hydrophila* pA, *A. hydrophila* 14 и *Aeromonas* sp. M1 были чувствительны к триметоприм/сульфаметоксазолу. Стоит так же отметить, что штаммы *Aeromonas* sp. M1, *Aeromonas* sp. АК, *Aeromonas* sp. АМ и *Aeromonas* sp. 2ВН проявляли устойчивость к широкому спектру антимикробных веществ по сравнению с другими изолятами бактерий, изучаемыми в данном исследовании.

2.2.7. Факторы вирулентности выделенных штаммов *Aeromonas*

Существует потребность в практическом методе детекции у изолятов бактерий рода *Aeromonas* потенциальной вирулентности. Один из подходов к определению того, имеет ли данный микроорганизм потенциал быть вирулентным или нет, заключается в определении наличия факторов вирулентности. Поскольку вирулентность *Aeromonas*, несомненно, является многофакторной, метод ПЦР имеет ценность для характеристики этой характеристики у штаммов, выделенных из объектов окружающей среды и из патологического материала.

Для изучения генетических характеристик выделенных изолятов в качестве контролей были использованы штаммы: *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. salmonicida subsp. salmonicida* ATCC 33568, *A. caviae* ATCC 15468 и *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071, *A. bestiarum* ЧР. Для подтверждения родовой принадлежности изолятов применяли праймерные системы для детекции участков генов 16s рРНК.

В исследовании были использованы праймеры для детекции участков генов: гемолизина А (hlyA), аэролизина А (aerA), АДФ-рибозилирующего токсина (aehT), цитотоксического энтеротоксина (alt), структурных генов T3SS aopB и ascV, гена термостабильного цитотонического энтеротоксина (ast), участка гена, кодирующий белок субъединицы жгутика (fla), липазу (lip),

эластазу (*ela*), гены, кодирующие шига-токсин (*stx-1*) и систему секреция шестого типа (*vasH*).

Праймеры используемые в этом исследовании представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Праймерные системы для детекции участков генов бактерий рода *Aeromonas*

Целевой ген	Последовательности праймеров	Размер продукта (п.н.)	Ссылка
16s РНК	F:gcgaaagcgtggggagca R:gctccggaagccacgtctca	100	Это исследование
<i>gyrB</i>	F:ccagaacaagacccccgatcc R: gtcagcgcggtacggaaac	180	Это исследование
<i>hlyA</i> (гемолизин А)	F: ggccggtggcccgaagatacggg R: ggcggcgccggacgagacgggg	595	[327].
<i>aerA</i> (аэролизин А)	F:cctatggcctgagcgagaag R: ccagttccagtcccaccact	431	[112]
<i>aexT</i> (АДФ-рибозилтрансфераза токсин)	F: ggcgcttgggctctacac R: gagcccgcgcatcttcag	535	[347]
<i>Alt</i> (Цитотонический энтеротоксин)	F: aaagcgtctgacagcgaagt R: agcgcataggcgttctctt	320	[347]
<i>ascV</i>	F: atggacggcgccatgaagt R: tattcgcttcaccatccc	713	[347]
<i>aopB</i>	F: tccagcaagttcgctgttt R: cgccatgaaagcctcaaat	129	[138]
<i>Ast</i> (термостабильный цитотонический энтеротоксин)	F: atcgtcagegacagcttctt R: ctcatcccttggcttgtgt	504	[94]

Продолжение таблицы 14

Целевой ген	Последовательности праймеров	Размер продукта (п.н.)	Ссылка
<i>fla</i> (структурный ген флагеллин)	F: tccaaccgtytgacctc R: gmytggttgccgratggt	608	[327]
<i>Lip</i> (липаза)	F: atcttctccgactgggtcgg R: ccgtgccaggactgggtctt	383	[417]
<i>ela</i> (эластаза)	F: acacgggtcaaggagatcaac R: cgctggtggtggccagcagg	540	[222]
<i>stx-1</i> (шига-токсин)	F: ataaattgccattcgttgactac R: agaacgcccactgagatcatc	180	[36]
<i>vasH</i>	F: gctctagaccggtgaaccatcaag cgcgtccact R: tcccccggtggtggccagcag cagaggcaata	1,652	[36]

В результате серии экспериментов была дана характеристика штаммам бактерий по вышеназванным участкам генов. Полученные результаты приведены в таблице 15.

У всех штаммов *A. hydrophila*, кроме генов «домашнего хозяйства» и 16S рРНК, были выявлены гены, кодирующие такие факторы вирулентности, как *hlyA*, *aerA*, *ast*, *alt*, *fla*, *lip*, *ela*. Ни в одном из штаммов этого вида не были детектированы гены, кодирующие систему секреции III типа, *aexT* и *ascV*, как и участок гена *vasH*.

Однако стоит отметить, что в изоляте *A. hydrophila* A1 выявлен участок гена *stx-1*.

Таблица 15 – Молекулярно-генетическая характеристика штаммов рода *Aeromonas*

Ген	Штаммы									
	<i>A. hydrophila</i> N=10	<i>Aeromonas</i> sp. АК	<i>Aeromonas</i> sp. АМ	<i>Aeromonas</i> sp. 2ВН	<i>Aeromonas</i> sp. М1	<i>A. bestiarium</i> ЧР	<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33568	<i>A. caviae</i> ATCC 15468	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> ATCC 9071
<i>16s rRNA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>hlyA</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>aerA</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>aexT</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>aopB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>ascV</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>ast</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>alt</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>fla</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>lip</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>ela</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>stx-1</i>	- (90%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>vasH</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание – «+» положительная реакция, «-» отрицательная реакция.

У штаммов *Aeromonas* sp. 2ВН, *Aeromonas* sp. М1, *A. bestiarium* ЧР были выявлены гены, кодирующие гемолизин А (*hlyA*), аэролизин А (*aerA*) (Рисунок 26), цитотонический термолабильный энтеротоксин (*alt*), флагелин (*fla*), липазу (*lip*). В отличие от штаммов *A. hydrophila*, у указанных выше штаммов отсутствовал ген, кодирующий ген термостабильного цитотонического энтеротоксина (*ast*), у штамма *Aeromonas* sp. М1 не детектирован ген, кодирующий эластазу (*ela*).

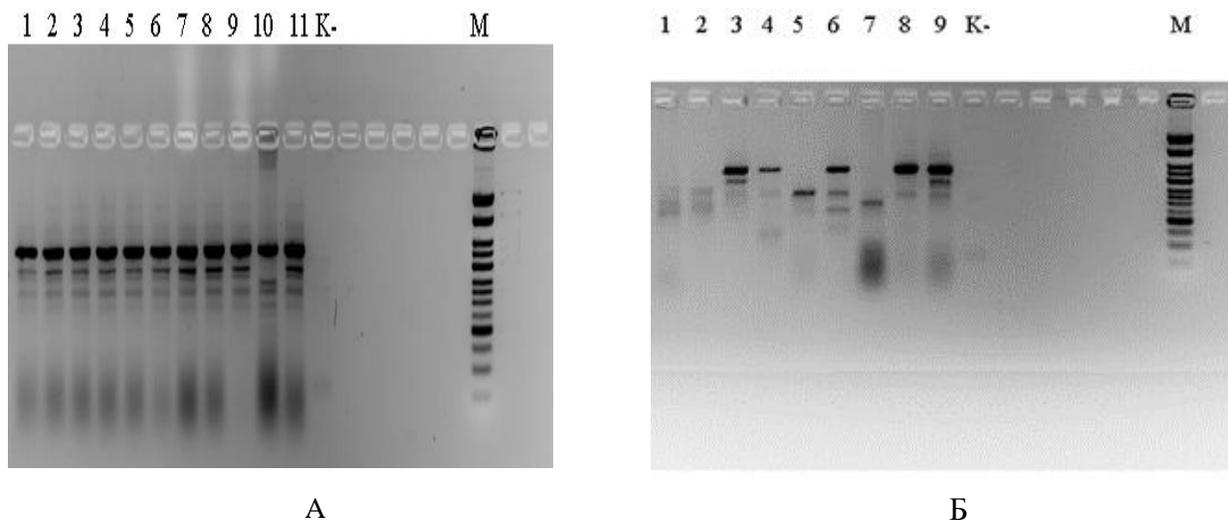


Рисунок 26 – Детекция гена аэролизина А (*aerA*) у бактерий вида *A. hydrophila* (А): 1. *A. hydrophila* 11, 2. *A. hydrophila* 12, 3. *A. hydrophila* 13, 4. *A. hydrophila* 14, 5. *A. hydrophila* 15, 6. *A. hydrophila* 16, 7. *A. hydrophila* 17, 8. *A. hydrophila* 18, 9. *A. hydrophila* А1, 10. *A. hydrophila* рА, 11. *A. hydrophila* ATCC 49140; у представителей рода *Aeromonas* (Б): 1. *Aeromonas* sp. АК, 2. *Aeromonas* sp. АМ, 3. *Aeromonas* sp. М1, 4. *Aeromonas* sp. 2ВН, 5. *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071, 6. *A. bestiarium* ЧР, 7. *A. caviae* ATCC 15468, 8. *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, 9. *A. hydrophila* ATCC 49140. «К-» - отрицательный контроль (вода), М – маркер.

В отличие от остальных исследуемых штаммов, у изолятов *Aeromonas* sp. АК и *Aeromonas* sp АМ были выявлены участки генов, кодирующих липазу (*lip*) и эластазу (*ela*). Ген, кодирующий участок субъединицы флагелина, был установлен только в первом из указанных штаммов (Рисунок 27). Других генов, кодирующих факторы вирулентности, у данного изолята не было выявлено.

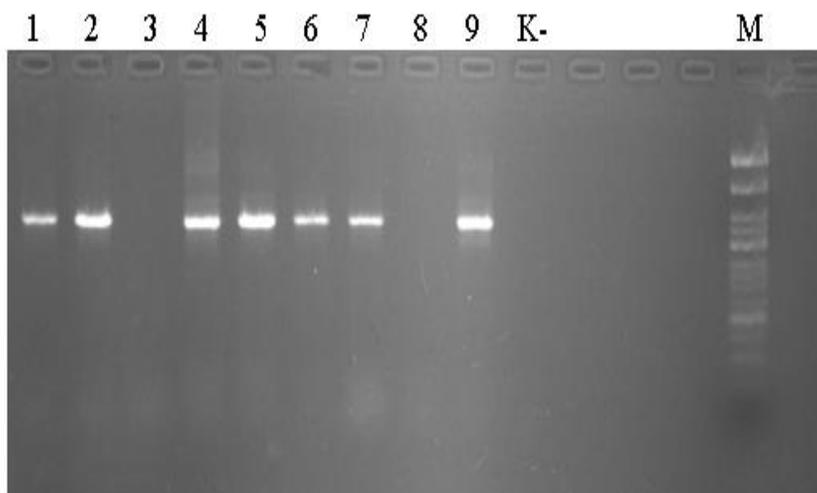


Рисунок 27 – Детекция гена, кодирующего флагелин (*fla*) у бактерий вида *A. hydrophila* (A): 1. *A. hydrophila* ATCC 49140, 2. *A. bestiarium* ЧР, 3. *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071, 4. *A. caviae* ATCC 15468, 5. *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, 6. *Aeromonas* sp. 2ВН, 7. *Aeromonas* sp. АК, 8. *Aeromonas* sp. АМ, 9. *Aeromonas* sp. М1, «К-» отрицательный контроль (вода), «М» маркер

Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что выделенные штаммы *A. hydrophila* характеризуются наличием основных генов, отвечающих за вирулентность *hlyA*, *aerA*, *ast*, *alt*, *fla*, *lip* и *ela*.

Так же стоит отметить тот факт, что у 86,67% выделенных штаммов, были выявлены гены *hlyA*, *aerA* и *alt*, им характерно наличие гемолитической, протеолитической и ДНКазной активностей.

Это может свидетельствовать о потенциальной опасности выделенных в ходе исследования изолятов, как для гидробионтов, так и для человека, и демонстрирует важность изучения факторов вирулентности у штаммов, циркулирующих во внешней среде.

2.2.8. Генотипирование выделенных изолятов *Aeromonas* spp. методами ERIC- и BOX-ПЦР

Все изоляты *Aeromonas* были подвергнуты анализу ERIC- и BOX-ПЦР, с целью определения их генотипа при помощи последовательностей праймеров BOX и ERIC, представленных в таблице 16.

После серии экспериментов был выбран протокол для постановки реакции: первичная денатурация при 95⁰С в течение 5 минут (1 цикл), денатурация 95⁰С - 1 минута, отжиг при 52⁰С -1 минута, элонгация при 72⁰С - 5

Для выполнения фингерпринтинга методом BOX-ПЦР были использованы следующие параметры амплификации: первичная денатурация 95⁰С в течение 5 мин, потом 30 циклов при 94 °С в течение 1 мин, 55 °С в течение 1 мин и при 65⁰С в течение 8 мин с заключительным этапом удлинения при 65 °С в течение 10 мин. Для получения верифицируемых результатов количество использованного ДНК для каждого штамма было доведено до 50 мкг/мл при помощи деионизированной воды.

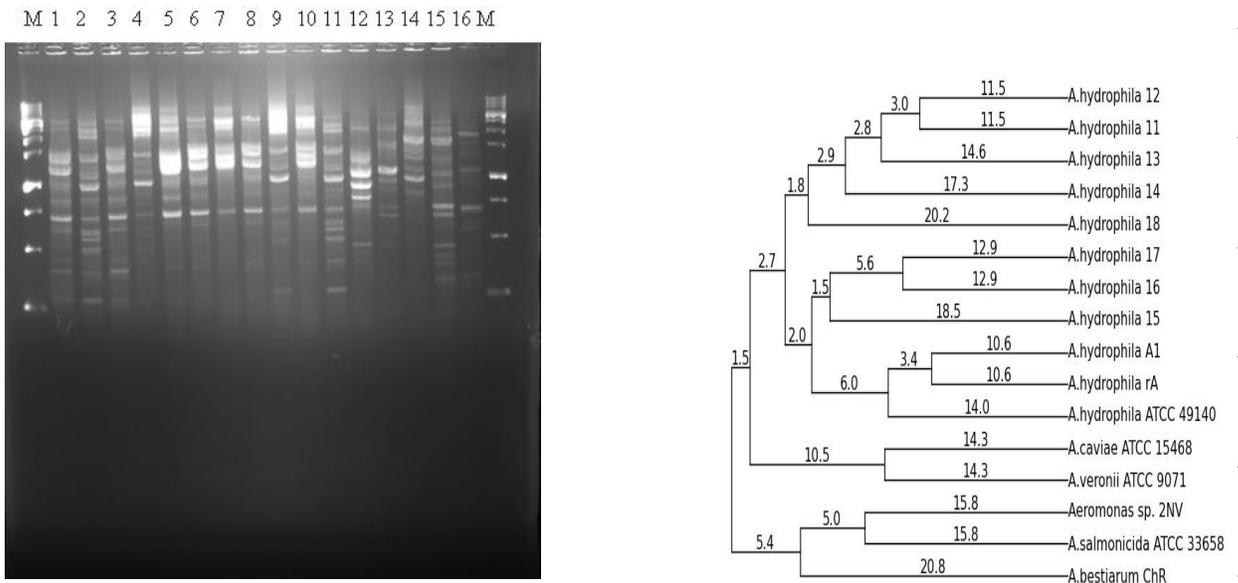
Таблица 16 – Праймеры используемые для фингерпринтинга

Название праймера	Последовательность	Источник
ERIC1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	[108]
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	
BOX A1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	[186]

Экспериментально было установлено, что для каждого из исследуемых штаммов характерен свой молекулярно-генетический профиль. Далее при помощи программного обеспечения PyE1ph 1.4 было выполнено построение дендрограмм для определения показателя генетической дистанции, которая позволяет определить генетические различия (дивергенции) между видами, подвидами, или популяциями одного вида. Кластеризация выполнялась с

учетом использования коэффициента Дайса для определения сходства матриц. Филогенетические древа были построены, учитывая полученные данные кластеризации, основе методов кластеризации, применяемых к матрице расстояний - UPGMA (метод невзвешенной парной группы со средним арифметическим).

Результаты исследований представлены на рисунках 28-31.



А

Б

Рисунок 28 – А. Результаты фингерпринтинга ДНК штаммов рода *Aeromonas* методом ВОХ-ПЦР: 1. *A. hydrophila* 11, 2. *A. hydrophila* 12, 3. *A. hydrophila* 13, 4. *A. hydrophila* 14, 5. *A. hydrophila* 15, 6. *A. hydrophila* 16, 7. *A. hydrophila* 17, 8. *A. hydrophila* 18, 9. *A. hydrophila* A1, 10. *A. hydrophila* rA, 11. *A. hydrophila* ATCC 49140, 12. *Aeromonas bestiarum* ЧР, 13. *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071, 14. *A. caviae* ATCC 15468, 15. *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, 16. *Aeromonas* sp. 2ВН, М. -маркер.

Б. Кластеризация штаммов рода *Aeromonas* методом UPGMA

Генотипированием методом ВОХ-ПЦР позволило разделить бактерии *A. hydrophila* на две основные геногруппы (таблица 17). К первой были отнесены штаммы *A. hydrophila* 11, *A. hydrophila* 12, *A. hydrophila* 13, *A. hydrophila* 14, *A. hydrophila* 18. В данную группу входили экологические изоляты, выделенные в Ульяновской и Самарской областях и Республики Чувашия в 2023 году.

Вторая группа состояла из двух подгрупп, в первую подгруппу входили экологические изоляты *A. hydrophila* 15 и *A. hydrophila* 17, выделенных с территории Самарской области, *A. hydrophila* 16 (Республика Чувашия) (таблица 18). Во вторую входили штаммы выделенные от рыб без патологических изменений (*A. hydrophila* А1 и *A. hydrophila* рА) и штамм *A. hydrophila* АТСС 49140.

Таблица 17 – Геногруппы штаммов *A. hydrophila*, сформированные на основе кластеризации методом ВОХ-ПЦР

Геногруппа	Штаммы
1	<i>A. hydrophila</i> 11, <i>A. hydrophila</i> 12, <i>A. hydrophila</i> 13, <i>A. hydrophila</i> 14, <i>A. hydrophila</i> 18
2	<i>A. hydrophila</i> 15 <i>A. hydrophila</i> 16, <i>A. hydrophila</i> 17
	<i>A. hydrophila</i> А1, <i>A. hydrophila</i> рА, <i>A. hydrophila</i> АТСС 49140

По результатам фингерпринтинга ДНК штаммов рода *Aeromonas* методом ВОХ-ПЦР и кластеризации методом UPGMA были выделены в отдельную геногруппу штаммы *A. salmonicida subsp. salmonicida* АТСС 33658, *A. bestiarium* ЧР, *Aeromonas* sp. 2ВН и *Aeromonas* sp. М1. Штаммы *A. salmonicida* и *Aeromonas* sp. 2ВН были объединены в одну геногруппу, показатель

генетического расстояния согласно данных анализа UPGMA составлял 17,3 и 16,0 соответственно (Рисунок 29).

Таблица 18 – Соотнесение геногрупп, сформированных на основе кластеризации методом ВОХ-ПЦР, и географической локации отбора проб

Геногруппа	Штаммы
1.	<p><i>A. hydrophila</i> 11 - пруд Сюткюль, Моргаушский муниципальный округ, Чувашская область, 2023 год</p> <p><i>A. hydrophila</i> 12 - озеро Большое, Чердаклинский район, Ульяновская область, 2023 год</p> <p><i>A. hydrophila</i> 13 - пруд, д. Малая Андреевка, Чувашская Республика, 2023 год</p> <p><i>A. hydrophila</i> 14 - пруд, д. Малая Андреевка, Чувашская Республика, 2023 год</p> <p><i>A. hydrophila</i> 18 - пруд, Волжский район, Самарская область, недалеко от с. Сухая Вязовка, 2023 год</p>
2.	<p><i>A. hydrophila</i> 15 - Михайловские пруды, Кинельский район, Самарская область, 2023 год;</p> <p><i>A. hydrophila</i> 16 - пруд Кортик, Цивильский муниципальный округ, п. Молодёжный, Республика Чувашия, 2023 год;</p> <p><i>A. hydrophila</i> 17 - пруд, Пестравский район Самарской области, недалеко от села Тростянь, 2023 год.</p> <p><i>A. hydrophila</i> А1 - карп, пруд, с. Новое Ахпердино Батыревский район, Республика Чувашия, 2022 год;</p> <p><i>A. hydrophila</i> рА - карп, пруд, с. Новое Ахпердино Батыревский район, Республика Чувашия, 2022 год</p> <p><i>A. hydrophila</i> АТСС 49140</p>

Штамм *Aeromonas* sp. М1 был, согласно полученным данным, генетически ближе к *A. bestiarium* ЧР.

Штамм *Aeromonas* sp. АК согласно проведенному анализу продукта амплификации ВОХ-ПЦР, исходя из дендрограммы, был ближе к *A. hydrophila*, а *Aeromonas* sp. АМ был ближе к группе, в которую входили *A. veronii* и *A. caviae* (Рисунок 29).

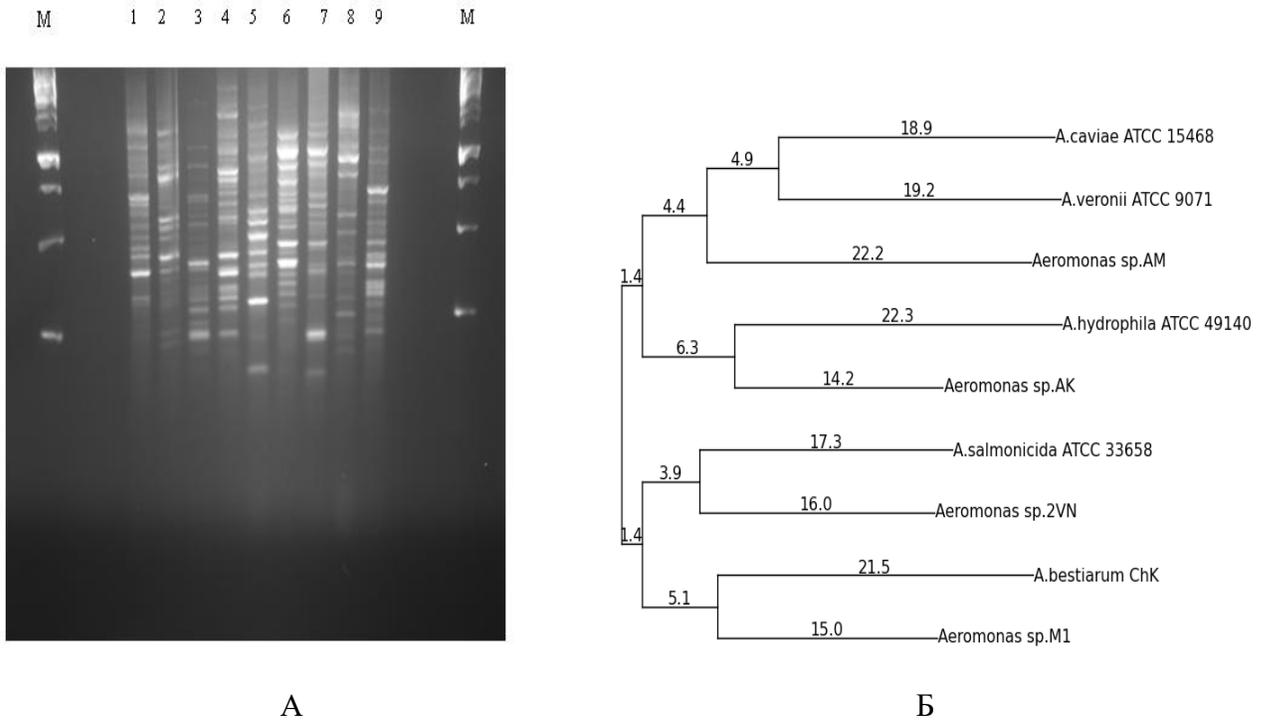


Рисунок 29 – А. Результаты фингерпринтинга ДНК штаммов рода *Aeromonas* методом BOX-PCR: 1. *Aeromonas* sp. АК, 2. *Aeromonas* sp. АМ, 3. *Aeromonas* sp. М1, 4. *Aeromonas* sp. 2ВН, 5. *A. hydrophila* ATCC 49140, 6. *A. bestiarum* ЧР, 7. *A. veronii* *bv. sobria* ATCC 9071, 8. *A. caviae* ATCC 15468, 9. *A. salmonicida subsp. salmonicida* ATCC 33658, М - маркер

Б. Кластеризация штаммов рода *Aeromonas* методом UPGMA

Таблица 19 – Геногруппы штаммов *Aeromonas*, сформированные на основе кластеризации методом BOX-PCR

Геногруппа	Штаммы
1	<i>Aeromonas</i> sp. АК <i>A. hydrophila</i> ATCC 49140
2	<i>A. caviae</i> ATCC 15468 <i>A. veronii</i> <i>bv. sobria</i> ATCC 9071 <i>Aeromonas</i> sp. АМ
3	<i>A. salmonicida subsp. salmonicida</i> ATCC 33658 <i>Aeromonas</i> sp. 2ВН
4	<i>A. bestiarum</i> ЧР <i>Aeromonas</i> sp. М1

Таблица 20 – Соотнесение геногрупп, сформированных на основе кластеризации методом ВОХ-PCR, и географической локации отбора проб

Геногруппа	Штаммы
1.	<i>Aeromonas</i> sp. АК - Озеро Атца, Сенгилеевский район, Ульяновская область, 2022 год; <i>A. hydrophila</i> ATCC 49140
2.	<i>A. caviae</i> ATCC 15468; <i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> ATCC 9071; <i>Aeromonas</i> sp. АМ - Озеро Атца, Сенгилеевский район, Ульяновская область, 2022 год
3.	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658; <i>Aeromonas</i> sp. 2ВН - кумжа, пруд, с. Новое Ахпердино Батыревский район, Республика Чувашия, 2022 год
4.	<i>A. bestiarium</i> ЧР- Черное озеро, Засвияжский район, Ульяновск, Ульяновская область, 2023 год; <i>Aeromonas</i> sp. М1- пруд д. Малая Андреевка, Республика Чувашия, 2022 год

Анализ полученных данных свидетельствует (таблица 19 и 20), что штаммы *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, *A. bestiarium* ЧР, *Aeromonas* sp. 2ВН и *Aeromonas* sp. М1 были выделены в отдельную геногруппу.

Штамм, выделенный от рыбы с признаками аэромоноза, входил в одну генетическую группу со штаммом *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, который был выделен от форели.

Штаммы *A. salmonicida* и *Aeromonas* sp. 2ВН были вынесены в одну геногруппу, показатель генетического расстояния, согласно анализу UPGMA, составлял 17,3 и 16,0 соответственно.

Экологические штаммы *A. bestiarium* и *Aeromonas* sp. М1 показали, согласно анализу UPGMA, большую генетическую идентичность.

Штамм *Aeromonas* sp. АК, согласно проведенному анализу продукта амплификации ВОХ-ПЦР, исходя из дендрограммы, был ближе к *A. hydrophila*, а *Aeromonas* sp. АМ был ближе к группе, в которую входили *A. veronii* и *A. caviae*. Оба этих изолята были близки к штаммам, выделенным от гидробионтов.

На основании дендрограммы исследуемых штаммов *A. hydrophila*, полученной на основе ERIC-ПЦР (Рисунок 30), весь пул экспериментальных бактерий был разделен на три основных генотипа.

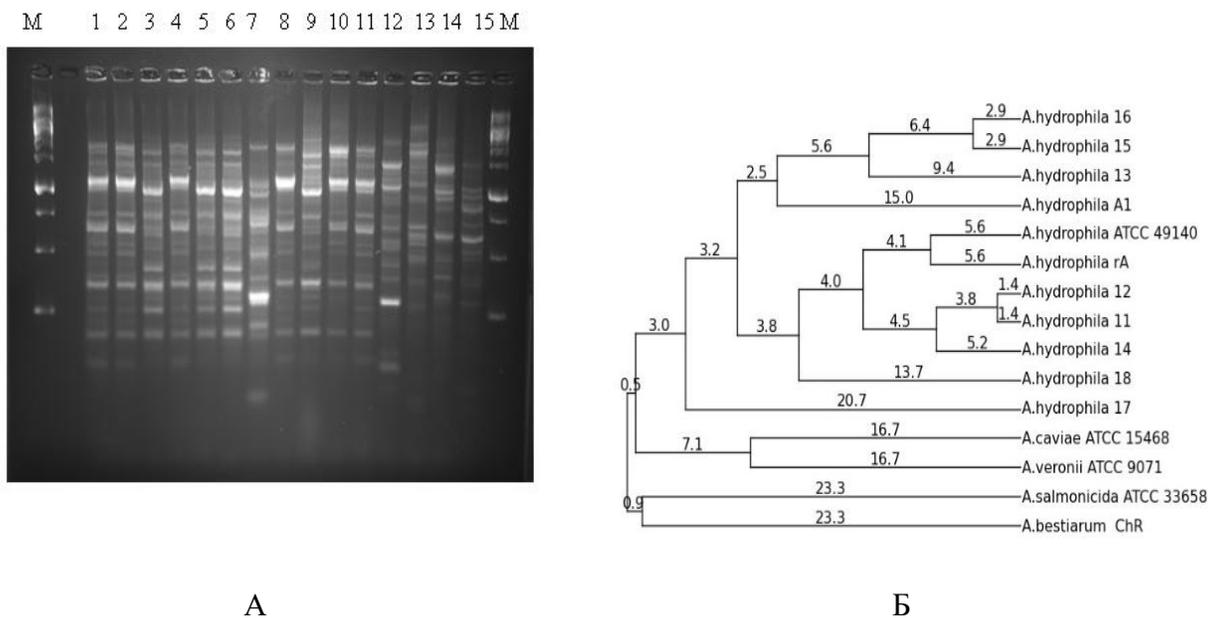


Рисунок 30 – А. Результаты фингерпринтинга ДНК штаммов рода *Aeromonas* методом ERIC-ПЦР: 1. *A. hydrophila* 11, 2. *A. hydrophila* 12, 3. *A. hydrophila* 13, 4. *A. hydrophila* 14, 5. *A. hydrophila* 15, 6. *A. hydrophila* 16, 7. *A. hydrophila* 17, 8. *A. hydrophila* 18, 9. *A. hydrophila* A1, 10. *A. hydrophila* рА, 11. *A. hydrophila* ATCC 49140, 12. *Aeromonas bestiarum* ЧР, 13. *A. veronii* *bv. sobria* ATCC 9071, 14. *A. caviae* ATCC 15468, 15. *A. salmonicida* *subsp. salmonicida* ATCC 33658, М. –маркер.

Б. Кластеризация штаммов рода *Aeromonas* методом UPGMA

Первый составили штаммы *A. hydrophila* 13, *A. hydrophila* 14, *A. hydrophila* 15, *A. hydrophila* 16 и *A. hydrophila* A1. Была установлена схожесть у штаммов *A. hydrophila* 15 и *A. hydrophila* 16, однако коэффициент генетической дистанции был выше у штаммов *A. hydrophila* 13 (9,4) и *A. hydrophila* A1 (15,0).

Ко второму генотипу были отнесены штаммы *A. hydrophila* 11, *A. hydrophila* 12, *A. hydrophila* 14, *A. hydrophila* 18, *A. hydrophila* pA и *A. hydrophila* ATCC 49140. Наибольшую гомологию показали между собой изоляты *A. hydrophila* pA и *A. hydrophila* ATCC 49140, коэффициент генетического расстояния составил 5,9. Коэффициент генетического расстояния между штаммами *A. hydrophila* 11 и *A. hydrophila* 12 составил 1,4.

Наиболее обособленно от других представителей этой группы находится штамм *A. hydrophila* 18. В отдельный генотип был вынесен изолят *A. hydrophila* 17.

Стоит так же отметить, что штаммы *A. bestiarium* ЧР и *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 были выделены в отдельный генотип, показывая высокую схожесть.

Так же был выполнен фингерпринтинг нетипированных штаммов *Aeromonas*. Штаммы *Aeromonas* sp. АК, *Aeromonas* sp. АМ и *Aeromonas* sp. 2ВН, *Aeromonas* sp. М1 были отнесены к роду на основании результатов изучения их физиолого-биохимических характеристик и молекулярно-генетического анализа, в частности амплификации консервативных участков генов «домашнего хозяйства» (*gyrB*), *zipA* и 16S рРНК, характерных для данного рода. Также у них были детектированы участки генов, кодирующие факторы виртуальности.

Было установлено, что штаммы *Aeromonas* sp. М1 и *Aeromonas* sp. 2ВН относятся к генетической группе, в которую так же входят бактерии *A. bestiarium* ЧР и *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, проявляя большую гомологию с последним из указанных штаммов. В свою очередь штамм *Aeromonas* sp. АК, согласно анализу UPGMA, был отнесён к геногруппе, в которую входил штамм *A. caviae* ATCC 15468, а *Aeromonas* sp. АМ вошел в состав группы, в которую входил *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071.

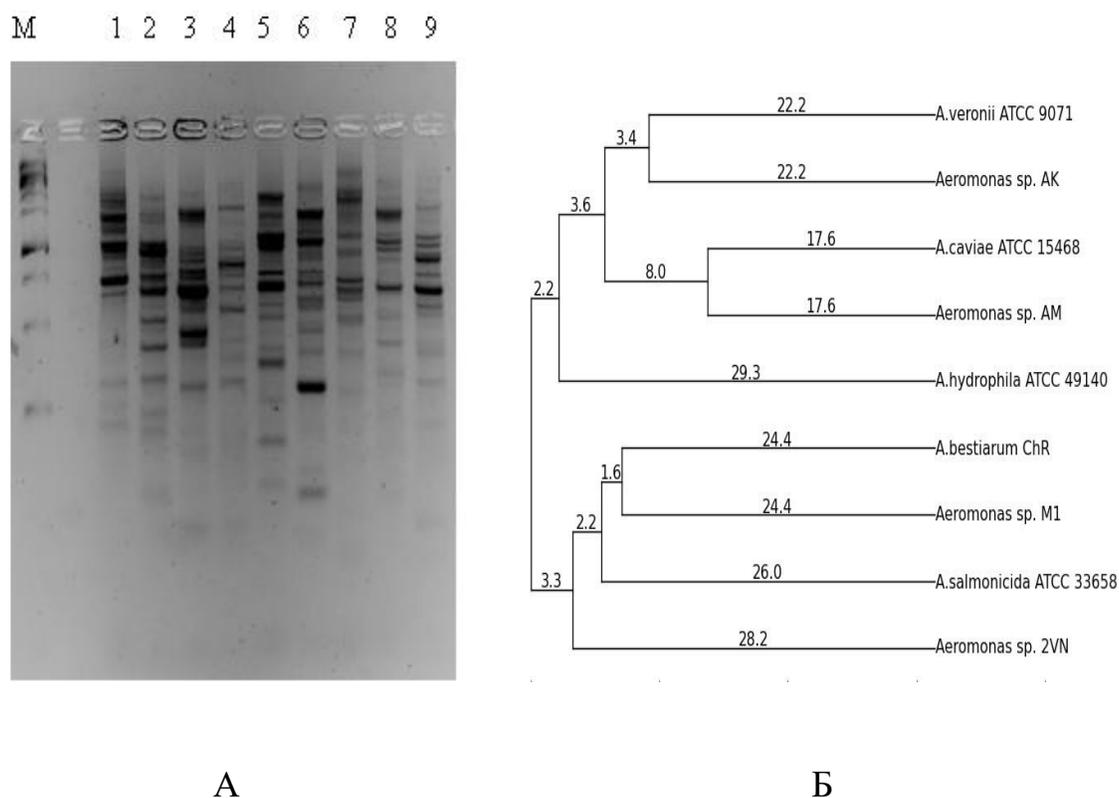


Рисунок 31 – А. Результаты фингерпринтинга ДНК штаммов рода *Aeromonas* методом ERIC-ПЦР: 1. *Aeromonas* sp. АК, 2. *Aeromonas* sp. AM, 3. *Aeromonas* sp. M1, 4. *Aeromonas* sp. 2ВН, 5. *A. hydrophila* ATCC 49140, 6. *Aeromonas bestiarium* ЧР, 7. *A. veronii* *bv. sobria* ATCC 9071, 8. *A. caviae* ATCC 15468, 9. *A. salmonicida subsp. salmonicida* ATCC 33658, М. -маркер.

Б. Кластеризация штаммов рода *Aeromonas* методом UPGMA

Исходя из полученных данных можно выделить следующие геногруппы штаммов бактерий рода *Aeromonas*, сформированные на основании данных фингерпринтинга, выполненного методом ERIC-ПЦР, представленные в таблицах 21–22.

Таблица 21 – Геногруппы штаммов бактерий рода *Aeromonas*, сформированные на основании данных фингерпринтинга, выполненного методом ERIC-ПЦР

Геногруппа	Штаммы
1	<i>A. hydrophila</i> 13, <i>A. hydrophila</i> 14, <i>A. hydrophila</i> 15, <i>A. hydrophila</i> 16, <i>A. hydrophila</i> A1
2	<i>A. hydrophila</i> 11, <i>A. hydrophila</i> 12, <i>A. hydrophila</i> 14, <i>A. hydrophila</i> 18, <i>A. hydrophila</i> pA, <i>A. hydrophila</i> ATCC 49140
3	<i>A. hydrophila</i> 17
4	<i>Aeromonas</i> sp. АК <i>A. caviae</i> ATCC 15468
5	<i>Aeromonas</i> sp. AM <i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> ATCC 9071
6	<i>Aeromonas</i> sp. M1, <i>Aeromonas</i> sp. 2ВН <i>Aeromonas bestiarium</i> ЧР, <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658

Таблица 22 – Соотнесение геногрупп, сформированных на основе кластеризации методом ERIC-ПЦР, и географической локации отбора проб

Геногруппа	Штаммы
1	<i>A. hydrophila</i> 13, Красная река Старомайнский район, Ульяновская область, 2023 год; <i>A. hydrophila</i> 14, пруд, д. Малая Андреевка, Чувашская Республика, 2023 год; <i>A. hydrophila</i> 15, Михайловские пруды, Кинельский район, Самарская область, 2023 год; <i>A. hydrophila</i> 16- пруд Кортик, Цивильский муниципальный округ, п. Молодежный, Чувашская Республика, 2023 год; <i>A. hydrophila</i> A1- карп, пруд, с. Новое Ахпердино Батыревский район, Чувашская Республика, 2022 год

Геногруппа	Штаммы
2	<i>A. hydrophila</i> 11- пруд Сюткюль, Моргаушский муниципальный округ, Чувашская Республика, 2023 год; <i>A. hydrophila</i> 12- озеро Большое, Чердаклинский район, Ульяновская область, 2023 год; <i>A. hydrophila</i> 14- пруд, д. Малая Андреевка, Чувашская Республика, 2023 год; <i>A. hydrophila</i> 18- пруд, Волжский район, Самарская область, недалеко от с. Сухая Вязовка, 2023 год; <i>A. hydrophila</i> рА- карп, пруд, с. Новое Ахпердино Батыревский район, Чувашская Республика, 2022 год; <i>A. hydrophila</i> АТСС 49140.
3	<i>A. hydrophila</i> 17- пруд, Пестравский район Самарской области, недалеко от села Тростянь, 2023 год
4	<i>Aeromonas</i> sp. АК- Озеро Атца, Сенгилеевский район, Ульяновская область, 2022 год; <i>A. caviae</i> АТСС 15468.
5	<i>Aeromonas</i> sp. АМ- Озеро Атца, Сенгилеевский район, Ульяновская область, 2022 год; <i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> АТСС 9071.
6	<i>Aeromonas</i> sp. М1- Пруд д. Малая Андреевка 2 Чувашская Республика, 2022 год; <i>Aeromonas</i> sp. 2ВН- кумжа, пруд, с. Новое Ахпердино Батыревский район, Чувашская Республика, 2022 год; <i>A. bestiarium</i> ЧР- Черное озеро, Засвияжский район, Ульяновск, Ульяновская область, 2023 год; <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> АТСС 33658

Данные анализа UPGMA электрофорезограммы фингерпринта ERIC-элементов свидетельствуют, что в первую группу были объединены штаммы *A. hydrophila* 13 (с. Красная река в Старомайском районе Ульяновской области), и штаммы *A. hydrophila* 14, *A. hydrophila* 16, выделенные из водных источников Чувашской Республики, *A. hydrophila* 15 (Михайловские пруды, Кинельский район, Самарская область). Штамм *A. hydrophila* А1 был выделен от карпа без патологических изменений (Чувашская Республика).

Во вторую группу были отнесены штаммы, выделенные из водоёмов с территорий Чувашской Республики (*A. hydrophila* 11), Ульяновской области (*A. hydrophila* 12), Самарской области (*A. hydrophila* 18), и штамм, выделенный от

карпа из Республики Чувашия в 2022 году - *A. hydrophila* pA. В эту же группу входил штамм *A. hydrophila* ATCC 49140, первоначально выделенный от человека.

В отдельную группу был отнесён штамм *A. hydrophila* 17, выделенный из воды пруда (Пестравский район Самарской области, недалеко от села Тростянь).

Штаммы *Aeromonas* sp. АК и *Aeromonas* sp. АМ были выделены из воды озера Атца в Ульяновской области. Согласно полученной дендрограмме, *Aeromonas* sp. АК был ближе к штамму *Aeromonas* sp. АМ, который был выделен от морской свинки с признаками инфекционного процесса, *Aeromonas* sp. АМ – к *A.veronii* bv. *sobria* ATCC 9071, выделенному от красноногой лягушки.

Штаммы *Aeromonas* sp. М1 (пруд д. Малая Андреевка, Чувашская Республика) и *A. bestiarium* ЧР (Черное озеро, Засвияжский район, Ульяновск, Ульяновская область) были объединены в одну геногруппу со штаммом *Aeromonas* sp. 2ВН (выделен от кумжи с патологическими изменениями, характерными для аэромоноза). Данные штаммы входили в одну группу со штаммом *A.salmonicida* ATCC 33658, выделенным от лосося.

Экспериментально установлено, что изоляты *Aeromonas* spp., выделенные из проб гидробионтов (рыб) и воды из водоемов, находящихся на территории Ульяновской и Самарской областей и Республики Чувашия, имели различные профили энтеробактериальных повторяющихся межгенных консенсусных (ERIC) последовательностей и BOX-элементов.

Экспериментально установлено, что изоляты *Aeromonas* spp., выделенные из объектов ветеринарно-санитарного надзора, имели различные профили энтеробактериальных повторяющихся межгенных консенсусных (ERIC) последовательностей и BOX-элементов.

Данные методы позволили провести дифференциацию полевых и коллекционных штаммов *Aeromonas* spp. и выполнить кластерный анализ при помощи данных генетических элементов. Применяемые методы позволят так же давать эпизоотологическую оценку циркулирующих в окружающей среде штаммов бактерий данного рода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По мере интенсификации аквакультуры заболевания рыб, включая такие как септицемия подвижных аэромонад (MAS), вызываемая *A. hydrophila*, стали основным препятствием для развития отрасли. Бактерии *A. hydrophila* можно обнаружить в различных водных объектах, таких как морская и пресная вода, системы водоснабжения. Популяция аэромонад невероятно многочисленна в теплое время года [13]. Хозяева *A. hydrophila* обширны, это и пресноводные и морских водных виды [331]. Сообщалось также, что эта бактерия коинфицирует эпизоотический язвенный синдром (EUS) [85]. Таким образом, этот высоковирулентный микроорганизм может вызвать массовую гибель видов аквакультуры на фермах [219]. Исходя из этого можно заключить, что разработка современных инструментов выявления и идентификация является актуальной задачей для мониторинга этого инфекционного агента.

На настоящий момент разработаны рекомендации как на основании бактериологических, так и молекулярно-генетических методов, используемых в диагностике инфекционных заболеваний. К ним можно отнести метод 1605 «*Aeromonas* в очищенной воде методом мембранной фильтрации с использованием агара ампициллин-декстрин с ванкомицином (ADA-V)», используемый в программах сбора и мониторинга данных Агентства по охране окружающей среды (EPA) (2001).

В работе J. Thomas, N. Amaresan (2023) указан протокол выделения и идентификации бактерий *Aeromonas sp.* от рыб [397]. Для выделения бактерий рода *Aeromonas* при инфекционных процессах у людей предложен алгоритм, изложенный в рекомендациях «UK SMI ID 19 Identification of *Vibrio* and *Aeromonas* species». Но вышеназванные методические рекомендации не всегда позволяют произвести точную типизацию представителей рода *Aeromonas*.

Коммерческие системы API-20E, API-32GN, Vitek2, MicroScan Walk/Away, ID69-Phoenix, BBL Crystal Enteric/Nonfermenter и система микропланшетов GN2-Omnilog, разработанные для ускоренной идентификации представителей рода *Aeromonas* не обеспечивают точную дифференциацию в виду использования устаревших баз данных и, таким образом несоответствия современной таксономии, слабых алгоритмов и исключения ключевых субстратов, необходимых для дифференциации аэромонад [280].

На данный момент разработаны рекомендации для выделения и идентификации бактерий рода *Aeromonas* в разных субстратах. Однако выделение *Aeromonas* spp. из образцов окружающей среды представляет собой сложную задачу из-за присутствия в них конкурирующих бактерий и возможности вмешательства матрицы образца в методы подготовки образцов и культивирования. Использование схем разбавления и сред обогащения облегчает изоляцию аэромонад из сильно загрязненных образцов, таких как осадок сточных вод и канализационные стоки [159, 180, 238, 272, 280, 336, 338,369, 397].

В результате проведенных нами исследований была разработана и апробирована комплексная тест-система для выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila*, включающая бактериологический и молекулярно-генетический компоненты. Был разработан протокол для выделения и идентификации на основе бактериологических методов, позволяющий проводить мониторинг *A. hydrophila* в объектах окружающей среды и пищевом сырье. Данная схема позволяет произвести выделение и идентификацию данного возбудителя в течение 198 часов.

В основе бактериологического компонента схемы выделения лежат особенности метаболизма бактерий *A. hydrophila*. В качестве биохимических характеристик изучаются способности штаммов продуцировать аргинингидролазу, орнитиндекарбоксилазу и лизиндекарбоксилазу, ставится

реакции Фогеса-Проскауэра, определяются возможности утилизации DL-лактата, продукции ферментов желатиназы и уреазы, ферментации углеводов, в частности глюкозы, сахарозы, маннита, мальтозы, сорбита и ксилозы, реакция на восстановление глюконата и утилизировать DL-лактат.

В настоящее время в литературе описаны различные по трудоемкости и материалоемкости методы детекции бактерий *A. hydrophila* [15]. Классические бактериологические культивирования точны, но требует много времени [17]. Что подтверждается и нашими данными. Тщательная проработка литературного материала и результаты собственных исследований позволили нам оптимизировать спектр физиолого-биохимических тестов, позволяющих провести идентификацию до вида в течение 198 часов.

Однако как указывалось ранее, идентификация на основе биохимических методов сложна, и из-за узкого спектра биохимических тестов можно обнаружить только типичные штаммы, и, следовательно, некорректно установить видовую принадлежность [210].

Иммуноферментный анализ, дот-блоттинг и серотипирование обладают, по литературным данным, низкой диагностической чувствительностью [15, 20, 195, 220, 368]. За последнее десятилетие было разработано большое количество методических приемов, основанных на технологии ПЦР, для детекции *A. hydrophila* [136, 140, 210, 218, 270, 341]. При этом стоит отметить, что представленные в литературных источниках праймерные системы не всегда позволяют произвести точную идентификацию до вида *A. hydrophila* при практическом их использовании. Это обусловлено тем, что произошло таксономическое изменение внутри рода *Aeromonas*, введен новый вид *A. dhakensis* [99].

Молекулярно-генетический компонент комплексной тест-системы разрабатывался как универсальный инструмент. Он включал ряд исследований.

Для идентификации бактерий рода *Aeromonas* подобрана система праймеров, где в качестве целевого гена был выбран ген «домашнего хозяйства» в субъединице ДНК-гиразы В (*gyrB*).

Был разработан протокол полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией результатов в режиме «реального времени». В данном исследовании в качестве целевого участка генома был выбран ген, кодирующий белок клеточного деления *zipA*. Было установлено, что разработанные праймерные системы были эффективны в отношении штаммов бактерий *A. hydrophila*. Чувствительность разработанной системы составила 1,25 пг на одну реакцию.

Была выполнена разработка быстрого и чувствительного диагностического анализа с использованием петлевой изотермической амплификации (LAMP) в отношении *A. hydrophila*, описанная ранее в работе Z. Gao et al. (2023). Исследователи провели сравнительный анализ LAMP с qPCR. Проверка диагностического анализа проводилась с использованием реальных образцов, полученных от рыб аквакультуры. Результаты показали, что на основе быстрого обнаружения бактериальной геномной ДНК флуоресцентный анализ LAMP имел нижний предел обнаружения (LOD) 0,559 нг/мкл (0,315–1,693, 95% ДИ), в то время как LOD для qPCR составил 4,301 нг/мкл (2,084–8,876, 95% ДИ) [161].

В работе J. Xiong et.al. (2020) описан метод для выявления гена аэролизина у бактерий рода *Aeromonas* при использовании метода LAMP с коллометрической детекцией (феноловый красный) в закрытой пробирке. Метод показал эффективность при детекции и идентификации *Aeromonas* spp на 30 штаммах бактерий этого рода и на 40 клинических тканях угрей [414].

В настоящем исследовании был произведен подбор праймеров для выявления и идентификации бактерий вида *A. hydrophila* методом петлевой изотермической амплификации (LAMP) с детекцией результата методом обнаружения амплификации путем высвобождения гасящей реакции (DARQ).

Чувствительность разработанного метода составила $2,72 \times 10^2$ бактериальных геномов на одну реакцию.

Апробация разработанной комплексной тест-системы для выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila* проводилась на 91 пробе объектов санитарного надзора, и позволила сформировать коллекцию из 15 полевых изолятов, 10 из которых были идентифицированы как *A. hydrophila*, 5 - отнесены к роду *Aeromonas* spp., на основании детекции участков генов, кодирующих 16S рРНК и *gyrB*).

Определены показатели антибиотикорезистентности у выделенных 10 полевых изолятов *A. hydrophila*. Установлено, что бактериальные изоляты, идентифицированные как *A. hydrophila*, характеризовались резистентностью к β -лактамным пенициллинам, были не устойчивы к мупироцину и эритромицину, были чувствительны к β -лактамным цефалоспорином и ряду фторхинолонов (лемефлоксацину, норфлоксацину). Все выделенные штаммы бактерий обладали устойчивостью к аминогликозидам, линкозамидам и производным нитрофуранов.

С момента своего первоначального признания в качестве возбудителя геморрагической септицемии, *A. hydrophila* был обнаружен как патоген у самых разных видов пресноводных рыб, включая декоративных рыб и иногда у морских рыб, например, язвенная болезнь трески [86].

По литературным данным установлено, что патогенность *Aeromonas* является многофакторной [266, 379, 409] и объясняется широким спектром факторов, связанных с вирулентностью [377, 399]. При этом взаимодействие таких патогенных бактерий, как *Aeromonas*, с клетками хозяина осуществляется их внеклеточными компонентами и токсинами. В частности к ним относятся: аэролизин (*aer*), цитотоксический энтеротоксин (*act*), термолабильные (*alt*) и термостабильные (*ast*) цитотонические энтеротоксины, сериновая протеаза (*ser*), эластаза (*ela*) [76, 149, 254, 255, 257, 364, 378]. Более того, геном *A.*

hydrophila кодирует различные типы факторов вирулентности, такие как аэролизин (aer), цитотоксический энтеротоксин (act), термостабильный гемолизин (hly) и термостабильный цитотоксический энтеротоксин (ast) [72, 117, 141, 143, 147, 206, 366]. Это наиболее изученные детерминанты вирулентности у *A. hydrophila*. Однако есть и другие, которые также могут играть роль в его патогенности, такие как липаза, эластаза, жгутики, система секреции III типа, белки внешней мембраны и ДНКазы [83, 116, 150, 157, 309, 366, 387, 388, 407].

По полученным нами данным все изоляты *A. hydrophila*, включая штамм *A. hydrophila* ATCC 49140, характеризуются наличием участков генов, кодирующих экспрессию аэролизина (aerA+) и гемолизина (hlyA+), характеризуются гемолитической активностью, что может свидетельствовать об их потенциальной патогенности. Схожие характеристики были выявлены у штаммов *A. bestiarium* ЧР, *Aeromonas* sp 2ВН, *Aeromonas* sp. М1 и *A. salmonicida subsp. salmonicida* ATCC 33568.

Известно, что бактерии *A. hydrophila* продуцируют энтеротоксины; наличие генов alt и ast тому подтверждение. Оба гена ответственны в итоге за повреждение тканей кишечника [100]. Результаты исследования подтвердили гипотезу о том, что aer/act является основным энтеротоксином, ответственным за вирулентность бактерий [118].

Нами установлено, что у всех исследуемых штаммов *A. hydrophila* в геноме обнаружены гены alt и ast. Ген цитотоксического термостабильного энтеротоксина alt был детектирован у штаммов *A. salmonicida subsp. salmonicida* ATCC 33568, *A. caviae* ATCC 15468, *Aeromonas* sp 2ВН, *Aeromonas* sp М1 и *A. bestiarium* ЧР. У всех изолятов бактерий *A. hydrophila* был выявлен ген ast.

В исследовании D.T. Ninh (2021) указано, что 42,5% изолятов *A. hydrophila* из объектов внешней среды несут ген alt, что ниже, чем у *A.*

hydrophila, выделенных от различных видов рыб. Однако это автор отмечал, что ген *ast* отсутствовал у всех изолятов *A. hydrophila*. Противоположные данные были опубликованы у J.L. Ortega-Balleza (2018), который зафиксирован у 70% изолятов *A. hydrophila* (тилапия и канальный сом, Египет), наличие гена *ast*. Вариабельность частоты обнаружения генов вирулентности среди изолятов *A. hydrophila* может быть обусловлена географическим распространением штаммов и возможностью горизонтального переноса генов [181, 264, 331].

Система секреции типа III (T₃SS) и секреции типа VI (T₆SS) у грамотрицательных бактерий, таких как *A. salmonicida* и различных изолятов *A. hydrophila* может приводить к их вирулентности [127, 138, 215].

В исследовании было установлено, что ген *aexT* был выявлен только у штаммов *A. salmonicida subsp. salmonicida* ATCC 33568 и *A. veronii bv. sobria* ATCC 9071, ген *ascV* только у штамма *A. veronii*. Однако не у одного из иных исследуемых штаммов аэромонад участки генов *ascV* и *aexT* (T₃SS), *vasH* (T₆SS) не были выявлены.

Экспериментально было определено, что у всех изолятов *A. hydrophila* были выявлены участки генов *fla*, *lip* и *ela*. Такая же комбинация этих генов была обнаружена у *Aeromonas sp. АК*, *Aeromonas sp. 2ВН*, *Aeromonas sp. М1*, *A. salmonicida subsp. salmonicida* ATCC 33568, *A. bestiarium* ЧР. У штамма *Aeromonas sp. АК* были выявлены гены *lip* и *ela*, а у штамма *A. veronii bv. sobria* ATCC 9071 не было выявлено ни одного из этих генов.

Шигаподобные токсины (*stx*) являются важной причиной кровавой диареи и гемолитико-уремического синдрома (ГУС) [24]. В нашем исследовании только у одного из изолятов был выявлен участок, кодирующий этот ген - у *A. hydrphila* А1.

Разработаны в настоящее время различные молекулярные методы с отслеживания принадлежности полевых изолятов к одному и тому же клону и, следовательно, имеют эпизоотологическое родство [167]. К таким методам

относятся повторяющаяся межгенная консенсусная ПЦР энтеробактерий (ERIC-ПЦР), BOX-ПЦР, полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP), гель-электрофорез в импульсном поле (PFGE), типирование мультилокусных последовательностей (MLST), случайно амплифицированная полиморфная ДНК-ПЦР (RAPD-PCR) [42, 103, 105, 108, 167, 224, 238, 300, 336, 348, 395].

В исследовании L. Soler et al (2003) с использованием 26 изолятов *Aeromonas* spp. разного географического происхождения показали, что ERIC-ПЦР был более дискриминационным, чем REP-ПЦР, RFLP или RFLP ITS 16S-23S. Авторы исследования так же установили, что существует высокое генетическое разнообразие штаммов *A. hydrophila* от больного карпа. Они систематизировали все выделенные полевые изоляты (карп из разных провинций Китая) в три генотипические группы [103].

В исследованиях, проведённых в 2008 году, было показано, что ERIC-ПЦР может быть полезен для видового и подвидового типирования. Однако M.F. Algamal et al. в 2020 году сообщили, что все штаммы *A. hydrophila*, обнаруженные в одном географическом регионе, не имеют генетического разнообразия и обладают идентичными профилями [103, 268].

Результаты нашего исследования выявили высокое генетическое разнообразие среди выделенных штаммов аэромонад. Было так же установлено, что некоторые изоляты имели высокую генетическую схожесть, но были выделены из разных территориальных источников. Генетическая стабильность между разными штаммами может быть связана с физиологическими адаптация к среде, в которой они существуют [384].

Полученные нами данные согласуются с результатами M.G. Aguilera-Arreola et al. (2005), которые установили, что некоторые штаммы *A. hydrophila*. изолированные в разных географических точках, были клонально связаны, поскольку они имели профили идентичные на 100% [40].

Было установлено, что штаммы *A.salmonicida* и *A. bestiarum* относятся к одному генотипу, что согласуется с данными ряда исследований, полученными разными методами [16, 45, 142, 309, 310, 315, 317].

В исследовании М. Тасão et al. (2005) был описан метод ВОХ-ПЦР для дискриминации штаммов некоторых видов *Aeromonas*. Все штаммы были типизируемыми, большинство из них показало уникальные паттерны полос [102].

V. Singh et al. (2010) провели генотипирование *A. hydrophila* с помощью ВОХ-ПЦР. Авторы сообщили, что им удалось сгруппировать 20 изолятов в шесть групп различных форм, являющихся (40%) штаммами *Aeromonas* с той же статистикой, подтвержденной ВОХ-ПЦР [186]. Согласно полученным результатам, метод ВОХ-ПЦР-дактилоскопии применим для типирования штаммов *Aeromonas* и может рассматриваться как полезный дополнительный инструмент для эпидемиологических исследований представителей этого рода.

При анализе энтеробактериальных повторяющихся межгенных консенсусных последовательностей (ERIC) и ВОХ-элементов установлено, что изоляты *Aeromonas* spp., выделенные из проб гидробионтов (рыб) и воды (открытые водоемы Ульяновской и Самарской областей и Республики Чувашия), имели различные профили по этим генетическим элементам.

Предложена комплексная тест-система для выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila*, включающая 2 компонента. Бактериологическая схема для выделения и идентификации *A. hydrophila* из объектов окружающей среды и патологического материала, полученного от гидробионтов, позволяет произвести типизацию полевых изолятов *A. hydrophila* от других представителей рода. Как дополнительный инструмент для установки родовой принадлежности предложен метод ПЦР с электрофоретической детекцией результата амплификации для выявления участка гена «домашнего хозяйства» в субъединице ДНК-гиразы В (*gyrB*), характерного для представителей *Aeromonas*.

Молекулярно-генетический компонент тест-системы включает праймерные системы для детекции *A. hydrophila* методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и петлевой изотермической полимеразной амплификации (LAMP) с детекцией результатов амплификации в режиме «реального времени».

Проведенное в рамках исследования генотипирование выделенных изолятов *Aeromonas spp.* методами ERIC- и BOX-ПЦР позволило выполнить кластерный анализ и установить степень родства экспериментального пула бактерий рода *Aeromonas*.

ВЫВОДЫ

1. Разработан бактериологический компонент тест-системы для выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila*, включающий среду для накопления и первичной идентификации A.v.1-УГАУ, дифференциально-диагностическую среду BSIBG-agar, изучение способности бактериальных изолятов к продукции ксилозы, аргинингидролазы, орнитиндекарбоксилазы и лизиндекарбоксилазы, ацетил-метилкарбинола, к утилизации DL-лактата, ферментации желатиназы, уреазы, ферментация углеводов (глюкозы, сахарозы, маннита, мальтозы, сорбита и ксилозы), гемолитической активности. При помощи разработанной бактериологической схемы возбудитель аэромоноза, *A. hydrophila*, декатируется и идентифицируется в течение 198 часов.

2. Разработаны протоколы для молекулярно-генетической типизации бактерий *A. hydrophila* методами полимеразной цепной реакции с детекцией результата амплификации в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) и методом петлевой изотермической реакции LAMP с обнаружением продуктов амплификации с использованием высвобождения гашения (DARQ). Оба метода показали высокую степень специфичности и чувствительности (1,25 нг на реакцию и 10^2 бактериальных генома на реакцию, соответственно). Произведен подбор праймеров для детекции участка гена ДНК-гиразы В (*gyrB*), характерного для бактерий рода *Aeromonas*, с детекцией результата амплификации в агарозном геле.

3. Комплексная тест-система для выявления и идентификации бактерий *A. hydrophila* апробирована на 91 пробе объектов санитарного надзора. Сформирована коллекция из 15 штаммов: 10 полевых изолятов *A. hydrophila*, 1 - *A. bestiarium* и 4 – *Aeromonas* spp.

4. Установлено, что выделенные штаммы *A. hydrophila* — это грамотрицательные, каталазо- и оксидазоположительные палочки,

характеризующиеся типичными, общеизвестными свойствами. У всех изученных штаммов *A. hydrophila* были детектированы гены «домашнего хозяйства» (*gyrB*) и 16s rRNA, были установлено наличие генов *hlyA*, *aerA*, *ast*, *alt*, *fla*, *lip*, *ela*. Экспериментальный пул бактериальных изолятов *A. hydrophila* не характеризовался наличием генов, кодирующих *aexT*, *aopB* и *ascV*, *vasH*. Штамм *A. hydrophila* A1 характеризовался наличием участка гена *stx-1*.

5. При анализе энтеробактериальных повторяющихся межгенных консенсусных последовательностей (ERIC) и BOX-элементов установлено, что изоляты *Aeromonas* spp., выделенные из проб гидробионтов (рыб) и воды (открытые водоемы Ульяновской и Самарской областей и Чувашской Республики), имели различные профили по этим генетическим элементам.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

В качестве инструментов для молекулярно-генетической идентификации *A. hydrophila* предлагается использовать разработанные:

- «Методические указания по применению набора реагентов для выявления и идентификации ДНК *Aeromonas hydrophila* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» (в соавторстве с Н.А. Феоктистовой, 2024);

- «Методические указания по применению набора реагентов для выявления *Aeromonas hydrophila* методом LAMP (петлевой изотермической амплификации)» (в соавторстве с Н.А. Феоктистовой, 2024).

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшая разработка темы направлена на увеличение коллекции бактериальных изолятов *Aeromonas* spp. с расширением географического ареала мест отбора проб и номенклатуры объектов ветеринарно-санитарного надзора в качестве проб для исследований. Детекция генов вирулентности у выделенных изолятов *A. hydrophila* позволит судить об их потенциальной патогенности, изучение экспрессии этих генов позволит получить материал для последующего прогнозирования эпизоотологической ситуации по аэромонузу при анализе воды в конкретных акваториях. Методы ВОХ-ПЦР и ERIC- ПЦР показали свою эффективность для штаммовой типизации, и могут быть использованы одного из инструментов для эпизоотологического мониторинга и скрининговых исследований.

Используя разработанную комплексную тест-систему возможно проведение исследований проб объектов окружающей среды и патологического материала, с целью формирования коллекции штаммов *A. hydrophila* и других

представителей рода. Данные исследования позволят составить представление об ареале распространения бактерий.

Коллекция выделенных изолятов может быть охарактеризована на наличие генов, кодирующих факторы вирулентности, это позволит судить об их потенциальной патогенности, а также это позволит произвести исследования экспрессии методом постановки биопробы для определения патогенности. Методы ВОХ-ПЦР и ERIC-ПЦР показали свою эффективность для типирования штаммов, и могут быть использованы в качестве одного из инструментов для эпизоотологического мониторинга. Между полученными данными методами результатами исследований и данными секвенирования генов домашнего хозяйства (16S рРНК, *gyrB* и *rpoB*) целесообразно провести корреляцию с целью подтверждения их эффективности.

Полученные результаты исследований могут быть в перспективе внедрены в лабораторную практику ветеринарных лабораторий.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДДМ- диско-диффузный метод

ДНК- дезоксирибонуклеиновая кислота

КОЕ- колониобразующая единица

МСХ–Министерство сельского хозяйства

п.н. –пары нуклеотидов

ПЦР –полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомные рибонуклеиновые кислоты

тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота

ТТГА – таурохолат-теллурит-желатиновый агар

ФГБУ –Федеральное государственное бюджетное учреждение

AFLP (Amplified fragment length polymorphism) – анализ полиморфизма длин усиленных фрагментов

ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis)– анализ амплифицированной рибосомальной ДНК (ARDRA)

АТСС (American Type Culture Collection)– Американская коллекция типовых культур

CDS (coding sequence)– кодирующая последовательность

EPA (Environmental Protection Agency) – Агентства по охране окружающей среды

ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction) – энтеробактериальная повторяющаяся межгенная консенсусная полимеразная цепная реакция

FAFLP (Fluorescent amplified fragment length polymorphism) – полиморфизм длины флуоресцентно амплифицированных фрагментов

HG (hybridization group) – группы гибридизации

IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) – Международный журнал систематической и эволюционной микробиологии

IRU – межгенная повторная единица

IS (Insertion sequence) – инсерционная последовательность

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) – Киотская энциклопедия генов и геномов

LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) – петлевая изотермическая амплификация

Log - логарифм

MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) – масс-спектрометрия матричная лазерная десорбция/ионизация

MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) – мультилокусный филогенетический анализ

OMV - (outer membrane vesicle) – везикула внешней мембраны

ORF (Open reading frame) – открытая рамка считывания

qPCR (quantitative polymerase chain reaction) – количественная полимеразная цепная реакция

SLST (Single Locus Sequence Typing) – типирование последовательностей одного локуса

SNP (Single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм

T3SS (Type three secretion system) – системы секреции третьего типа

Vas (virulent-associated secretion) – вирулентно - ассоциированная секреция

VNTR (Variable number tandem repeat) – многолокусный тандемный повтор с переменным числом

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. К вопросу распространения бактерий рода *Aeromonas* в объектах окружающей среды и клиническом материале / Л. В. Катаева, Т. Ф. Степанова, О. В. Посоюзных [и др.] // Здоровье населения и среда обитания. – 2018. – № 6 (303). – С. 54–57.
2. Канаева, Т. И. Разработка методов выделения и идентификации бактерии *Aeromonas hydrophila*: специальность “Биотехнология” 03.00.23: диссертация на соискания ученой степени кандидата биологических наук / Канаева Татьяна Ивановна; Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова. - Саратов, 2009. – 126 с.
3. Куклина, Н. Г. Разработка бактериологической схемы выделения и идентификации бактерии *Aeromonas salmonicida* / Н. Г. Куклина, Д. А. Васильев, А. А. Нафеев. // Международный научно-исследовательский журнал. – 2017. – № 4–1 (58). – С. 27–30.
4. Морозова, М. А. Риски водных сапронозов, обусловленные аэромонадами в водоемах южного региона / М. А. Морозова, Л. А. Бугаев // Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными заболеваниями на юге России. Ермольевские чтения. Сборник материалов межрегиональной научно-практической конференции, посвященной памяти и заслугам Зинаиды Виссарионовны Ермольевой. – 2021. – 138 с.
5. Методические указания по лабораторной диагностике аэромоназа (краснухи) карпов: (N 13–3/5) - утверждены Главным управлением ветеринарии Государственного агропромышленного комитета СССР от 23.04.1986 - Текст: электронный // Гарант.ru [сайт] URL: <https://base.garant.ru/400297792/?ysclid=m3bv304k5a149282641>.

6. Неретин, М. В. Ветеринарно-санитарная экспертиза карповых рыб при аэромонозе 16.00.06 «Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза»: диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук/ Неретин Михаил Вячеславович; Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии гигиены и экологии. – Москва. – 2007. -144 с.
7. Петрова, О. Г. Эпизоотологический мониторинг инфекционных и инвазионных болезней рыб, социально-экономическое значение разработки / О. Г. Петрова, О. В. Бадова, Д. Н. Речкалов// Аграрный вестник Урала. – 2018. – № 9 (176). – С. 44–50.
8. Сиволодский, Е. П. Вибриостатический тест с никлозамидом для идентификации бактерии / Е. П. Сиволодский.//Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – Т. 59, № 5. – С. 53–55.
9. Устименко, Е. А. Возбудитель фурункулёза *Aeromonas salmonicida* у тихоокеанских лососей Камчатки / Е. А. Устименко, Н. В. Сергеенко. // Труды ВНИРО. – 2020. – Т. 182. – С. 139–150.
10. Циркуляция аэромонад в промысловой рыбе Республики Бурятия / Е. Д. Дугаржапова, В. Ц. Цыдыпов, О. А. Зверева [и др.]// Эколого-биологическое благополучие животного мира: матер. – 2012. – 245с.
11. Юхименко, Л. Н. Временные рекомендации по выделению и идентификации аэромонад / Л. Н. Юхименко, В. Ф. Викторова, И. Фаркаш. // Всесоюз. науч.-произв. об-ние по рыбоводству, ВНИИ прудового рыб. хоз-ва. - 1987. – 14с.
12. ‘*Aeromonas intestinalis*’ and ‘*Aeromonas enterica*’ isolated from human faeces, ‘*Aeromonas crassostreae*’ from oyster and ‘*Aeromonas aquatilis*’ isolated from lake water represent novel species / M. J. Figueras, F. Latif-Eugenín, F. Ballester [et al.] // New microbes and new infections. – 2017. – Vol. 15. – P. 74-76.

13. A highly virulent pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* / P. Jiravanichpaisal, S. Roos, L. Edsman [et al.] // Journal of Invertebrate Pathology. – 2009. – Vol. 101, № 1. – P. 56-66.
14. A multiplex PCR assay for detection of *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Streptococcus agalactiae* from the isolates of patients with necrotizing fasciitis/ Y. H. Tsai, P. H. Chen, P. A. Yu [et al.] // International Journal of Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 81. – P. 73-80.
15. A novel detection method for the pathogenic *Aeromonas hydrophila* expressing *aerA* gene and/or *hlyA* gene based on dualplex RAA and CRISPR/Cas12a / Z. Lin, J. Lu, S. Wu [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2022. – Vol. 13. – P. 973996.
16. A rapid MALDI-TOF MS identification database at genospecies level for clinical and environmental *Aeromonas* strains / C. Benagli, A. Demarta, A. Caminada [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 10. – P. e48441.
17. A review of molecular diagnoses of bacterial fish diseases / M. Abdelsalam, M. Y. Elgendy, M. R. Elfadadny [et al.] // Aquaculture International. – 2023. – Vol. 31, № 1. – P. 417-434.
18. A study on the control of *Aeromonas hydrophila* infection in the cat fish by medicinal plants/ P. Thiyagarajan, A. L. Bhavani, M. G. Ebbie [et al.] // Sch. Acad. J. Biosci. – 2014. – Vol. 2, № 2. – P. 144-150.
19. A study on the prevalence of *Aeromonas* spp. and its enterotoxin genes in samples of well water, tap water, and bottled water/ H. Didugu, M. Thirtham, K. Nelapati [et al.] // Veterinary World. – 2015. – Vol. 8, № 10. – P. 1237.
20. Abbott, S. L. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes / S. L. Abbott, W. K. W. Cheung, J. M. Janda // Journal of clinical microbiology. – 2003. – Vol. 41, № 6. – P. 2348-2357.

21. Abd El-Ghany, W. A. A review on *Aeromoniasis* in poultry: A bacterial disease of zoonotic nature / W. A. Abd El-Ghany // The Journal of Infection in Developing Countries. – 2023. – Vol. 17, № 01. – P. 1-9.
22. Abundance and antimicrobial resistance of three bacterial species along a complete wastewater pathway / I. Verburg, S. García-Cobos, L. Hernández Leal [et al.] // Microorganisms. – 2019. – Vol. 7, № 9. – P. 312.
23. Accuracy of 6 commercial systems for identifying clinical *Aeromonas* isolates / B. Lamy, F. Laurent, I. Verdier [et al.] // Diagnostic microbiology and infectious disease. – 2010. – Vol. 67, № 1. – P. 9-14.
24. Active shiga-like toxin produced by some *Aeromonas* spp., isolated in Mexico City / I. Palma-Martínez, A. Guerrero-Mandujano, M. J. Ruiz-Ruiz [et al.] // Frontiers in microbiology. – 2016. – Vol. 7. – P. 1522.
25. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas* / A. J. Martinez-Murcia, C. Esteve, E. Garay [et al.] // FEMS Microbiology Letters. – 1992. – Vol. 91, N 3. – P. 199-205.
26. *Aeromonas* and human health disorders: clinical approaches / R. B. G. Pessoa, W. F. D. Oliveira, M. T. D. S. Correia, [et al.] // Frontiers in microbiology. – 2022. – Vol. 13. – P. 868890.
27. *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms / R. Beaz-Hidalgo, F. Latif-Eugenín, M. J. Hossain [et al.] // Systematic and applied microbiology. – 2015. – Vol. 38, N 3. – P. 161-168.
28. *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water / M. Aravena-Román, R. Beaz-Hidalgo, T. J. Inglis [et al.] // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2013. – Vol. 63, N Pt_6. – P. 2270-2276.
29. *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formerly genomospecies DNA group 2 A. hydrophila), a new species isolated from non-human sources. / A. Ali, A. M.

- Carnahan, M. Altwegg [et al.] // *Medical Microbiology Letters*. - 1996. - Vol. 5, № 3. - P.156-165.
30. *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs / D. Minana-Galbis, M. Farfan, M. C. Fusté [et al.] // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2007. – Vol. 57, № 3. – P. 582-587.
 31. *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern / A. Martínez-Murcia, R. Beaz-Hidalgo, P. Svec [et al.] // *Current microbiology*. – 2013. – Vol. 66. – P. 197-204.
 32. *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a Spanish river / A. Alperi, A. J. Martínez-Murcia, A. Monera [et al.] // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2010. – Vol. 60, № 1. – P. 72-77.
 33. *Aeromonas hemolytic* uremic syndrome. A case and a review of the literature / M. J. Figueras, M. J. Aldea, N. Fernández [et al.] // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. – 2007. – Vol. 58, № 2. – P. 231-234.
 34. *Aeromonas hydrophila* adenylyl cyclase 2: a new class of adenylyl cyclases with thermophilic properties and sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaeobacteria / O. Sismeiro, P. Trotot, F. Biville [et al.] // *Journal of bacteriology*. – 1998. Vol. 180, №N 13. – P. 3339-3344.
 35. *Aeromonas hydrophila* AH-3 type III secretion system expression and regulatory network / S. Vilches, N. Jimenez, J. M. Tomás [et al.] // *Applied and environmental microbiology*. – 2009. – Vol. 75, № 19. – P. 6382-6392.
 36. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* cause motile *Aeromonas* septicaemia in the cultured Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus* / F. Li, D. Wu, H. R. Gu [et al.] // *Aquaculture Research*. – 2019. – Vol. 50, № 5. – P. 1515-1526.
 37. *Aeromonas hydrophila* and its relation with drinking water indicators of microbiological quality in Argentine / M. C. Fernández, B. N. Giampaolo, S. B. Ibañez [et al.] // *Genetica*. – 2000. – Vol. 108, №N 1. – P. 35-40.

38. *Aeromonas hydrophila* beta-hemolysin induces active chloride secretion in colon epithelial cells (HT-29/B6) / H. J. Epple, J. Mankertz, R. Ignatius [et al.] // Infection and immunity. – 2004. – Vol. 72, № 8. – P. 4848-4858.
39. *Aeromonas hydrophila* biofilm, exoprotease, and quorum sensing responses to co-cultivation with diverse foodborne pathogens and food spoilage bacteria on crab surfaces / I. K. Jahid, M. F. R. Mizan, J. Myoung [et al.] // Biofouling. – 2018. – Vol. 34, № 10. – P 1079-1092.
40. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes / M. G. Aguilera-Arreola, C. Hernández-Rodríguez, G. Zúñiga [et al.] // FEMS Microbiology Letters. – 2005. – Vol. 242, № 2. – P. 231-240.
41. *Aeromonas hydrophila* in surface water and their removal using a POU technology for drinking in rural communities / L. Botero, L. Galeano, L. J. Montoya, [et al.] // Environmental Advances. – 2023. – Vol. 13. – P. 100425.
42. *Aeromonas hydrophila* ST251 and *Aeromonas dhakensis* are major emerging pathogens of striped catfish in Vietnam / K. L. Bartie, T. P. Ngô, M. Bekaert [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2023. – Vol. 13. – P. 1067235.
43. *Aeromonas hydrophila*-associated septicemia in captive crocodiles (*Crocodylus johnstoni* and *Crocodylus porosus*) / Y. S. Roh, H. Park, H. U. Cho [et al.] // Journal of Zoo and Wildlife Medicine. – 2011. – Vol. 42, № 4. – P. 738-742.
44. *Aeromonas* isolates from fish and patients in Tainan City, Taiwan: Genotypic and phenotypic characteristics / C. J. Wu, W. C. Ko, N. Y. Lee [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 2019. – Vol. 85, № 21. – P. e01360-19.
45. *Aeromonas lusitana* sp. nov., isolated from untreated water and vegetables / A. Martínez-Murcia, R. Beaz-Hidalgo, A. Navarro [et al.] // Current microbiology. – 2016. – Vol. 72. – P. 795-803.

46. *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs / D. Minana-Galbis, M. Farfan, M. C. Fuste [et al.] // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2004. – Vol. 54. – № 6. – P. 2073-2078.
47. *Aeromonas* nosocomial cluster: Investigation review of possible modes of transmission / A. Bisht, H. Gray, J. R. Caldera [et al.] // Antimicrobial Stewardship & Healthcare Epidemiology. – 2023. – Vol. 3, № S2. – P. s91-s92.
48. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish / R. Beaz-Hidalgo, A. Alperi, M. J. Figueras [et al.] // Systematic and Applied Microbiology. – 2009. – Vol. 32. – № 7. – P. 471-479.
49. *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs / G. Huys, P. Kämpfer, M. Altwegg [et al.] // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 1997. – Vol. 47, № 4. – P. 1165-1171.
50. *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet / M. J. Figueras, A. Alperi, R. Beaz-Hidalgo [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2011. – Vol. 61, № 2. – P. 242-248.
51. *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens / F. W. Hickman-Brenner, G. R. Fanning, M. J. Arduino [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 1988. – Vol. 26, № 8. – P. 1561-1564.
52. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces / C. Harf-Monteil, A. L. Flèche, P. Riegel [et al.] // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2004. – Vol. 54, № 2. – P. 481-485.
53. *Aeromonas* species from nonchlorinated distribution systems and their competitive planktonic growth in drinking water / N. van Bel, P. van der Wielen, B. Wullings [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2021. – Vol. 87, № 5. – P. e02867-20.

54. *Aeromonas* spp. in drinking water and food: Occurrence, virulence potential and antimicrobial resistance / J. Carusi, D. Y. Kabuki, P. M. de Seixas Pereira [et al.] // Food Research International. – 2023. – P. 113710.
55. *Aeromonas* spp. isolated from ready-to-eat seafood on the Norwegian market: prevalence, putative virulence factors and antimicrobial resistance / H. J. Lee, S. Hoel, B. T. Lunestad [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2021. – Vol. 130, № 4. – P. 1380-1393.
56. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., clinical species from Taiwan / A. Alperi, A. J. Martínez-Murcia, W. C. Ko [et al.] // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2010. – Vol. 60, № 9. – P. 2048-2055.
57. *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources / A. Demarta, M. Küpfer, P. Riegel [et al.] // Systematic and applied microbiology. – 2008. – Vol. 31, № 4. – P. 278-286.
58. *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens / A. M. Carnahan, T. Chakraborty, G. R. Fanning [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 1991. – Vol. 29, № 6. – P. 1206-1210.
59. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea / F. W. Hickman-Brenner, K. L. MacDonald, A. G. Steigerwalt [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 1987. – Vol. 25, № 5. – P. 900-906.
60. *Aeromonas*-associated infections in developing countries / K. S. Ghenghesh, S. F. Ahmed, R. A. El-Khalek [et al.] // The Journal of Infection in Developing Countries. – 2008. – Vol. 2, № 02. – P. 081-098.
61. Aislamiento e identificación de *Pseudomonas* sp. y *Aeromonas* sp. en aguas de piscinas públicas de Bogotá-Colombia / S. M. Estupiñán-Torres, S. L. Ávila de Navia, Y. L. López Orozco [et al.] // Nova. – 2017. – Vol. 15, № 27. – P. 25-29.

62. Akinbowale, O. L. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia / O. L. Akinbowale, H. Peng, M. D. Barton // *Journal of applied microbiology*. – 2006. – Vol. 100, № 5. – P. 1103-1113.
63. Alavandi, S. V. Typing of *Aeromonas* isolates from children with diarrhoea & water samples by randomly amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction & whole cell protein fingerprinting / S. V. Alavandi, S. Ananthan, N. P. Pramod // *Indian Journal of Medical Research*. – 2001. – Vol. 113. – P. 85.
64. Alcaide, E. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels / E. Alcaide, M. D. Blasco, C. Esteve // *Research in microbiology*. – 2010. – Vol. 161, № 1. – P. 40-45.
65. Al-Ghabshi, A. S. Bacteria Recovered from Aquaculture in Oman , with emphasis on *Aeromonas* spp. : dissertation for the degree of doctor of philosophy / Al-Ghabshi Alya Salim ; University of Stirling. – Stirling, 2015. - 213 p.
66. Allen, D. A. *Aeromonas media*, a new species isolated from river water / D. A. Allen, B. Austin, R. R. Colwell // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 1983. – Vol. 33, № 3. – P. 599-604.
67. Almjlawi, B. S. A. *Aeromonas hydrophila* / B. S. A. Almjlawi, S. A. Allaith // *Pathogenic bacteria*. –2021. - P. 144-160.
68. Alvestad, S. F. The prevalence of *Aeromonas* species in a Norwegian water treatment plant after disinfection: dissertation Master's Thesis / Alvestad Stian Fantoft ; Norwegian University of Life Sciences. - Ås, 2022. – 73 p.
69. An estimation of global *Aeromonas* infection prevalence in children with diarrhoea: a systematic review and meta-analysis / H. Sadeghi, A. Alizadeh, M. Vafaie [et al.] // *BMC pediatrics*. – 2023. – Vol. 23, № 1. – P. 254.
70. An insertion sequence-dependent plasmid rearrangement in *Aeromonas salmonicida* causes the loss of the type three secretion system / K. H. Tanaka, S.

- Dallaire-Dufresne, R. K. Daher [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 3. – P. e33725.
71. Analysis of virulence and immunogenic factors in *Aeromonas hydrophila*: Towards the development of live vaccines / X. L. Zhao, G. Wu, H. Chen [et al.] // Journal of fish diseases. – 2020. – Vol. 43, № 7. – P. 747-755.
 72. Antibiotic resistance and virulence factor gene profile of *A. hydrophila* isolated from carp (Cyprinidae) suspected with hemorrhagic septicemia in Gilan, Iran / A. Goudarztalejerdi, M. Yavari, M. Nouri Kalourazi [et al.] // Letters in Applied Microbiology. – 2022. – Vol. 75, № 5. – P. 1354-1365.
 73. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India / G. Vivekanandhan, K. Savithamani, A. A. M.Hatha [et al.] // International journal of food microbiology. – 2002. – Vol. 76, № 1-2. – P. 165-168.
 74. Antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. isolated from diseased walking catfish (*Clarias* sp.) / D. S.Mulia, A. Isnansetyo, R. Pratiwi [et al.] // Biodiversitas: Journal of Biological Diversity. – 2021. – Vol. 22, № 11. - P. 4839-4846.
 75. Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* spp. isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates / M. B. Awan, A. Maqbool, A. Bari [et al.] // The new microbiologica. – 2009. – Vol. 32, № 1. – P. 17-23.
 76. Antimicrobial resistance and resistance genes in aerobic bacteria isolated from pork at slaughter / L. Li, R. H. Olsen, L. Ye [et al.] // Journal of food protection – 2016. – Vol. 79, № 4. – P. 589-597.
 77. Antimicrobial resistance in *aeromonads* and new therapies targeting quorum sensing / B. Neil, G. L. Cheney, J. A. Rosenzweig [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2024. – Vol. 108, № 1. – P. 205.
 78. Antimicrobial resistance in *Aeromonas* species isolated from aquatic environments in Brazil / D. Conte, J. K. Palmeiro, A. A. Bavaroski [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2021. – Vol. 131, № 1. – P. 169-181.

79. Antimicrobial resistance in aquaculture: a crisis for concern / P. G. Preena, T. R. Swaminathan, V. J. R. Kumar [et al.] // *Biologia*. – 2020. – Vol. 75. – P. 1497-1517.
80. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents / M. Aravena-Román, T. J. Inglis, B. Henderson [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2012. – Vol. 56, № 2. – P. 1110-1112.
81. Antimicrobial susceptibility and characterization of outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* isolated in China / G. U. O. Peng, W. A. N. G. Na, Y. J. Liu [et al.] // *Journal of Integrative Agriculture*. – 2014. – Vol. 13, № 4. – P. 911-917.
82. Antimicrobial susceptibility profiles and resistance genes in genus *Aeromonas* spp. isolated from the environment and rainbow trout of two fish farms in France / N. Hayatgheib, S. Calvez, C. Fournel [et al.] // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9, № 6. – P. 1201.
83. Aquaculture and *Aeromonas hydrophila*: a complex interplay of environmental factors and virulence / B. Abdella, N. M. Shokrak, N. A. Abozahra [et al.] // *Aquaculture International*. – 2024. – P. 1-11.
84. Araujo, R. M. The effect of terrestrial effluents on the incidence of *Aeromonas* spp. in coastal waters / R. M. Araujo, R. Pares, F. Lucena // *Journal of Applied Microbiology*. – 1990. – Vol. 69, № 3. – P. 439-444.
85. Arshad, P. E. Pathogenicity and pathobiology of epizootic ulcerative syndrome (EUS) causing fungus *Aphanomyces invadans* and its immunological response in fish / P. E. Arshad, J. Arockiaraj // *Reviews in fisheries science*. – 2020. – Vol. 28, № 3. – P. 358-375.
86. Austin, B. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. / B. Austin, D. A. Austin – Springer, 2016. - ISBN978-94-007-4883-5.

87. Avsever, M. L. *Aeromonas hydrophila* isolation from Holland lop (*Oryctolagus cuniculus*) rabbits / M. L. Avsever, S. Eskiizmirliler, S. Tunalıgil // Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi. – 2015. – Vol. 26, № 1. – P. 21-22.
88. Aziz, S. Common bacterial diseases of fish: prevention and control strategies / S. Aziz, S. Abdullah // Veterinary Pathobiology & Public Health. – 2021. – P. 352.
89. Bacterial community and spoilage profiles shift in response to packaging in yellow-feather broiler, a highly popular meat in Asia / H. Wang, X. Zhang, G. Wang, [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. 2588.
90. Bacterial diversity analysis of freshwater sources for human use in rural areas of the tropical Andean region of Colombia / K. Bedoya, L. Galeano, M. M. Hincapié [et al.] // Infectio. – 2022. – Vol. 26, № 1. – P. 11-18.
91. Bacterial outer membrane vesicles (OMVs)-based dual vaccine for influenza A H1N1 virus and MERS-CoV / M. M. Shehata, A. Mostafa, L. Teubner [et al.] // Vaccines. – 2019. – Vol. 7, № 2. – P. 46.
92. Bacterial pathogens and factors associated with *Salmonella* contamination in hybrid red tilapia (*Oreochromis spp.*) cultivated in a cage culture system / V. Thaotumpitak, J. Sripradite, E. R. Atwill [et al.] // Food Quality and Safety. – 2022. – Vol. 6. – P. fya036.
93. Bacteriological studies on *Aeromonas* and *Pseudomonas* species in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* / A. El-Tawab, A. Awad, F. Elhofy [et al.] // Benha Veterinary Medical Journal. – 2019. – Vol. 37, № 1. – P. 144-148.
94. Barbary, M. I. Some clinical, microbiological and molecular characteristics of *Aeromonas hydrophila* isolated from various naturally infected fishes / M. I. Barbary // Aquaculture International. – 2010. – Vol. 18. – P. 943-954.
95. Barger, P. C. Type II secretion is essential for virulence of the emerging fish pathogen, hypervirulent *Aeromonas hydrophila* / P. C. Barger, M. R. Liles, J. C. Newton // Frontiers in veterinary science. – 2020. – Vol. 7. – P. 574113.

96. Bartie, K. L. *Aeromonas dhakensis*: A Zoonotic Bacterium of Increasing Importance in Aquaculture / K. L. Bartie, A. P. Desbois // Pathogens. – 2024. – Vol. 13, № 6. – P. 465.
97. Batra, P. *Aeromonas* spp.: an emerging nosocomial pathogen / P. Batra, P. Mathur, M. C. Misra // Journal of laboratory physicians. – 2016. – Vol. 8. – № 01. – P. 001-004.
98. Beaz-Hidalgo, R. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease / R. Beaz-Hidalgo, M. J. Figueras // Journal of fish diseases. – 2013. – Vol. 36, № 4. – P. 371-388.
99. Beaz-Hidalgo, R. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila* / R. Beaz-Hidalgo, A. Martínez-Murcia, M. J. Figueras // Systematic and applied microbiology. – 2013. – Vol. 36, N 3. – P. 171-176.
100. Bhowmick, U. D. Bacteriological, clinical and virulence aspects of-associated diseases in humans / U. D. Bhowmick, S. Bhattacharjee // Polish Journal of Microbiology. – 2018. – Vol. 67, № 2. – P. 137-150.
101. Bischofberger, M. Pathogenic pore-forming proteins: function and host response / M. Bischofberger, I. Iacovache, F. G. Van Der Goot // Cell host & microbe. – 2012. – Vol. 12, № 3. – P. 266-275.
102. BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp / M. Tacão, A. Alves, M. J. Saavedra [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. – 2005. – Vol. 88. – P. 173-179.
103. Bravo, A. F. Epidemiology and pathogenic characterization of species of the genus *Aeromonas*: dissertation Programa de Doctorado en Biomedicina por la Universidad Rovira i Virgili / Bravo Ana Fernández; Universitat Rovira i Virgili. - Tarragona, 2019. – 375 p.

104. Budiyanah, H. Identification, characterization and pathogenicity of *Aeromonas schubertii* isolated from diseased striped snakehead fish (*Channa Striata*) : dissertation Master of Science in Veterinary Science and technology / Budiyanah Hendri ; Chulalongkorn University. – Bangkok, 2021. - 144 p.
105. Carvalho, M. J. M. Diversity of *Aeromonas* species from different environments in Portugal / Maria João Mendes de Carvalho: Aveiro. - University of Aveiro. – 2010. – 255 p. - URL: <http://hdl.handle.net/10773/976>.
106. Characterization and antimicrobial resistance of environmental and clinical *Aeromonas* species isolated from freshwater ornamental fish and associated farming environment in Sri Lanka / P. M. Dhanapala, R. S. Kalupahana, A. W. Kalupahana, [et al.] // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9, № 10. – P. 2106.
107. Characterization of *Aeromonas hydrophila* wound pathotypes by comparative genomic and functional analyses of virulence genes / C. J. Grim, E. V. Kozlova, J. Sha, [et al.] // MBio. – 2013. – Vol. 4, № 2. – P. 10.1128/mbio.00064-13.
108. Characterization of *Aeromonas Spp.* by ERIC-PCR Genomic Fingerprinting Techniques / A. Sarkar, M. Saha, P. Roy [et al.] // The Journal of Plant Science Research. – 2010. – Vol. 26, № 2. – P. 213.
109. Chen, P. L. *Aeromonas dhakensis*, an increasingly recognized human pathogen / P. L. Chen, B. Lamy, W. C. Ko // Frontiers in Microbiology. – 2016. – Vol. 7. – P. 793.
110. Chironomid egg masses harbour the clinical species *Aeromonas taiwanensis* and *Aeromonas sanarellii* / R. Beaz-Hidalgo, T. Shakèd, S. Laviad [et al.] // FEMS microbiology letters. – 2012. – Vol. 337, № 1. – P. 48-54.
111. Chlorinated and ultraviolet radiation-treated reclaimed irrigation water is the source of *Aeromonas* found in vegetables used for human consumption / F. Latif-Eugenín, R. Beaz-Hidalgo, C. Silvera-Simón [et al.] // Environmental research. – 2017. – Vol. 154. – P. 190-195.

112. Christy, G. Determination of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* using the polymerase chain reaction (pcr) technique / G. Christy, R. Kusdawarti, D. Handijatno // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2019. – Vol. 236, № 1. – P. 012097.
113. Chromosome-mediated mcr-3 variants in *Aeromonas veronii* from chicken meat/ Z. Ling, W. Yin, H. Li [et al.] // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2017. – Vol. 61. – № 11. – P. 10.1128/aac.01272-17.
114. Cianciotto N. P. Expanding role of type II secretion in bacterial pathogenesis and beyond / N. P. Cianciotto, R. C. White // Infection and immunity. – 2017. – Vol. 85, № 5. – P. 10.1128/iai.00014-17.
115. Cipriano, R. C. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. / R. C. Cipriano // US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Division of Fishery Research, - 1984. – Vol. 68.
116. Classification of a hypervirulent *Aeromonas hydrophila* pathotype responsible for epidemic outbreaks in warm-water fishes / C. R. Rasmussen-Ivey, M. J. Hossain, S. E. Odom [et al.] // Frontiers in microbiology. – 2016. – Vol. 7. – P. 1615.
117. Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan / C. J. Wu, J. J. Wu, J. J. Yan [et al.] // Journal of Infection. – 2007. – Vol. 54, № 2. – P. 151-158.
118. Comparative and evolutionary genomics of isolates provide insight into the pathoadaptation of *Aeromonas* / E. Talagrand-Reboul, S. M. Colston, J. Graf [et al.] // Genome Biology and Evolution – 2020. – Vol. 12, № 5. – P. 535-552.
119. Comparative genome analysis provides deep insights into *Aeromonas hydrophila* taxonomy and virulence-related factors / F. Awan, Y. Dong, J. Liu [et al.] // BMC genomics. – 2018. – Vol. 19. – P. 1-18.
120. Comparative genomics of *Aeromonas hydrophila* secretion systems and mutational analysis of hcp1 and vgrG1 genes from T6SS / H. C. Tekedar, H.

- Abdelhamed, S. Kumru [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Vol. 9. – P. 3216.
121. Comparative study of the genetic diversity, antimicrobial resistance, and pathogenicity of *Aeromonas* isolates from clinical patients and healthy individuals / M. E. N. G. Shuang, X. L. Du, Y. L. Wang [et al.] // *Biomedical and Environmental Sciences*. – 2021. – Vol. 34, № 6. – P. 454-464.
122. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish / R. Beaz-Hidalgo, A. Alperi, N. Buján [et al.] // *Systematic and applied microbiology*. – 2010. – Vol. 33, № 3. – P. 149-153.
123. Comparison of the efficacy of two phenotypic identification kits and classic PCR methods to identify *Aeromonas hydrophila* isolated from fish farms / Ş. Balcı, Z. Z. İpek, A. Er, [et al.] // *Aquatic Research*. – 2023. – Vol. 6, № 2. – P. 125-132.
124. Comparison of the multiple platforms to identify various *Aeromonas* species / X. Du, M. Wang, H. Zhou [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 11. – P. 625961.
125. Complete genome sequence data of multidrug-resistant *Aeromonas hydrophila* Ah27 isolated from intussusception channel catfish (*Ictalurus punctatus*) / X. Li, B. Shang, X. Zhang [et al.] // *Gene Reports*. – 2023. – Vol. 33. – P. 101807.
126. Complete Genome Sequence of *Aeromonas hydrophila* Strain Y-S01, Isolated from Diseased Dark Sleeper (*Odontobutis potamophila*) in China / Y. Zhao, S. Zhang, H. Liu [et al.] // *Microbiology Resource Announcements*. – 2023. – Vol. 12. – № 4. – P. e00933-22.
127. Complete genome sequence of fish-pathogenic *Aeromonas hydrophila* HX-3 and a comparative analysis: insights into virulence factors and quorum sensing / L. Jin, Y. Chen, W. Yang [et al.] // *Scientific reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 15479.

128. Comprehensive analysis reveals the evolution and pathogenicity of *Aeromonas*, viewed from both single isolated species and microbial communities / C. Zhong, M. Han, P. Yang [et al.] // *Msystems*. – 2019. – Vol. 4, N 5. – P. 10.1128/msystems.00252-19.
129. Consumer purchasing behaviour towards fish and seafood products. Patterns and insights from a sample of international studies / D. Carlucci, G. Nocella, B. de Devitiis [et al.] // *Appetite*. – 2015. – Vol. 84. – P. 212-227.
130. Crystal Prevalence and susceptibility to antibiotics of motile strains of *Aeromonas isolated* from the mangrove oyster (*Crassostrea rhizophorae*) / D. Munoz, Y. Castaneda de Fermin, C. Graüde Marín [et al.] // *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia* – 2012.- Vol. 22, № 6. - P. 565-573.
131. Dallah, M. M. S. Study of prevalence and antibiotic resistance in *Aeromonas* species isolated from minced meat and chicken samples in Iran / M. M. S. Dallah, M. K. S. Yazdi, S. Avadisians // *African Journal of Microbiology Research*. – 2012. – Vol. 6, № 2. – P. 460-464.
132. Damage of eukaryotic cells by the pore-forming toxin sticholysin II: Consequences of the potassium efflux / S. Cabezas, S. Ho, U. Ros [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2017. – Vol. 1859, № 5. – P. 982-992.
133. Diagnosis of motile *Aeromonas sobria* from cat fishes with septicemia by PCR / A. Das, A. Rathore, C. Janani [et al.] // *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*. – 2013. – Vol. 2. – P. 87-91.
134. de Alegría-Puig, C. R. Epidemiology of *Aeromonas spp.* isolated from stool in a tertiary hospital in Cantabria, Northern Spain, in the last five years / C. R. de Alegría-Puig, M. Fernández-Martínez, A. D. M. Pintos-Fonseca // *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. – 2023. – Vol. 41, № 4. – P. 211-214.

135. DeLong, E. F. The prokaryotes: gammaproteobacterial / Edward F. DeLong [et al.] ; Editors: Eugene Rosenberg, Edward F. DeLong, Stephen Lory, Erko Stackebrandt, Fabiano Thompso – Berlin : Springer Berlin Heidelberg, 2014. – 768 p.- ISBN 978-3-642-38921-4.
136. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR / G. Wang, C. G. Clark, C. Liu, [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 2003. – Vol. 41, № 3. – P. 1048-1054.
137. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish / M. Nawaz, S. A. Khan, A. A. Khan [et al.] // Food microbiology. – 2010. – Vol. 27, № 3. – P. 327-331.
138. Detection and distribution of virulence genes in *Aeromonas hydrophila* isolates causing infection in cultured carps / M. Ahangarzadeh, M. G. Najafabadi, R. Peyghan, [et al.] // Veterinary Research Forum. – Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. - 2022. – Vol. 13, № 1. – P. 55.
139. Detection of *Aeromonas hydrophila* in a drinking-water distribution system: a field and pilot study / C. Chauret, C. Volk, R. Creason [et al.] // Canadian journal of microbiology. – 2001. – Vol. 47, N 8. – P. 782-786.
140. Detection of hemolytic strains of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* along with other *Aeromonas* spp. from fish and fishery products by multiplex PCR / I. A. Hussain, G. Jeyasekaran, R. J. Shakila [et al.] // Journal of food science and technology. – 2014. – Vol. 51. – P. 401-407.
141. Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish/ J. Li, X. D. Ni, Y. J. Liu [et al.] //Journal of Applied Microbiology. – 2011. – Vol. 110, № 3. – P. 823-830.
142. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes

- / M. E. Martino, L. Fasolato, F. Montemurro [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 2011. – Vol. 77, № 14. – P. 4986-5000.
143. Development of diagnostic and vaccine markers through cloning, expression, and regulation of putative virulence-protein-encoding genes of *Aeromonas hydrophila* / V. Singh, D. K. Chaudhary, I. Mani [et al.] // Journal of Microbiology. – 2013. – Vol. 51. – P. 275-282.
144. Development of TaqMan real-time PCR in detection of *Aeromonas hydrophila* / H. B. Wang, D. C. Wang, Z. Q. Bi [et al.] // Zhonghua yu Fang yi xue za zhi [Chinese Journal of Preventive Medicine]. – 2009. – Vol. 43, № 7. – P. 611-614.
145. Diagnostic methods for identifying different *Aeromonas* species and examining their pathogenicity factors, their correlation to cytotoxicity and adherence to fish mucus / V. Jung-Schroers, A. Jung, M. Ryll [et al.] // Journal of fish diseases. – 2019. – Vol. 42, № 2. – P. 189-219.
146. Diseases caused by bacterial pathogens in inland water / H. Wakabayashi, T. Yoshida, T. Nomura [et al.] // Fish Diseases. – 2016. – P. 122-189.
147. Distribution of multi-virulence factors among *Aeromonas* spp. isolated from diseased *Xiphophorus helleri* / S. Das, R. Aswani, B. Jasim [et al.] // Aquaculture International. – 2020. – Vol. 28. – P. 235-248.
148. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission / B. K. Khajanchi, A. A. Fadl, M. A. Borchardt [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 2010. – Vol. 76, № 7. – P. 2313-2325.
149. Distribution of virulence factors, determinants of antibiotic resistance and molecular fingerprinting of *Salmonella* species isolated from cattle and beef samples: suggestive evidence of animal-to-meat contamination / B. S. Dlamini, P. K. Montso, A. Kumar [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2018. – Vol. 25, № 32. – P. 32694-32708.

150. Diversity and characterization of culturable haloalkaliphilic bacteria from two distinct hypersaline lakes in northern Egypt / M. A. Arayes, M. E. Mabrouk, S. A. Sabry [et al.] // *Biologia*. – 2021. – Vol. 76. – P. 751-761.
151. Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent / S. L. McLellan, S. M. Huse, S. R. Mueller-Spitz [et al.] // *Environmental microbiology*. – 2010. – Vol. 12, № 2. – P. 378-392.
152. Diversity of virulence-associated genes in *pathogenic Aeromonas hydrophila* isolates and their in vivo modulation at varied water temperatures / S. Pattanayak, S. Priyadarsini, A. Paul [et al.] // *Microbial Pathogenesis*. – 2020. – Vol. 147. – P. 104424.
153. *E. coli: O157* and *Salmonella* spp. in water and sediment from leafy green produce farms and streams on the Central California coast / L. Benjamin, E. R. Atwill, M. Jay-Russell [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2013. – Vol. 165, № 1. – P. 65-76.
154. Effect of disinfectants on adhered *Aeromonas hydrophila* to polyethylene immersed in water under static and dynamic conditions / C. Lontsi Djimeli, M. Nola, A. Tamsa Arfao [et al.] // *International Journal of Research in BioSciences*. – 2013. – Vol. 2, № 2. – P. 33-48.
155. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health / I. H. Igbinosa, E. U. Igumbor, F. Aghdasi, [et al.] // *The Scientific World Journal*. – 2012. – Vol. 2012, № 1. – P. 625023.
156. Emerging extra-intestinal infections with *Aeromonas hydrophila* in coastal region of southern Karnataka / C. Mukhopadhyay, K. Chawla, Y. Sharma [et al.] // *Journal of postgraduate medicine*. – 2008. – Vol. 54, N 3. – P. 199-202.
157. Environmental factors on virulence of *Aeromonas hydrophila* / R. E. Abreu, T. C. Magalhães, R. C. Souza [et al.] // *Aquaculture international*. – 2018. – Vol. 26. – P. 495-507.

158. Environmental factors on virulence of *Aeromonas hydrophila* / R. E. Abreu, T. C. Magalhães, R. C. Souza [et al.] // *Aquaculture international*. – 2018. – Vol. 26. – P. 495-507.
159. Epa, U. S. EPA office of water *Aeromonas*: human health criteria document / U. S. Epa // *Sci. Technol.* (March). – 2006.
160. Escajadillo, T. Pharmacological targeting of pore-forming toxins as adjunctive therapy for invasive bacterial infection / T. Escajadillo, V. Nizet // *Toxins*. – 2018. – Vol. 10, № 12. – P. 542.
161. Establishment of a Rapid LAMP Assay for *Aeromonas hydrophila* and Comparison with the Application of qPCR / Z. Gao, C. Yang, X. Zhang [et al.] // *Metabolites*. – 2023. – Vol. 13, № 7. – P. 841.
162. Esteve, C. *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels / C. Esteve, M. C. Gutiérrez, A. Ventosa // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1995. – Vol. 45, № 3. – P. 462-466.
163. Eugén, F. Evaluation of different conditions and culture media for the recovery of *Aeromonas* spp. from water and shellfish samples / F. Eugén, R. Beaz-Hidalgo, M. J. Figueras // *Journal of Applied Microbiology*. – 2016. – Vol. 121, N 3. – P. 883-891.
164. Evaluation of the microbiological quality of reclaimed water produced from a lagooning system / X. Fernandez-Cassi, C. Silvera, S. Cervero-Aragó [et al.] // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2016. – Vol. 23. – P. 16816-16833.
165. Fatal septicemia and endotoxic shock due to *Aeromonas hydrophila* / N. Takahashi, K. Tanabe, M. Wake [et al.] // *The American Journal of Case Reports*. – 2012. – Vol. 13. – P. 72.
166. Feiner, G. *The Microbiology of Specific Bacteria. Meat Products Handbook.* / G. Feiner, – 2006.- 648 p. - ISBN 9780849380105.

167. Fernández-Bravo, A. An update on the genus *Aeromonas*: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity / A. Fernández-Bravo, M. J. Figueras // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8, № 1. – P. 129.
168. Figueras, M. J. *Aeromonas* infections in humans / M. J. Figueras, R. Beaz-Hidalgo // *Aeromonas*. – 2015. – P. 65-108.
169. Figueras, M. J. *Aeromonas* / M. J. Figueras, R. Beaz-Hidalgo, // *Encyclopedia of Food Microbiology*, eds C. Batt and M. L. Tortorello (Oxford: Elsevier Ltd). - 2014.–P. 25–30.
170. Figueras, M. J. New perspectives in monitoring drinking water microbial quality / M. J. Figueras, J. J. Borrego // *International journal of environmental research and public health*. – 2010. – Vol. 7, № 12. – P. 4179-4202.
171. First record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply/ M. J. Figueras, A. Suarez-Franquet, M. R. Chacon [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – Vol. 71, № 1. – P. 538-541.
172. Fish disease management and biosecurity systems / M. Opiyo, V. Mziri, S. Musa [et al.] // *State of Aquaculture in Kenya*. – 2020. – P. 97-126.
173. The State of World Fisheries and Aquaculture. towards blue transformation : Fisheries F. A. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 2022. – 266 p. - ISBN: 978-92-5-136364-5.
174. Fitria, M. D. Development of a co-agglutination method for detection of *Aeromonas hydrophila* as causative agent of motile *Aeromonas* septicemia (MAS) disease in gourami (*Osphronemus goramy*) / M. D. Fitria, S. Sukenda, M. Yuhana // *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. – 2021. – Vol. 20, № 1. – P. 141-156.
175. Foley S. L., Lynne A. M., Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens / S. L. Foley, A. M. Lynne, R. Nayak // *Infection, Genetics and Evolution* – 2009. – Vol. 9, № 4. – P. 430-440.

176. Frederiksen, W. Proposed New Bacterial Taxa and Proposed Changes of Bacterial Names Published During 1998 and considered to be of Interest to Medical or Veterinary Bacteriology: An informational note / W. Frederiksen, J. Magee, J. Ursing // Zentralblatt für Bakteriologie. – 1999. – Vol. 289, № 4. – P. 381-388.
177. Freitas, A. R. Antibiotic susceptibility testing for therapy and antimicrobial resistance surveillance: genotype beats phenotype? / A. R. Freitas, G. Werner // Future Microbiology. – 2022. – Vol. 17, № 14. – P. 1093-1097.
178. Frey, J. Type III secretion system of *Aeromonas salmonicida* undermining the Host's immune response / J. Frey, F. C. Origgi // Frontiers in Marine Science. – 2016. – Vol. 3. – P. 130.
179. Fulminant fatal pneumonia and bacteremia due to *Aeromonas dhakensis* in an immunocompetent man: a case report and literature review / L. Jiang, Q. Zhao, D. Li [et al.] // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2024. – Vol. 14. – P. 1359422.
180. Ganesan, M. Isolation and Identification of *Aeromonas sp.* from Fishes / M. Ganesan, R. Mani, S. Sai // Aquaculture Microbiology. – New York, NY: Springer US, - 2023. – P. 3-10.
181. Garrity, G. M. Manual of Systematic Bacteriology: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. / G. M. Garrity, J. T. Stanley Bergey's //– Springer. New York. - 2006. - ISBN 978-0-387-98771-2.
182. Genes de virulencia en *Aeromonas spp.* (*Aeromonadales: Aeromonadaceae*) aisladas de *Oreochromis spp.* (Perciformes: Cichlidae) para consumo humano en México / J. L. Ortega-Balleza, A. Sánchez-Varela, I. C. Rodríguez-Luna [et al.] // Revista de Biología Tropical. – 2018. – Vol. 66, № 4. – P. 1606-1613.
183. Genetic diversity, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Aeromonas* isolates from clinical patients, tap water systems, and food / M. E. N G. Shuang,

- Y. L. Wang, C. G. Liu [et al.] // Biomedical and Environmental Sciences. – 2020. – Vol. 33, № 6. – P. 385-395.
184. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades / R. Seshadri, S. W. Joseph, A. K. Chopra [et al.] // Journal of bacteriology. – 2006. – Vol.188, № 23. – P. 8272-8282.
185. Genome sequence of the emerging pathogen *Aeromonas caviae* / S. A. Beatson, M. das Graças de Luna, N. L. Bachmann [et al.] // Journal of Bacteriology. – 2011. – Vol.193, № 5. – P. 1286-1287.
186. Genotyping of *Aeromonas hydrophila* by Box elements / V. Singh, D. K. Chaudhary, I. Mani [et al.] // Microbiology. – 2010. – Vol. 79. – P. 370-373.
187. Green, E. R. Bacterial secretion systems: an overview / E. R. Green, J. Mecsas // Virulence mechanisms of bacterial pathogens. – 2016. – P. 213-239.
188. Griffin, P. J. Pigment formation by *Bacterium salmonicida* / P. J. Griffin, S. F. Snieszko, S. B. Friddle // Journal of Bacteriology. – 1953. – Vol. 65, № 6. – P. 652-659.
189. Grilo M. Mesophilic *Aeromonas* in Threatened Iberian Leuciscids: Conservation and Public Health Implications: dissertation thesis specially prepared to obtain the degree of Doctor of Veterinary Sciences in the specialty of Animal Health / Grilo Miguel ; Universidade de Lisboa. - Lisbon, 2022. – 213 p.
190. Grim, C. J. *Aeromonas* and *Plesiomonas* / C. J. Grim, C. A. Whitehouse // Foodborne Infections and Intoxications. – Academic Press, 2021. – P. 237-252.
191. Guz, L. Antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* isolated from farmed carp (*Cyprinus carpio* L.) / L. Guz, A. Kozinska // Bull Vet Inst Pulawy. – 2004. – Vol. 48. – P. 391-395.
192. Hanson, L. A. Motile *Aeromonas* septicemia (MAS) in fish / L. A. Hanson, W. G. Hemstreet, J. P. Hawke // SRAC PublicationN – 2019 -№ 0478-P.1-5.
193. Harnisz, M. The prevalence of multidrug-resistant *Aeromonas spp.* in the municipal wastewater system and their dissemination in the environment / M.

- Harnisz, E. Korzeniewska // Science of the Total Environment. – 2018. – Vol. 626. – P. 377-383.
194. Heuzenroeder, M. W. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model / M. W. Heuzenroeder, C. Y. F. Wong, R. L. P. Flower // FEMS microbiology Letters. – 1999. – Vol. 174., № 1. – P. 131-136.
195. High antigenic cross-reaction among the bacterial species responsible for diseases of cultured freshwater fishes and strategies to overcome it for specific serodiagnosis / G. Pandove, P. P. Sahota, V. Achal [et al.] // Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. – 2003. – Vol. 26, № 3. – P. 199-211.
196. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms / K. A. Berg, C. Lyra, K. Sivonen [et al.] // The ISME journal. – 2009. – Vol. 3, № 3. – P. 314-325.
197. Hoel, S. Growth and spoilage potential of an *Aeromonas salmonicida* strain in refrigerated Atlantic cod (*Gadus morhua*) stored under various modified atmospheres / S. Hoel, J. Lerfall, A. N. Jakobsen // Foods. – 2022. – Vol. 11, № 18. – P. 2757.
198. Hoel, S. Species distribution and prevalence of putative virulence factors in mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from fresh retail sushi / S. Hoel, O. Vadstein, A. N. Jakobsen // Frontiers in Microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. 931.
199. Hoel, S. The significance of mesophilic *Aeromonas* spp. in minimally processed ready-to-eat seafood / S. Hoel, O. Vadstein, A. N. Jakobsen // Microorganisms. – 2019. – Vol. 7, № 3. – P. 91.
200. Horizontal gene transfer and its association with antibiotic resistance in the genus *Aeromonas* spp / J. M. Bello-López, O. A. Cabrero-Martínez, G. Ibáñez-Cervantes [et al.] // Microorganisms. – 2019. – Vol. 7, № 9. – P. 363.

201. Horneman, A. *Vibrio, Aeromonas, Plesiomonas, and Campylobacter* species / A. Horneman, D. A. Josko // Dalam: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G, editor. Textbook of Diagnostic Microbiology. Maryland Heights, Missouri. Elsevier. – 2011. – P. 475-80.
202. Hunter, P. R. Isolation of *Aeromonas caviae* from ice-cream / P. R. Hunter, S. H. Burge // Letters in Applied Microbiology. – 1987. – Vol. 4. – № 3. – P. 45-46.
203. Hutinel, M. Antibiotic resistance genes of emerging concern in municipal and hospital wastewater from a major Swedish city / M. Hutinel, D. G. J. Larsson, C. F. Flach // Science of the Total Environment. – 2022. – Vol. 812. – P. 151433.
204. Huys, G. The family *Aeromonadaceae* / G. Huys // The Prokaryotes-Gammaproteobacteria Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. – 2014. – C. 27-57.
205. A novel detection method for the pathogenic *Aeromonas hydrophila* expressing *aerA* gene and/or *hlyA* gene based on dualplex RAA and CRISPR/Cas12a / Z. Lin, J. Lu, S. Wu [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2022. – Vol. 13. – P. 973996.
206. Identification and characterization of virulent *Aeromonas hydrophila* Ah17 from infected *Channa striata* in river Cauvery and in vitro evaluation of shrimp chitosan / V. Samayanpaulraj, M. Sivaramapillai, S. N. Palani [et al.] // Food science & nutrition – 2020. – Vol. 8, № 2. – P. 1272-1283.
207. Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods / M. Pablos, G. Huys, M. Cnockaert [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2011. – Vol. 147, № 3. – P. 203-210.
208. Identification of a pore-forming protein from sea anemone *Anthopleura dowii* Verrill (1869) venom by mass spectrometry / S. Ramírez-Carretero, E. I. Pérez-García, S. I. Salazar-García [et al.] // Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. – 2019. – Vol. 25. – P. e147418.

209. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes / N. Borrell, S. G. Acinas, M. J. Figueras [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 1997. – Vol. 35, № 7. – P. 1671-1674.
210. Identification of clinical aeromonas species by rpoB and gyrB sequencing and development of a multiplex PCR method for detection of *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, and *A. media* / S. Persson, S. Al-Shuweli, S. Yapici [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 2015. – Vol. 53, № 2. – P. 653-656.
211. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China / M. Hu, N. Wang, Z. H. Pan [et al.] // Letters in applied microbiology. – 2012. – Vol. 55, № 3. – P. 224-233.
212. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from healthy Northern snakehead (*Channa argus*) in China / D. X. Zhang, Y. H. Kang, M. F. Song [et al.] // Letters in applied microbiology. – 2019. – Vol. 69, N 2. – P. 100-109.
213. Impact of stress on *Aeromonas* diversity in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and lectin level change towards a bacterial challenge / D. S. Marques, D. A. Ferreira, P. M. Paiva [et al.] // Environmental technology. – 2016. – Vol. 37, № 23. – P. 3030-3035.
214. Implication of lateral genetic transfer in the emergence of *Aeromonas hydrophila* isolates of epidemic outbreaks in channel catfish / M. J. Hossain, G. C. Waldbieser, D. Sun [et al.] // PloS one. – 2013. – Vol. 8, № 11. – P. e80943.
215. In silico comparative analysis of *Aeromonas* type VI secretion system / B. Moriel, K. de Campos Prediger, E. M. de Souza [et al.] // Brazilian Journal of Microbiology. – 2021. – Vol. 52, № 1. – P. 229-243.
216. Incidence of *Aeromonas spp.* infection in fish and chicken meat and its related public health hazards: A review / P. K. Praveen, C. Debnath, S. Shekhar [et al.] // Veterinary world. – 2016. – Vol. 9, № 1. – P. 6.

217. Independent predictors of mortality for *Aeromonas* necrotizing fasciitis of limbs: an 18-year retrospective study / T. Y. Huang, K. T. Peng, W. H. Hsu [et al.] // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 7716.
218. Instant, visual, and instrument-free method for on-site screening of GTS 40-3-2 soybean based on body-heat triggered recombinase polymerase amplification / R. Wang, F. Zhang, L. Wang [et al.] // Analytical chemistry. – 2017. – Vol. 89, N 8. – P. 4413-4418.
219. Investigation of the prevalence, virulence genes, and antibiogram of motile Aeromonads isolated from Nile tilapia fish farms in Egypt and assessment of their water quality / F. A. El-Gohary, E. Zahran, E. A. Abd El-Gawad [et al.] // Animals. – 2020. – Vol. 10, № 8. – P. 1432.
220. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China? / M. E. Nielsen, L. Høi, A. S. Schmidt [et al.] // Diseases of aquatic organisms. – 2001. – Vol. 46, № 1. – P. 23-29.
221. Is characterization of a single isolate sufficient for valid publication of a new genus or species? Proposal to modify recommendation 30b of the Bacteriological Code (1990 Revision) / H. Christensen, M. Bisgaard, W. Frederiksen [et al.] // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2001. – Vol. 51, № 6. – P. 2221-2225.
222. Isolation and genotypic characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* O157: H7 and *Aeromonas hydrophila* from selected freshwater sources in Southwest Nigeria / M. A. Bisi-Johnson, A. A. Adedeji, A. A. Sulaiman [et al.] // Scientific Reports. – 2023. – Vol. 13, № 1. – P. 10746.
223. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from *Cyprinidae* suspected with hemorrhagic septicemia in pools of warm water fishes in Gilan Province / J. Tolouei Gilani, A. Goudarztalejerdi, M. Yavari [et al.] // International Journal of Nutrition Sciences. – 2021. – Vol. 6, N 1. – P. 52-58.

224. Isolation and molecular identification of *Aeromonas* species from the tank water of ornamental fishes / Y. Y. Cheok, S. M. Pua, K. H. [et al.] // *Acta Veterinaria Hungarica*. – 2020. – Vol. 68, № 2. – P. 130-139.
225. Isolation of *Aeromonas hydrophila* and Evaluation of Its Pathological Effects on Koi Fish (*Cyprinus carpio*) / S. S. Alavinezhad, R. Kazempour, A. Ghorbanzadeh [et al.] // *Iranian Journal of Medical Microbiology*. – 2021. – Vol. 15, № 4. – P. 465-476.
226. Janda, J. M. *16S rRNA* gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls / J. M. Janda, S. L. Abbott // *Journal of clinical microbiology*. – 2007. – Vol. 45, N 9. – P. 2761-2764.
227. Janda, J. M. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection / J. M. Janda, S. L. Abbott // *Clinical microbiology reviews*. – 2010. – Vol. 23, № 1. – P. 35-73.
228. John, N. Effect of pH and salinity on the production of extracellular virulence factors by *Aeromonas* from food sources / N. John, V. B. Vidyalakshmi, A. A. M. Hatha // *Journal of food science*. – 2019. – Vol. 84, N 8. – P. 2250-2255.
229. Judicial Opinions 123–127 / D. R. Arahal, C. T. Bull, H. J. Busse [et al.] // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2022. – Vol. 72, № 12. – P. 005708.
230. *Manual of clinical microbiology* / Editor : James A. Karlowicz, Michael A. Pfaller, Karen C. Carroll [et al.]. – ASM Press, 2023. - ISBN 978-1-68367-429-0.
231. Khan, S. J. Thin-film fixed-bed reactor for solar photocatalytic inactivation of *Aeromonas hydrophila*: influence of water quality / S. J. Khan, R. H. Reed, M. G. Rasul // *BMC microbiology*. – 2012. – Vol. 12. – P. 1-13.
232. Khatua, S. R. Study on oral and cloacal microflora of snake : dissertation for the award the degree of Master of Veterinary Science (Veterinary Microbiology)

- /Khatua Soumya Ranjan ; Odisha University of Agriculture and Technology. - Bhubaneswar, 2020. – 58 p.
233. Korotkov, K. V. Architecture, function, and substrates of the type II secretion system / K. V. Korotkov, M. Sandkvist // *EcoSal Plus*. – 2019. – Vol. 8, № 2. – P. 10.1128/ecosalplus. ESP-0034-2018.
234. Korotkov, K. V. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism / K. V. Korotkov, M. Sandkvist, W. G. J. Hol // *Nature Reviews Microbiology*. – 2012. – Vol. 10, № 5. – P. 336-351.
235. Koutsoumanis, K. P. Food safety: Emerging pathogens / K. P. Koutsoumanis, A. Lianou, J. N. Sofos // *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. – 2014. – P. 250.
236. LAMP diagnostics at the point-of-care: emerging trends and perspectives for the developer community / T. J. Moehling, G. Choi, L. C. Dugan [et al.] // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. – 2021. – Vol. 21, № 1. – P. 43-61.
237. Lamy, B. *Aeromonas*: the multifaceted middleman in the One Health world / B. Lamy, S. Baron, O. Barraud // *Current Opinion in Microbiology*. – 2022. – Vol.65. – P. 24-32.
238. Latif-Eugenín, F. Evaluation of different conditions and culture media for the recovery of *Aeromonas* spp. from water and shellfish samples / F. Latif-Eugenín, R. Beaz-Hidalgo, M. J. Figueras // *Journal of Applied Microbiology*. – 2016. – Vol. 121, № 3. – P. 883-891.
239. Latif-Eugenín F., Beaz-Hidalgo R., José F. M. A culture independent method for the detection of *Aeromonas* sp. from water samples // *Italian journal of food safety*. – 2016. – Vol. 5, N 1.
240. Legario F. S. Investigating infectious bacterial diseases affecting farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from the Philippines: dissertation for the degree of doctor of philosophy / Legario Francis S ; Norwegian University of Life Sciences. - Ås, Norwegia, 2021. – 431 p.

241. Liu, D. *Aeromonas* / Liu, D. // Molecular Medical Microbiology. – Academic Press, 2015. – P. 1099-1110.
242. Living in an extremely polluted environment: clues from the genome of melanin-producing *Aeromonas salmonicida subsp. pectinolytica* 34meIT / M. E. Pavan, E. E. Pavan, N. I. López [et al.]. // Applied and environmental microbiology. – 2015. – Vol. 81, № 15. – P. 5235-5248.
243. Longitudinal assessment of the dynamics of *Escherichia coli*, total coliforms, *Enterococcus spp.*, and *Aeromonas spp.* in alternative irrigation water sources: a CONSERVE Study / S. Solaiman, S. M. Allard, M. T. Callahan, [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 2020. – Vol. 86, № 20. – P. e00342-20.
244. Longitudinal Survey of *Aeromonas hydrophila* and Foodborne Pathogens in a Commercial Aquaponics System / J. Dorick, G. D. Kumar, D. Macarisin [et al.] // Journal of Food Protection – 2024. – Vol. 87, № 3. – P. 100230
245. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects / T. Notomi, Y. Mori, N. Tomita [et al.] // Journal of microbiology. – 2015. – Vol. 53. – № 1. – P. 1-5.
246. Lotrakul, P. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004 / P. Lotrakul, S. Dharmsthiti // Journal of Biotechnology. – 1997. – Vol. 54, № 2. – P. 113-120.
247. Mahon, C. R. Textbook of Diagnostic Microbiology-E-Book: Textbook of Diagnostic Microbiology-E-Book. / Connie R. Mahon, Donald C. Lehman – Elsevier Health Sciences, 2022. – 1088 p. ISBN 978-0-323-83271-7 URL: https://books.google.ru/books/about/Textbook_of_Diagnostic_Microbiology_E_Bo.html?hl=ru&id=L5iZEAAAQBAJ&redir_esc=y.
248. Mailafia, S. Phenotypic Characterization of *Aeromonas hydrophila* Isolates in Fresh Water Fishes in FCT Using Microbact™ GNB 24E Identification Kit / S. Mailafia // Open Access Library Journal. – 2021. – Vol. 8, № 01. – P. 1.

249. Marti, E. *Aeromonas rivipollensis* sp. nov., a novel species isolated from aquatic samples / E. Marti, J. L. Balcázar // Journal of basic microbiology. – 2015. – Vol.55, № 12. – P. 1435-1439.
250. Martin-Carnahan, A. *Aeromonadales* ord. nov / A. Martin-Carnahan, S. W. Joseph // Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. – Springer. Boston. MA. - 2005. – C. 556-587.
251. Martin-Carnahan, A. *Aeromonas* / A. Martin-Carnahan, S. W. Joseph // Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. – 2015. – P. 1-44.
252. Martinez-Murcia, A. J. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations / A. J. Martinez-Murcia, S. Benlloch, M. D. Collins // International Journal of systematic and evolutionary microbiology. – 1992. – Vol. 42, № 3. – P. 412-421.
253. Martino M. E. Determination of the genetic diversity and microlabial adaptation of *Aeromonas* spp.: Academic dissertation for the degree of Doctor of Philosophy / Martino Maria Elena; University of Padua. - Padua, Italy, 2013. - 172 p.
254. Matys, J. Role of bacterial secretion systems and effector proteins—insights into *Aeromonas* pathogenicity mechanisms / J. Matys, A. Turska-Szewczuk, A. Sroka-Bartnicka // Acta Biochimica Polonica. – 2020. – Vol. 67. – № 3. – P. 283-293.
255. Mekasha, S. Secretion systems in gram-negative bacterial fish pathogens / S. Mekasha, D. Linke // Frontiers in Microbiology. – 2021. – Vol. 12. – P. 782673.
256. Melas, D. S. Enumeration and confirmation of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, and *Aeromonas sobria* isolated from raw milk and other milk products in Northern Greece / D. S. Melas, D. K. Papageorgiou, A. I. Mantis // Journal of Food protection. – 1999. – Vol. 62, № 5. – P. 463-466.

257. Mendoza-Barberá, E. Molecular Pathogenesis of *Aeromonas* Infection / E. Mendoza-Barberá, S. Merino, J. M. Tomás // Molecular Food Microbiology. – CRC Press.–2021. – P. 187-212.
258. Mendoza-Barberá, E. Surface glucan structures in *Aeromonas spp* / E. Mendoza-Barberá, S. Merino, J. Tomás // Marine Drugs. – 2021. – Vol. 19, № 11. – P. 649.
259. Metz, J. M. Delineation of *Aeromonas hydrophila* pathotypes by detection of putative virulence factors using polymerase chain reaction and nematode challenge assay: dissertation for the Master of Science Degree in Integrative Biology / Metz John Michael ; Kennesaw State University. - Kennesaw, Georgia, United States, 2015. – 95 p.
260. Mizan, M. F. R. Microbial biofilms in seafood: a food-hygiene challenge / M. F. R. Mizan, I. K. Jahid, S. D. Ha // Food microbiology. – 2015. – Vol. 49. – P. 41-55.
261. Molecular and phenotypic analysis of hemolytic *Aeromonas* strains isolated from food in Egypt revealed clinically important multidrug resistance and virulence profiles / A. M. Hammad, A. E. H. Moustafa, M. M. Mansour [et al.] // Journal of food protection – 2018. – Vol. 81, № 6. – P. 1015-1021.
262. Molecular characterisation, genotyping and survival of *Aeromonas hydrophila* isolated from milk, dairy products and humans in Egypt / A. B. Tahoun, H. A. Ahmed, R. M. Abou Elez [et al.] // International Dairy Journal. – 2016. – Vol. 63. – P. 52-58.
263. Molecular characterization of *Aeromonas spp.* and *Vibrio cholerae O1* isolated during a diarrhea outbreak / C. L. Mendes-Marques, L. M. D. Nascimento, G. N. D. Theophilo [et al.] // Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. – 2012. – Vol. 54. – P. 299-304.

264. Molecular detection of *Aeromonas* and its virulence genes in hospitalized children with diarrhea in northwest of Iran / H. Sadeghi, S. Heidarzadeh, M. Naghavi [et al.] // Human Gene. – 2022. – Vol. 33. – P. 201030.
265. Molecular identification and epizootiology of *Aeromonas veronii* infection among farmed *Oreochromis niloticus* in Eastern Province, KSA / M. A. Hassan, E. A. Noureldin, M. A. Mahmoud [et al.] // The Egyptian Journal of Aquatic Research. – 2017. – Vol. 43, № 2. – P. 161-167.
266. Molecular identification and virulence potential of the genus *Aeromonas* isolated from wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico / N. E. Reyes-Rodriguez, C. Salgado-Miranda, I. T. Flores-Valle [et al.] // Journal of food protection – 2019. – Vol. 82. – N 10. – P. 1706-1713.
267. Molecular identification of *Aeromonas hydrophila* isolate with sensitivity and resistance to antibiotics for its different strains / M. Z. Rahman, A. Hossain, M. M. Rahman [et al.] // Adv. Anim. Vet. Sci. – 2021. – Vol. 9, № 12. – P. 2062-2068.
268. Molecular typing, antibiogram and PCR-RFLP based detection of *Aeromonas hydrophila* complex isolated from *Oreochromis niloticus* / A. M. Algammal, M. F. Mohamed, B. A. Tawfiek [et al.] // Pathogens. – 2020. – Vol. 9, № 3. – P. 238.
269. Monfort, P. Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond / P. Monfort, B. Baleux // Applied and Environmental Microbiology. – 1990. – Vol. 56, № 7. – P. 1999-2006.
270. Monomicrobial necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas hydrophila* and *Klebsiella pneumoniae* / Y. H. Tsai, S. H. Shen, T. Y. Yang [et al.] // Medical Principles and Practice. – 2015. – Vol. 24, № 5. – P. 416-423.
271. Morphological, microbiological and ultrastructural aspects of sepsis by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus* / F. A. Marinho-Neto, G. S.

- Claudiano, J. Yunis-Aguinaga [et al.] // PLoS One. – 2019. – Vol. 14, № 9. – P. e0222626.
272. Moyer, N. P. Isolation and enumeration of aeromonads / N. P. Moyer // The genus *Aeromonas*. London: Wiley and Sons. – 1996. – P. 39-84.
273. Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* / A. J. Martinez-Murcia, A. Monera, M. J. Saavedra [et al.] // Systematic and applied microbiology. – 2011. – Vol. 34, № 3. – P. 189-199.
274. Multiple *Aeromonas* strains isolated from *Atlantic salmon* (*Salmo salar*) displaying red skin disease signs in Scandinavian rivers / E. Lagadec, E. B. Mjølnerød, Ø. M. Jensen [et al.] // Journal of Fish Diseases. – 2024. – Vol. 47, № 1. – P. e13870.
275. Multiplex PCR detection of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. from suspect food samples in northern Taiwan / Y. C. Chang, J. Y. Wang, A. Selvam [et al.] // Journal of food protection – 2008. – Vol. 71, № 10. – P. 2094-2099.
276. Multiplex PCR detection of hemolysin genes in β -hemolytic *Aeromonas hydrophila* strains isolated from fish and fish products / D. Stratev, E. Gurova, I. Vashin, [et al.] // Bulgarian J. Agricul. Sci. – 2016. – Vol. 22, № 2. – P. 308-314.
277. Multiplex taqman real-time PCR for detecting *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii* and *A. schubertii* / Y. Yang, H. Yu, H. Li [et al.] // Israeli Journal of Aquaculture. Bamidgeh. – 2017. - P. 1–9.
278. MuttalibAl-shalah, L. A. The study characters of *Aeromonas hydrophila* on some media / Lubna Abdul MuttalibAl-shalah // Mesopotamia Environmental Journal (Special Issue C). – 2017. - P. 121-129.
279. Mzula, A. Characterization of aeromonads and development of vaccine candidate from *Aeromonas hydrophila* isolated from tilapia fish farms in Tanzania: dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Life Sciences / Mzula Alexandra ; Nelson

- Mandela African Institution of Science and Technology. - Arusha, Tanzania, 2020. – 121 p.
280. Nagar V. Molecular and biochemical studies of *Aeromonas spp.*- dissertation for the degree of Doctor of Philosophy / Nagar Vandan; Homi Bhabha National Institute, Mumbai, India, 2014. – 187 p.
281. Nagar, V. Characterization of *Aeromonas s* strains isolated from Indian foods using *rpoD* gene sequencing and whole cell protein analysis / V. Nagar, R. Shashidhar, J. R. Bandekar // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2013. – Vol. 29. – P. 745-752.
282. Nagar, V. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Aeromonas* strains from various retail food products in Mumbai, India / V. Nagar, R. Shashidhar, J. R. Bandekar // Journal of food science. – 2011. – Vol. 76, № 7. – P. M486-M492.
283. Narayan, K. G. *Aeromonas hydrophila* / K. G. Narayan, D. K Sinha., D. K. Singh // Veterinary Public Health & Epidemiology: Veterinary Public Health-Epidemiology-Zoonosis-One Health. – Singapore: Springer Nature Singapore. - 2023. – P. 293-299.
284. Narendra Kumar, G. Identification and characterization of motile aeromonads isolated from fish and fish pond water with special emphasis on virulent *Aeromonas hydrophila*: dissertation for the award of the Degree of Master of Veterinary science (Veterinary public health and Epidemiology) / Narendra Kumar Gonepudi ; Sri Venkateswara Veterinary University (SVVU), Tirupati, India, 2022. – 156 p.
285. Narmada, S. Molecular characterization, virulence gene profiling and multidrug resistance profiles of *Aeromonas hydrophila* isolated from raw fish samples collected in and around Tirupati, Andhra Pradesh, India / S. Narmada // Pharma Innov. – 2022. – Vol. 11. – P. 1669-73.

286. Neamat-Allah, A. N. F. Effects of dietary white mulberry leaves on hemato-biochemical alterations, immunosuppression and oxidative stress induced by *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis niloticus* / A. N. F. Neamat-Allah, E. A. Mahmoud, Y. Mahsoub // *Fish & Shellfish Immunology*. – 2021. – Vol. 108. – P. 147-156.
287. Necrotizing fasciitis and sepsis caused by *Aeromonas hydrophila* after crush injury of the lower extremity / S. F. Monaghan, D. Anjaria, A. Mohr [et al.] // *Surgical infections*. – 2008. – Vol. 9, № 4. – P. 459-467.
288. Nivaskumar, M. Type II secretion system: a magic beanstalk or a protein escalator / M. Nivaskumar, O. Francetic // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2014. – Vol. 1843, N 8. – P. 1568-1577.
289. Novel bacteriophages capable of disrupting biofilms from clinical strains of *Aeromonas hydrophila* / M. Kabwe, T. Brown, L. Speirs [et al.] // *Frontiers in microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 194.
290. Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics / M. Pang, J. Jiang, X. Xie [et al.] // *Scientific reports*. – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 9833.
291. Occurrence of *Aeromonas spp.* in a random sample of drinking water distribution systems in the USA / A. I. Egorov, J. M. B. Best, C. P. Frebis [et al.] // *Journal of water and health*. – 2011. – Vol. 9, № 4. – P. 785-798.
292. Occurrence of Biofilm-forming *Aeromonas spp.* in Stainless Steel Water Dispensers in an Education Institute / R. Changkwanyeeun, S. Netmaneethipsiri, S. Machoo [et al.] // *Environment Asia*. – 2024. – Vol. 17, № 1.
293. Occurrence of potential virulence determinants in *Aeromonas spp.* isolated from different aquatic environments / S. Majeed, L. A. D. S. De Silva, P. M. Kumarage [et al.] // *Journal of Applied Microbiology*. – 2023. – Vol. 134, № 3. – P. lxad031.

294. Occurrence of Potentially Pathogenic *Vibrio* and related species in Seafoods obtained from the Eastern Province of Saudi Arabia / M. M. Ibrahim, S. S. Al Shabeeb, E. A. Noureldin [et al.] // Int. J. Adv. Res. Biol. Sci. – 2016. – Vol.3, № 12. – P. 71-80.
295. Occurrence, diversity and temperature-dependent growth kinetics of *Aeromonas spp.* in lettuce / N. Umutoni, A. N. Jakobsen, K. Mukhatov, [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2020. – Vol. 335. – P. 108852.
296. Odeyemi, O. A. Antibiotic resistance profiling and phenotyping of *Aeromonas* species isolated from aquatic sources / O. A. Odeyemi, A. Ahmad // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2017. – Vol. 24, № 1. – P. 65-70.
297. Önalın, Ş. Determination of phenotypic, serotypic and genotypic differences between *L. garvieae* isolates obtained from rainbow trout farms in Van, Bitlis, Mus and Hakkari provinces / Ş. Önalın - Van, Turkey : Yüzüncü Yıl Univ., Graduate School of Natural and Applied Sciences, Dep. of Fishery Engineering, 2016. - 151 p.
298. Onuoha, S. C. Occurrence and Antibiotic Susceptibility of *Aeromonas* species from Piggery Farms in Ebonyi State, Nigeria Onuoha, S. C*, Eronmosele, BO, 2 Okoh, FN, 2 Okafor, CO, 2 Onwere, CC 2 and Ovia, KN 2 / S. C. Onuoha // Nigerian Journal of Microbiology. – 2022. – P. 6064-6071.
299. Molecular detection of the *Aeromonas* virulence aerolysin gene in retail meats from different animal sources in Egypt / K. Osman, M. Aly, A. Kheader [et al.] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2012. – Vol. 28. – P. 1863-1870.
300. Otokunefor, K. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) as a tool for genetic characterisation of bacterial isolates in Nigeria / K.Otokunefor, C. J. Ogugbue, B. U. Fajoyomi // Nigerian Journal of Biotechnology. – 2020. – Vol. 37, № 1. – P. 122-128.

301. Özbaş, Z. Y. Development of a multiplex and semi-nested PCR assay for detection of *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in raw milk / Z. Y. Özbaş, A. Lehner, M. Wagner // *Food Microbiology*. – 2000. – Vol. 17, № 2. – P. 197-203.
302. Palumbo, S. A. The *Aeromonas hydrophila* group in food. 1996 / S. A. Palumbo // *The Genus Aeromonas*. John Wiley & Sons, New York, NY. – 1996. – P. 39-76.
303. Pathogenic potentials of *Aeromonas* species isolated from aquaculture and abattoir environments / I. H. Igbiosa, A. Beshiru, E. E. Odjadjare [et al.] // *Microbial pathogenesis*. – 2017. – Vol. 107. – P. 185-192.
304. Pathogenic profile and cytotoxic activity of *Aeromonas* spp. isolated from *Pectinatella magnifica* and surrounding water in the South Bohemian aquaculture region / H. Šubrtová Salmonová, M. Marchi, I. Doskočil [et al.] // *Journal of fish diseases*. – 2020. – Vol. 43, № 10. – P. 1213-1227.
305. Pathogenicity of Mexican isolates of *Aeromonas* sp. in immersion experimentally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) / A. P. Zepeda-Velázquez, V. Vega-Sánchez, C. Ortega-Santana [et al.] // *Acta tropica*. – 2017. – Vol. 169. – P. 122-124.
306. Pauly, D. Comments on FAOs state of world fisheries and aquaculture (SOFIA 2016) / D. Pauly, D. Zeller // *Marine Policy*. – 2017. – Vol. 77. – P. 176-181.
307. Peptide nucleic acid molecular beacons for the detection of PCR amplicons in droplet-based microfluidic devices / L. M. Zanolli, M. Licciardello, R. D'Agata [et al.] // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2013. – Vol. 405. – P. 615-624.
308. Percival, S. L. *Aeromonas* / S. L. Percival, D. W. Williams // *Microbiology of waterborne diseases*. – Academic Press. - 2014. – P. 49-64.

309. Phenotypic and genetic diversity of *Aeromonas* species isolated from freshwater lakes in Malaysia / W. C. Khor, S. M. Pua, J. A. M. A. Tan [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, № 12. – P. e0145933.
310. Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum* / A. J. Martínez-Murcia, L. Soler, M. J. Saavedra [et al.] // International Microbiology. – 2005. – Vol. 8, № 4. – P. 259-269.
311. Phenotypic, molecular detection and antibiogram analysis of *Aeromonas Hydrophila* from *Oreochromis Niloticus* (*Nile Tilapia*) and Ready-To-eat fish products in selected Rift Valley lakes of Ethiopia / N. K. Kerigano, T. R. Chibsa, Y. G. Molla [et al.] // BMC Veterinary Research. – 2023. – Vol. 19, № 1. – P. 120.
312. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on gyrB gene sequences / M. A. Yanez, V. Catalán, D. Apráiz [et al.] // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2003. – Vol. 53, № 3. – P. 875-883.
313. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes / L. Soler, M. A. Yáñez, M. R. Chacon [et al.] // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2004. – Vol. 54, № 5. – P. 1511-1519.
314. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.) / A. K. Gupta, D. Nayduch, P. Verma [et al.] // FEMS microbiology ecology. – 2012. – Vol. 79, № 3. – C. 581-593.
315. Phylogenetic diversity of *Aeromonas* from “alheira,” a traditional Portuguese meat product / M. C. Fontes, C. Martins, A. J. Martínez-Murcia [et al.] // Foodborne Pathogens and Disease. – 2012. – Vol. 9, № 8. – P. 713-718.
316. Phylogenetic identification of *Aeromonas* from pigs slaughtered for consumption in slaughterhouses at the North of Portugal / M. C. Fontes, M. J.

- Saavedra, C. Martins [et al.] // International journal of food microbiology. – 2011. – Vol.146, № 2. – P. 118-122.
317. Phylogenetic identification of *Aeromonas simiae* from a pig, first isolate since species description / M. C.Fontes, M. J.Saavedra, A. [et al.] // Veterinary microbiology. – 2010. – Vol. 142, № 3-4. – P. 313-316.
318. Piotrowska, M. Insight into the mobilome of *Aeromonas* strains. Front. Microbiol. 6: 494. doi: 10.3389/fmicb. 2015.00494 / M. Piotrowska, M. Popowska // Antibiotic Resistance in Aquatic Systems. – 2017. – P. 73.
319. Piotrowska, M. Insight into the mobilome of *Aeromonas* strains / M. Piotrowska, M. Popowska // Frontiers in microbiology. – 2015. – Vol. 6. – C. 494.
320. Plasmid composition in *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida 01-B526* unravels unsuspected type three secretion system loss patterns / K. H. Tanaka, A. T. Vincent, J. G. Emond-Rheault [et al.] // BMC genomics. – 2017. – Vol. 18. – P. 1-12.
321. Podobnik, M. Molecular mechanism of pore formation by aerolysin-like proteins / M. Podobnik, M. Kisovec, G. Anderluh // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2017. – Vol. 372. – № 1726. – P. 20160209.
322. Popoff, M. A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila-Aeromonas punctata* group / M. Popoff, M. Veron // Microbiology. – 1976. – Vol. 94, № 1. – P. 11-22.
323. Prediction and Analysis in silico of Genomic Islands in *Aeromonas hydrophila* / A. C. da Silva Filho, J. N. Marchaukoski, R. T. Raittz [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2021. – Vol.12. – PP. 769380.
324. Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Aeromonas* and *Pseudomonas* species recovered from aquatic foods sold at the retail market in Egypt / M. F.

- Elsherif, S. M. Saad, A. Hamad [et al.] // Benha Veterinary Medical Journal. – 2023. – Vol. 45, № 1. – P. 146-151.
325. Prevalence and genetic analysis of *mcr-3*-positive *Aeromonas* species from humans, retail meat, and environmental water samples / Y. Shen, C. Xu, Q. Sun [et al.] // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2018. – Vol. 62, № 9. – P. 10.1128/aac.00404-18.
326. Prevalence and susceptibility to antibiotics of motile strains of *Aeromonas* isolated from the mangrove oyster (*Crassostrea rhizophorae*) / D. Munoz, Y. Castaneda de Fermin, C. Graüde Marín [et al.] // Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia – 2012.- Vol. 22, № 6. - P. 565-573.
327. Prevalence and virulence genes of *Vibrio* and *Aeromonas* species isolated from Nile tilapia and mugil fish farms in Egypt / A. El-Tawab, F. El-Hofy, G. Hasb-Elnaby [et al.] // Adv. Anim. Vet. Sci. – 2021. – Vol. 9, N 10. – P. 1625-1631.
328. Prevalence of antibiotic resistant *Aeromonas* and molecular identification of *Aeromonas hydrophila* isolated from some marketed Fish in Egypt / A. E. M. Morshdy, N S. A. Abdelhameed, R. M. El Bayomi [et al.] // Journal of Advanced Veterinary Research. – 2022. – Vol. 12, № 6. – P. 717-721.
329. Prevalence of potentially pathogenic antibiotic-resistant *Aeromonas spp.* in treated urban wastewater effluents versus recipient riverine populations: a 3-year comparative study / T. Skwor, S. Stringer, J. Haggerty [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 2020. – Vol. 86, № 3. – P. e02053-19.
330. Prevalence, antibiotic susceptibility, and presence of drug resistance genes in *Aeromonas spp.* isolated from freshwater fish in Kelantan and Terengganu states, Malaysia/ N. N. F. N. M. Fauzi, R. H. Hamdan, M. Mohamed, [et al.] // Veterinary world. – 2021. – Vol. 14, № 8. – P. 2064.
331. Prevalence, virulence gene distribution and alarming the multidrug resistance of *Aeromonas hydrophila* associated with disease outbreaks in freshwater

- aquaculture/ D. T. Ninh, D. V. Le, K. V. Van [et al.] // Antibiotics. – 2021. – Vol. 10, № 5. – P. 532.
332. Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501 / D. Minana-Galbis, M. Farfan, J. G. Lorén [et al.] // Systematic and applied microbiology. – 2010. – Vol. 33, № 1. – P. 15-19.
333. Proteomic characterization and discrimination of *Aeromonas* species recovered from meat and water samples with a spotlight on the antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* / A. Elbehiry, E. Marzouk, E. Abdeen [et al.] // Microbiologyopen – 2019. – Vol. 8, № 11. – P. e782.
334. *Pseudomonas* and *Aeromonas* isolates from domestic reptiles and study of their antimicrobial in vitro sensitivity / V. V. Ehani, F. Fratini, M. Ampola [et al.] // Veterinary research communications. – 2008. – Vol.32. – P. 195-198.
335. Puthuchery, S. D. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia / S. D. Puthuchery, S. M.Puah, K. H. Chua // PloS one. – 2012. – Vol. 7, № 2. – P. e30205.
336. Qu, F. *Aeromonas* / F. Qu, D. Liu // Molecular Medical Microbiology. – Academic Press. - 2024. – P. 1009-1025.
337. Rahmatelahi, H. Delivering the pain: an overview of the type III secretion system with special consideration for aquatic pathogens / H. Rahmatelahi, M. El-Matbouli, S. Menanteau-Ledouble // Veterinary Research. – 2021. – Vol. 52, № 1. – P. 146.
338. Ramadan, A. A. Bacterial typing methods from past to present: A comprehensive overview / A. A. Ramadan // Gene Reports. – 2022. – Vol. 29. – P. 101675.
339. Ramalivhana, N. J. Molecular Characterization of *Aeromonas hydrophila* and Antimicrobial Activities of Selected Medicinal Plants against Pathogenic Isolates from Water and Stool Samples in the Era of HIV/AIDS in Limpopo Province, South Africa: dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in

- the subject environmental science – / Ramalivhana Naledzani Jeoffry ; University of South Africa. - Pretoria, Gauteng, South Africa, 2010. – 248 p.
340. Ramasamy, P. Pathogenicity of Antibiotic Resistant/Sensitive Bacteria *Vibrio spp.* and *Aeromonas spp.* / P. Ramasamy, J. S. Rani, D. R. Gunasekaran // Chapter. – 2020. – Vol. 2. – P. 37-42.
341. Rapid *Aeromonas hydrophila* identification by TaqMan PCR assay: comparison with a phenotypic method / F. Trakhna, C. Harf-Monteil, A. Abdelnour [et al.] // Letters in Applied Microbiology. – 2009. – Vol. 49, № 2. – P. 186-190.
342. Rapid visual detection of *Aeromonas salmonicida* by loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye / S. Zhou, Q. Huang, M. Yu [et al.] // Journal of Fish Diseases. – 2021. – Vol. 44, № 12. – P. 1993-2001.
343. Rasmussen-Ivey, C. R. Comparative Genomic Analysis and Evaluation of Control Strategies for Hypervirulent *Aeromonas hydrophila* in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) : dissertation for the degree of Doctor of Philosophy / Cody R. Rasmussen-Ivey ; Auburn University. - Auburn, Alabama, United States, 2019. - 204 p.
344. Regrowth of potential opportunistic pathogens and algae in reclaimed-water distribution systems / P. K. Jjemba, L. A. Weinrich W. Cheng [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 2010. – Vol.76, № 13. – P. 4169-4178.
345. Remedial treatment of corroded iron objects by environmental *Aeromonas* isolates / W. M. Kooli, T. Junier, M. Shakya [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 2019. – Vol. 85, № 3. – P. e02042-18.
346. Removal of bacterial contaminants and antibiotic resistance genes by conventional wastewater treatment processes in Saudi Arabia: Is the treated wastewater safe to reuse for agricultural irrigation? / N. Al-Jassim, M. I. Ansari, M. Harb [et al.] // Water research. – 2015. – Vol. 73. – P. 277-290.

347. Repositioning of the Antihyperlipidemic Drug Fenofibrate for the Management of *Aeromonas* Infections / R. M. Guerra, M. J. Figueras, I. Pujol-Bajador [et al.] // *Microorganisms*. – 2024. – Vol. 12, № N 3. – P. 465.
348. Resistance characterization, virulence factors, and ERIC-PCR fingerprinting of *Aeromonas veronii* strains isolated from diseased *Trionyx sinensis* / Y. Ye, Y. Jiang, T. Fan [et al.] // *Foodborne Pathogens and Disease*. – 2012. – Vol. 9, N 11. – P. 1053-1055.
349. Ribosomal multi-operon diversity: an original perspective on the genus *Aeromonas* / F. Roger, B. Lamy, E. Jumas-Bilak [et al.] // *PLoS ONE* – 2012.- Vol. 7. – P. e46268.
350. Rivera Méndez, L. PACAP Analogues with Potential Applications in Finfish Aquaculture : A thesis presented for the degree of Master of Science in Biology – / Laura Rivera Méndez ; University of Waterloo. - Waterloo, Ontario, Canada, 2023. – 90 p.
351. Roh, H. J. Genomic and Transcriptomic Diversification of Flagellin Genes Provides Insight into Environmental Adaptation and Phylogeographic Characteristics in *Aeromonas hydrophila* / H. J. Roh, D. Kannimuthu // *Microbial Ecology*. – 2024. – Vol.87, № 1. – P. 65.
352. Role of phytobiotics in relieving the impacts of *Aeromonas hydrophila* infection on aquatic animals: a mini-review / Z. Abdul Kari, W. Wee, S. A. Mohamad Sukri [et al.] // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2022. – Vol. 9. – P. 1023784.
353. Roque, A. Bacterial fish diseases and molecular tools for bacterial fish pathogens detection / A. Roque, S. A. Soto-Rodríguez, B. Gomez-Gil // *Aquaculture Microbiology and Biotechnology*. – 2009. – Vol. 1. – P. 73-99.
354. Sadek, O. A. Detection of *Aeromonas hydrophila* in raw milk and some milk products with reference to its public health hazard / O. A. Sadek, N. H. Makar, S. M. El Berbawy // *Assiut Veterinary Medical Journal*. – 2017. – Vol. 63, № 153. – P. 43-53.

355. Taxonomic classification of genus *Aeromonas* using open reading frame-based binarized structure network analysis / A. Sakurai, M. Suzuki, K. Hayashi [et al.] // Fujita medical journal. – 2024. – Vol.10, № 1. – P. 8-15.
356. Saleh, A. Virulent and multiple antimicrobial resistance *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) in Egypt with sequencing of some virulence-associated genes / A. Saleh, R. Elkenany, G. Younis // Biocontrol science. – 2021. – Vol. 26, № 3. – P. 167-176.
357. Salvat, M. J. F *Aeromonas*. Global Water Pathogen Project. Part Three. Specific Excreted Pathogens: Environmental and Epidemiology Aspects / Maria José Figueras Salvat, Nicholas Ashbolt : Edmonton : University of Alberta: Edmonton, AB, Canada. – 2019. – 37 p. DOI : 10.14321/waterpathogens.21.
358. Samal, S. K. Isolation, biochemical characterization, antibiotic susceptibility study of *Aeromonas hydrophila* isolated from freshwater fish / S. K. Samal, B. K. Das, B. B. Pal // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2014. - Vol. 3, № 12. - P. 259-267.
359. Sammarco, M. L. Epidemiologia molecolare delle malattie infettive: metodi di analisi ed interpretazione dei risultati / M. L. Sammarco, G. Ripabelli, M. Tamburro // Ann Ig. – 2014. – Vol. 26, № 1. – P. 10-45.
360. Schubert, R. H. W. *Aeromonas eucrenophila* species nova *Aeromonas caviae* a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata* / R. H. W. Schubert, M. Hegazi // Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology. – 1988. – Vol. 268. – № 1. – P. 34-39.
361. Screening of pathogenic bacteria and SVCV (Spring viremia of carp virus) in propagated *Cyprinidae spp* and *Sander lucioperca* in Poldasht Shahid Kazemi warm water fish cultured center of West Azarbaijan - Iran / A. Nekuie Fard, B. Mostafazadeh, R. Manaffar, [et al.] // Iranian Fisheries Science Research Institute. – 2018. - P. 64.

362. Semwal, A. A review on pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and their mitigation through medicinal herbs in aquaculture / A. Semwal, A. Kumar, N. Kumar // *Heliyon* – 2023. – Vol. 9, № 3. - P. e14088.
363. Sen, K. Development of a rapid identification method for *Aeromonas species* by multiplex-PCR / K. Sen // *Canadian journal of microbiology*. – 2005. – Vol. 51, N 11. – P. 957-966.
364. Sha, J. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity / J. Sha, E. V. Kozlova, A. K. Chopra // *Infection and Immunity*. – 2002. – Vol. 70, № 4. – P. 1924-1935.
365. Sharma, M. Intermolecular dynamical charge fluctuations in water: A signature of the H-bond network / M. Sharma, R. Resta, R. Car // *Physical review letters*. – 2005. – Vol. 95, № 18. – P. 187401.
366. Sherif, A. H. Multidrug-resistant *Aeromonas* bacteria prevalence in Nile tilapia broodstock / A. H. Sherif, A. S. Kassab // *BMC microbiology*. – 2023. – Vol. 23, № 1. – P. 80.
367. Silvestry- Silver as a residual disinfectant to prevent biofilm formation in water distribution systems / N. Silvestry-Rodriguez, K. R. Bright, D. C. Slack [et al.] // *Applied and environmental microbiology*. – 2008. – Vol. 74, № 5. – P. 1639-1641.
368. Simple and direct detection of *Aeromonas hydrophila* infection in the goldfish, *Carassius auratus* (L.), by dot blotting using specific monoclonal antibodies / S. Longyant, K. Chaiyasittrakul, S. Rukpratanporn [et al.] // *Journal of fish diseases*. – 2010. – Vol. 33, № 12. – P. 973-984.
369. Skwor, T. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* / Troy Skwor, Stanislava Králová // – 2020. – P. 415.
370. Solaiman, S. *Aeromonas* spp. diversity in US mid-Atlantic surface and reclaimed water, seasonal dynamics, virulence gene patterns and attachment to

- lettuce / S. Solaiman, S. A. Micallef // Science of The Total Environment. – 2021. – Vol. 779. – P. 146472.
371. Soroka, M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR? / M. Soroka, B. Wasowicz, A. Rymaszewska // Cells. – 2021. – Vol. 10, № 8. – P. 1931.
372. Spellman, F. R. The drinking water handbook. / Frank R. Spellman : Boca Raton – CRC Press, 2017. – 386 p. - ISBN 978-1-315-15912-6. URL: <https://doi.org/10.1201/9781315159126>.
373. Stanier, R. Y. A note on the taxonomy of *Proteus hydrophilus* / R. Y. Stanier // Journal of bacteriology. – 1943. – Vol. 46, № 2. – P. 213-214.
374. Strategies to avoid wrongly labelled genomes using as example the detected wrong taxonomic affiliation for *Aeromonas* genomes in the GenBank database / R. Beaz-Hidalgo, M. J. Hossain, M. R. Liles [et al.]. // PloS one. – 2015. – Vol. 10, N 1. – P. e0115813.
375. Stratev, D. An overview of motile *Aeromonas septicaemia* management / D. Stratev, O. A. Odeyemi // Aquaculture international. – 2017. – Vol. 25, № 3. – P. 1095-1105.
376. Stratev, D. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review / D. Stratev, O. A. Odeyemi // Journal of infection and public health. – 2016. – Vol. 9, № 5. – P. 535-544.
377. Structural and immunochemical studies of the lipopolysaccharide from the fish pathogen, *Aeromonas bestiarum* strain K296, serotype O18 / A. Turska-Szewczuk, B. Lindner, I. Komanińska [et al.] // Marine Drugs. – 2013. – Vol. 11, N 4. – P. 1235-1255.
378. Structural and Serological Studies of the O6-Related Antigen of *Aeromonas veronii* bv. *sobria* Strain K557 Isolated from *Cyprinus carpio* on a Polish Fish Farm, which Contains 1-perosamine (4-amino-4, 6-dideoxy-1-mannose), a Unique Sugar Characteristic for *Aeromonas* Serogroup O6 / K. Dworaczek, D.

- Drzewiecka, A. Pękala-Safińska [et al.] // *Marine drugs*. – 2019. – Vol. 17, № 7. – P. 399.
379. Structural studies of the lipopolysaccharide from the fish pathogen *Aeromonas veronii* strain Bs19, serotype O16 / A. Turska-Szewczuk, K. A. Duda, D. Schwudke, [et al.] // *Marine Drugs*. – 2014. – Vol. 12. – N 3. – P. 1298-1316.
380. Structure and assembly of pilotin-dependent and-independent secretins of the type II secretion system / S. P. Howard, L. F. Estrozi, Q. Bertrand [et al.] // *PLoS Pathogens*. – 2019. – Vol. 15, № 5. – P. e1007731.
381. Rahayu, K. Study on characterization, pathogenicity and histopathology of disease caused by *Aeromonas hydrophila* in gourami (*Osphronemus gouramy*) / K. Rahayu, D. N Daruti, M. S. P. Stella // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – IOP Publishing, 2018. – Vol. 137, № 1. – P. 012003.
382. *Molecular medical microbiology* / Yi-Wei Tang, Dongyou Liu, Max Sussman, Ian Poxton, Joseph Schwartzman – Academic Press, 2023. – 2216 p.- ISBN: 97-8-012-397169-2.
383. *T6SS* and *ExoA* of flesh-eating *Aeromonas hydrophila* in peritonitis and necrotizing fasciitis during mono-and polymicrobial infections / A. Fernández-Bravo, P. B. Kilgore, J. A. Andersson [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2019. – Vol. 116, № 48. – P. 24084-24092.
384. Taha, Z. M. Genetic diversity and clonal relatedness of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from hemorrhagic septicemia's cases in common Carp (*Cyprinus carpio*) farms / Z. M. Taha // *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. – 2021. – Vol. 35, № 4. – P. 643-648.
385. Tawari, N. *Aeromonas salmonicida*: A very rare but potential threat to human / N. Tawari, R. Agrawal // *Indian Journal of Child Health*. – 2023. – Vol. 10, № 5. – P. 70-72.
386. Taxonomic affiliation of new genomes should be verified using average nucleotide identity and multilocus phylogenetic analysis / M. J. Figueras, R.

- Beaz-Hidalgo, M. J. Hossain [et al.] // Genome announcements. – 2014. – Vol. 2, № N 6. – P. 10.1128/genomea.00927-14.
387. Taxonomy, virulence determinants and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas spp.* isolated from bacteremia in southeastern China / Y. Sun, Y. Zhao, W. Xu [et al.] // Antimicrobial resistance & infection control. – 2021. – Vol. 10. – P. 1-9.
388. Taxonomy, virulence genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolated from extra-intestinal and intestinal infections / Y. Zhou, L. Yu, Z. Nan [et al.] // BMC infectious diseases. – 2019. – Vol. 19. – P. 1-9.
389. Tekedar, H. C. Comparative genomics of *Aeromonas hydrophila* secretion systems and mutational analysis of hcp1 and vgrG1 genes from T6SS / H. C. Tekedar // Frontiers in Microbiology. – 2019. – Vol. 9. – P. 3216.
390. Teunis, P. Reassessment of the enteropathogenicity of mesophilic *Aeromonas species* / P. Teunis, M. J. Figueras // Frontiers in microbiology. – 2016. – Vol. 7. – P. 1395.
391. The fight for invincibility: environmental stress response mechanisms and *Aeromonas hydrophila* / F. Awan, Y. Dong, N. Wang [et al.] // Microbial pathogenesis. – 2018. – Vol. 116. – P. 135-145.
392. The genus *Aeromonas*: A general approach / R. B. G. Pessoa, W. F. de Oliveira, D. S. C. Marques [et al.] // Microbial pathogenesis. – 2019. – Vol. 130. – P. 81-94.
393. The outer membrane vesicles of *Aeromonas hydrophila* ATCC® 7966TM: a proteomic analysis and effect on host cells / E. D. Avila-Calderón, J. E. Otero-Olarrá, L. Flores-Romo [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol. 9. – P. 2765.
394. The role of aquatic ecosystems (River Tua, Portugal) as reservoirs of multidrug-resistant *Aeromonas spp.* / S. Gomes, C. Fernandes, S. Monteiro [et al.] // Water. – 2021. – Vol. 13, № 5. – P. 698.

395. The screening of the protective antigens of *Aeromonas hydrophila* using the reverse vaccinology approach: potential candidates for subunit vaccine development / T. Zhang, M. Zhang, Z. Xu [et al.] // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11, № 7. – P. 1266.
396. The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture/ A. Fečkaninová, J. Koščová, D. Mudroňová [et al.] // *Aquaculture*. – 2017. – Vol. 469. – P. 1-8.
397. Thomas, J. *Aquaculture Microbiology*. / Editors: John Thomas, Natarajan Amaresan – New York : Humana New York, NY Springer US, 2023.- 204 p. - ISBN 978-1-0716-3031-0.
398. Three species of *Aeromonas* (*A. dhakensis*, *A. hydrophila* and *A. jandaei*) isolated from freshwater crocodiles (*Crocodylus siamensis*) with pneumonia and septicemia / W. Pu, G. Guo, N. Yang [et al.] // *Letters in applied microbiology*. – 2019. – Vol. 68, № 3. – P. 212-218.
399. Tomás, J. M. The main *Aeromonas* pathogenic factors / J. M. Tomás // *International Scholarly Research Notices*. – 2012. – Vol. 2012, № 1. – P. 256261.
400. Transcriptional hierarchy of *Aeromonas hydrophila* polar-flagellum genes / M. Wilhelms, R. Molero, J. G. Shaw [et al.] // *Journal of bacteriology*. – 2011. – Vol. 193, № 19. – P. 5179-5190.
401. Treatment of autosomal dominant hearing loss by *in vivo* delivery of genome editing agents / X. Gao, Y. Tao, V. Lamas [et al.] // *Nature*. – 2018. – Vol. 553, № 7687. – P. 217-221.
402. Triga, A. *Aeromoniasis* / A. Triga, M. Smyrli, P. Katharios // *Aquaculture Pathophysiology*. – Academic Press, 2022. – P. 317-327.
403. Unraveling the mechanism of action of a new type III secretion system effector *AexU* from *Aeromonas hydrophila* / J. C. Sierra, G. Suarez, J. Sha [et al.] // *Microbial pathogenesis*. – 2010. – Vol. 49, № 3. – P. 122-134.

404. Van der Kooij D. Nutritional versatility and growth kinetics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from drinking water / D. Van der Kooij, W. A. Hijnen // Applied and Environmental Microbiology. – 1988. – Vol. 54, № 11. – P. 2842-2851.
405. Varela, A. R. Quinolone resistant *Aeromonas spp.* as carriers and potential tracers of acquired antibiotic resistance in hospital and municipal wastewater / A. R. Varela, O. C. Nunes, C. M. Manaia // Science of the Total Environment. – 2016. – Vol. 542. – P. 665-671.
406. *VasH* contributes to virulence of *Aeromonas hydrophila* and is necessary to the T6SS-mediated bactericidal effect/ J. Li, Z. Wu, C. Wu [et al.] // Frontiers in Veterinary Science. – 2021. – Vol. 8. – P. 793458.
407. Virulence determinants of *Aeromonas* species implicated in fish diseases and control of infection: an overview / M. Yassen, E. S. EL-Naenaeey, A. Omar [et al.] // Zagazig Veterinary Journal. – 2021. – Vol. 49, № 3. – P. 283-299.
408. Virulence factor–activity relationships (VFAR) with specific emphasis on *Aeromonas species* (spp.) / A. J. Horneman, A. K. Chopra, J. Graf [et al.] // Journal of water and health. – 2009. – Vol. 7, № S1. – P. S29-S54.
409. Virulence factors of *Aeromonas hydrophila*: in the wake of reclassification / C. R. Rasmussen-Ivey, M. J. Figueras, D. McGarey [et al.] // Frontiers in microbiology. – 2016. – Vol. 7. – P. 1337.
410. Virulence genes contributing to *Aeromonas hydrophila* pathogenicity in *Oreochromis niloticus* / H. M. El-Bahar, N G. Ali, I. M. Aboyadak [et al.] // International Microbiology. – 2019. – Vol. 22. – P. 479-490.
411. Virulence genes of *Aeromonas* isolates, bacterial endotoxins and cyanobacterial toxins from recreational water samples associated with human health symptoms / K. A. Berg, C. Lyra, R. M. Niemi [et al.] // Journal of water and health. – 2011. – Vol. 9, N 4. – P. 670-679.

412. Virulence-Associated Genes and Antimicrobial Resistance of *Aeromonas hydrophila* Isolates from Animal, Food, and Human Sources in Brazil / E. M. Roges, V. D. Gonçalves, M. D. Cardoso [et al.] // BioMed research international. – 2020. – Vol. 2020. – № 1. – P. 1052607.
413. Virulotyping and genetic diversity of *Aeromonas hydrophila* isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in aquaculture farms in Egypt / Y. H. Tartor, E. S. Y. El-Naenaey, H. M. Abdallah [et al.] // Aquaculture. – 2021. – Vol. 541. – P. 736781.
414. Visual closed-tube loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting aerolysin gene: a practical screening method for virulent *Aeromonas* species affecting cultured eels in China / J. Xiong, S. G. Wu, Y. Liang [et al.] // Aquaculture International. – 2020. – Vol. 28. – P. 2319-2332.
415. Whole genome sequence analysis of *Aeromonas spp.* isolated from ready-to-eat seafood: antimicrobial resistance and virulence factors / H. J. Lee, J. E. Storesund, B. T. Lunestad [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2023. – Vol. 14. – P. 1175304.
416. Whole spectrum of *Aeromonas hydrophila* virulence determinants and the identification of novel SNPs using comparative pathogenomics / B. Abdella, N. A. Abozahra, N. M. Shokrak [et al.] // Scientific Reports. – 2023. – Vol. 13, № 1. – P. 7712.
417. Wimalasena, S. H. M. P. The presence of putative virulence determinants, tetracycline and β -lactams resistance genes of *Aeromonas* species isolated from pet turtles and their environment / S. H. M. P. Wimalasena, G. J. Heo // Original Research Article. – 2021. - 33 p.
418. Wodajo, W. Review on Zoonotic Bacterial Diseases of Fish / W. Wodajo // ARC Journal of Animal and Veterinary Sciences. – 2020. – Vol. 6, N 1. – P. 1-9.
419. Worthing, K. A. Severe acute cellulitis and sepsis caused by *Aeromonas spp.* in a dog on immunosuppressive therapy / K. A. Worthing, J. M. Norris, K. A.

Briscoe // Journal of Veterinary Emergency and Critical Care. – 2019. – Vol. 29, № 4. – P. 444-449.

420. Yacoub, O. Fish bacterial pathogen in gills, skin, kidney, intestines and its water at Elmahmoudia and Edfina / O. Yacoub, H. Torky, R. Tawfik // Alexandria Journal of Veterinary Sciences. – 2023. - P.58-62.

ПРИЛОЖЕНИЯ

САМАРСКИЙ ФИЛИАЛ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

УТВЕРЖДАЮ:

Руководитель Самарской
испытательной лаборатории
ФГБУ «ВНИИЗЖ»

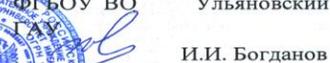

Е.А. Ромаданова
« 12 » 2024 год



СОГЛАСОВАНО:

Первый проректор -
проректор по научной работе
и цифровой трансформации
ФГБОУ ВО Ульяновский
ГАУ




И.И. Богданов
« 10 » 2024 год

**Акт о внедрении результатов
научно-исследовательской работы**

соискатель кафедры "Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза" ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ Ломакин Артём Андреевич, к.б.н., доцент кафедры "Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза" ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ Феоктисова Наталья Александровна с одной стороны и руководитель Самарской испытательной лаборатории ФГБУ «ВНИИЗЖ» Елена Анатольевна Ромаданова с другой стороны, составили настоящий акт о том, что сотрудниками университета (вышеназванными лицами) проведены научные эксперименты по теме: «Подбор праймерной ПЦР- системы в режиме «реального времени» для индикации и идентификации бактерий вида *Aeromonas hydrophila*».

В ходе опытного периода выполнены следующие работы: 1. Изучение специфичности разработанного протокола амплификации и праймерных систем с флюорисцентным зондом; 2. Изучение чувствительности разработанного протокола и праймеров для индикации вида *Aeromonas hydrophila*; 3. Изучение специфичности разработанного протокола для индикации и идентификации полевых штаммов *Aeromonas hydrophila*.

В результате проведенной работы нами проведена апробация разработанного протокола праймеров амплификации для выявления участка генов *zipA*, характерного *Aeromonas hydrophila*. Установлена специфичность праймерной системы для изучаемого вида бактерии, в качестве контрольных штаммов выступали референс- штаммы представителей рода *Aeromonas* (*A. salmonicida*, *A. veronii*, *A. caviae*), и бактерии-ассоцианты родов *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Escherichia*.

Было установлено, что подобранные параметры амплификации позволяют определить искомый штамм бактерий в концентрации 10^2 бактериальных генома на одну реакцию.

Определено, что при использовании разработанной праймерной системы можно идентифицировать полевые штаммы бактерий вида *Aeromonas hydrophila*, выделенные из патологического материала и из объектов окружающей среды.

Разработанная тест-система на основе метода полимеразной цепной реакции с детекцией результата в режиме «реального времени» для индикации и идентификации штаммов возбудителя аэромоноза рыб, *Aeromonas hydrophila* в результате исследований показала свою эффективность, замечаний к применению не имеется.

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

 Н.А. Феоктисова

 А.А. Ломакин

Самарская испытательная
лаборатория ФГБУ «ВНИИЗЖ»



Е.А. Ромаданова

САМАРСКИЙ ФИЛИАЛ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

УТВЕРЖДАЮ:

Руководитель Самарской
испытательной лаборатории
ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Е.А. Ромаданова
« 10 » 2024 год



СОГЛАСОВАНО:

Первый проректор -
проректор по научной работе
и цифровой трансформации
ФГБОУ ВО Ульяновский
ГАУ

И.И. Богданов
« 10 » 2024 год



**Акт о внедрении результатов
научно-исследовательской работы**

соискатель кафедры "Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза" ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ Ломакин Артём Андреевич, к.б.н., доцент кафедры "Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза" ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ Феоктисова Наталья Александровна с одной стороны и руководитель Самарской испытательной лаборатории ФГБУ «ВНИИЗЖ» Елена Анатольевна Ромаданова с другой стороны, составили настоящий акт о том, что сотрудниками университета (вышеназванными лицами) проведены научные эксперименты по теме: «Разработка экспресс- метода LAMP для детекции *A. hydrophila*».

В ходе опытного периода выполнены следующие работы: 1. Изучение специфичности разработанного протокола для детекции штаммов *A. hydrophila* при использовании петлевой изотермической амплификации (LAMP) с методом обнаружения амплификации путем высвобождения гасящей реакции (DARQ- detection of amplification by release of quenching) ; 2. Изучение чувствительности разработанного протокола и праймеров для индикации вида *Aeromonas hydrophila*; 3. Изучение специфичности разработанного протокола для индикации и идентификации полевых штаммов *Aeromonas hydrophila*.

В результате проведенной работы нами проведена апробация разработанного протокола праймеров амплификации для выявления участка генов *zipA*, характерного *Aeromonas hydrophila* методом RT-LAMP. Установлена специфичность праймерной системы для изучаемого вида бактерий, в качестве контрольных штаммов выступали референс- штаммы представителей рода *Aeromonas* (*A. salmonicida*, *A. veronii*, *A. caviae*), и бактерио-ассоцианты родов *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Escherichia*.

Было установлено, что подобранные параметры амплификации позволяют определить искомый штамм бактерий в концентрации 10^2 бактериальных генома на одну реакцию или 10^3 бактериальных генов на 1 мл.

Определено, что при использовании разработанной праймерной системы можно идентифицировать полевые штаммы бактерий вида *Aeromonas hydrophila* методом DARQ- LAMP, выделенные из патологического материала и из объектов окружающей среды.

Разработанная тест-система на основе метода петлевой изотермической амплификации в режиме «реального времени» для индикации и идентификации штаммов возбудителя аэромоноза рыб, *Aeromonas hydrophila* в результате исследований показала свою эффективность, замечаний к применению не имеется.

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

 Н.А. Феоктисова

 А.А. Ломакин

