

На правах рукописи

ЛОМАКИН АРТЁМ АНДРЕЕВИЧ

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

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования
Ульяновский государственный аграрный университет
имени П.А. Столыпина

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Феоктистова Наталья Александровна

Официальные оппоненты: **Пименов Николай Васильевич**,
доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Московская государственная
академия ветеринарной медицины
и биотехнологии имени К.И. Скрябина»,
заведующий кафедрой «Биология и патология
мелких домашних, лабораторных и экзотических
животных»

Плешакова Валентина Ивановна,
доктор ветеринарных наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Омский государственный
аграрный университет имени П.А. Столыпина»,
профессор кафедры «Ветеринарная
микробиология, инфекционные
и инвазионные болезни»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет
ветеринарной медицины»

Защита диссертации состоится " " 2025 года в ⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета 35.2.035.01 при ФГБОУ ВО "Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, Саратов, ул. Соколова, 335, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Вавиловский университет и на сайте www.vavilovsar.ru

Отзывы направлять по адресу: 410012, г. Саратов, пр-кт им. Петра Столыпина, зд. 4, стр. 3, ученому секретарю диссертационного совета.

Автореферат диссертации разослан

2025 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета доктор биологических наук,
профессор

Карпунина Лидия Владимировна

Общая характеристика работы

Актуальность темы

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 (Pauly D., Zeller D., 2017; Fisheries F. A., 2022; Abdella B. et al., 2023).

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 (Marinho-Neto F. A. et al., 2019).

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. (Samal S. K. et al, 2014; Fitria, M. D. et al., 2021). Некоторые исследователи выделяют *A. hydrophila* как основной патоген, вызывающий заболевания на рыбоводческих фермах, сопровождающиеся высокой смертностью и большими экономическими потерями (Moyer N. P., 1996; Samal S. K. et al, 2014). В литературе это заболевание называют «подвижной септициемией *Aeromonas*» (Pandove G. et al., 2003), «геморрагической септициемией», «язвенной болезнью», «красной язвой» (Janda J. M. et al., 2007; Thiyagarajan P. et al., 2014) и «хвостовой и плавниковой гнилью» (Wang H. et al., 2017). 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 аэромоназом в Российской Федерации за период с 2014 по 2023 годы, было установлено, что оно носит эпизодический характер. За последние годы наибольшее число неблагополучных по аэромоназу хозяйств зарегистрировано на территории Московской, Оренбургской, Кировской, Челябинской, Тверской и Свердловской областей (<https://fsvps.gov.ru/jepizooticheskaja-situacija/rossija/operativnyeinformacionnye-soobshhenija/>).

Для выделения и идентификации *A. hydrophila* в лабораторных условиях настоящее время в Российской Федерации используют «Методические указания по диагностике аэромоназа (краснухи) карпов», утв. 23.04.86 №13–3/5 (Юхименко Л. Н. и др., 1987). 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, вызваемых 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* (Roque A. et al., 2009; Önalın Ş. 2016; Abdelsalam M., et al., 2023).

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* (Lamy B. et al., 2010; Du X. et al., 2021). 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 надежна (Fernández-Bravo & Figueras, 2020).

В ряде исследований по идентификации *A. hydrophila* был использован метод полногеномного секвенирования (Jin L. et al., 2020; Balcı Ş. et al., 2023). На практике идентификация *A. hydrophila* в основном осуществляется на основе детекции генов вирулентности, к которым относятся гены: цитотоксического энтеротоксина (act), аэролизина (aer), гемолизина A (hylA) и энтеротоксина (ast) (El-Bahar H. M. et al., 2019). 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 (Rasmussen-Ivey C. R. et al., 2016; Zhao X. L. et al., 2020; Saleh A. et al., 2021).

Следовательно, а также из-за ограничений, присущих этим методам, изоляты рода *Aeromonas* могут быть идентифицированы ошибочно (Puthuchearu S. D. et al., 2012; Hoel S. et al. 2019; Abdella B. et al., 2023).

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» (электрофоретическим методом) 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 фингерпринты, 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.

Теоретическая и практическая значимость работы

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 аэромоноза. 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 *Aeromonas hydrophila*, основанной на бактериологических и молекулярно-генетических методах, позволило выделить из 91 пробы объектов санитарного надзора 10 штаммов *A. hydrophila*, 1 штамм - *A. bestiarum* 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.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты, материалы и методы

Объекты исследований: 91 проба объектов санитарного надзора, включающая 5 проб гидробионтов (рыба) и 86 проб воды из водоемов, 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 pneumonia* C6, находящиеся на хранении в музее микроорганизмов кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы 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-

арго, 1998. с. 150–152; SMI ID 19: identification of *Vibrio* and *Aeromonas* species (Public Health England, 2015).

Для изучения антибиотикорезистентности выделенных бактериальных изолятов штаммы *Aeromonas* культивировали при 30 °С 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 выделения ДНК использовали набор реагентов «М-СОРБ-ООМ» (Синтол, Россия). Измерение концентрации НК референс-штамма *A. hydrophila* ATCC 49140 было проведено 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 специфичного 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 объёмом 25 мкл. На каждую реакцию праймеры добавлялись объёмом 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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.

Штамм *A. hydrophila* ATCC 49140 способен расти в широком температурном диапазоне от 10 до 42 °С, на LB-бульоне в присутствии 3% хлорида натрия; он ферментирует глюкозу, мальтозу, маннитол, сахарозу,

фруктозу; утилизирует пролин, β -аланин, L-тирозин, L-метионин, сукцинат, глутамат натрия и DL-лактат. Исследуемый штамм продуцирует оксидазу, нитраты, индол, ДНКазу, желатиназу, 2-кетоглюконат; характеризуется аргининдекарбоксилазной активностью.

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.

Разработка бактериологического компонента тест-системы

Эмпирически была подобрана среда для накопления и первичной идентификации бактерий *A. hydrophila* - А.v.1-УГАУ, 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.

В качестве дифференциально - диагностической среды предложен BSIBG agar - агар с желчными солями и иргасановым бриллиантовым (инкубирование посевов в течение 48 часов при температуре 30 °C).

Первичное типирование предлагается по характерной для *A. hydrophila* морфологии колоний.

Для бактериологической идентификации и получения чистой культуры рекомендован LB-агар с добавлением 1% ксилозы и 0,08% бромтимолового синего (инкубирование в течение 24 часов при температуре 30 °C).

Вторичное типирование – отбор единичных колоний бактериальных изолятов, неспособных к ферментации ксилозы.

Заключительный этап - изучение способности бактериальных штаммов к продукции аргинингидролазы, орнитиндекарбоксилазы и лизиндекарбоксилазы, ацетил-метилкарбинола, к утилизации DL-лактата, к продукции желатиназы и уреазы, к ферментации углеводов (глюкозы, сахарозы, маннита, мальтозы, сорбита и ксилозы), гемолитической активности - на колумбийском агаре с добавлением 5% дефибрированной крови барана/раствора гемоглобина.

В результате работы выполнен подбор компонентов 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.

Разработка молекулярно-генетического компонента тест-системы

Метод ПЦР с электрофоретической детекцией результата амплификации

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

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

Протокол амплификации: предварительная денатурация – 95 °С в течение 5 минут, 1 цикл, денатурация- 95 °С в течение 5 сек, отжиг- 60 °С в течение 15 сек, 40 циклов.

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

Метод ПЦР-РВ

Произведён поиск *in-silico* таргентных участков геномов бактерий *Aeromonas* spp. для разработки систем праймеров для видовой идентификации в «режиме реального времени» *A. hydrophila*. В качестве целевых регионов геномов был использован ген клеточного деления (*zipA*) (Таблица 1).

Таблица 1– Разработанные системы праймеров для идентификации бактерий рода *Aeromonas* 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 TATTCGGGAGCGGCAACC	
		Зонд FAM TGCAACCGCTGGACGAAGAG BHQ1	

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.

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.

Метод RT-LAMP

Праймеры и зонд для создания протокола для детекции и идентификации бактерий *A. hydrophila* методом петлевой изотермической реакции в режиме «реального времени» (RT-LAMP) по каналу Rox представлены на рисунке 1.

В результате проведенных экспериментов был разработан протокол и эмпирически подобраны компоненты для постановки реакции: FIP - 1,6 мМ, QPD-Су5 - 1,6 мМ, BIP - 3,2 мМ, F3 и B3 - 1 мМ каждого, смесь

дезоксинуклеотидов (dNTP) (10 mM) концентрацией 1,5 mM каждого, 1x буфер, сульфат магния (200mM) 15 mM, MBst-полимераза 4 ед., 5 мкл ДНК-матрицы, объем доводился до 20 мкл деионизированной водой. Амплификация проводилась при температуре 63 °C, в течение 60 циклов, длительность каждого цикла составляла 50 секунд. Флуоресцентный сигнал снимался после каждого цикла каналу Rox (Рисунок 1).

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

Праймер	Последовательность
F3	CTCGGGGGCTGCATGA
B3	CAGGTCATTCGCCGTACC
FIP	CGCGACCGCACCCACTTTGTATTCGGGAGCGGCAAC
BIP	GCTCGACCAGCGGCTCTTTCCACCGTTCCCGTCC
Q	ROX-CGCGACCGCACCCACTTTGTATTCGGGAGCGGCAAC
Fd	AAAGTGGGTGCGGTGCG -BHQ1

Рисунок 1 – Праймеры для создания протокола для детекции и идентификации бактерий *A. hydrophila* методом петлевой изотермической реакции в режиме «реального времени» (RT-LAMP) по каналу Rox

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

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

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

1 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 $t = +30\text{ }^{\circ}\text{C}$);

2 этап – идентификация, основанная на 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.В.1-УлГАУ (параметры культивирования: 24 часа при $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$), вторичный посев на дифференциально-диагностическую среду BSIBG-агар (параметры культивирования: 24 часа при t

= 30 °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 $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

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».

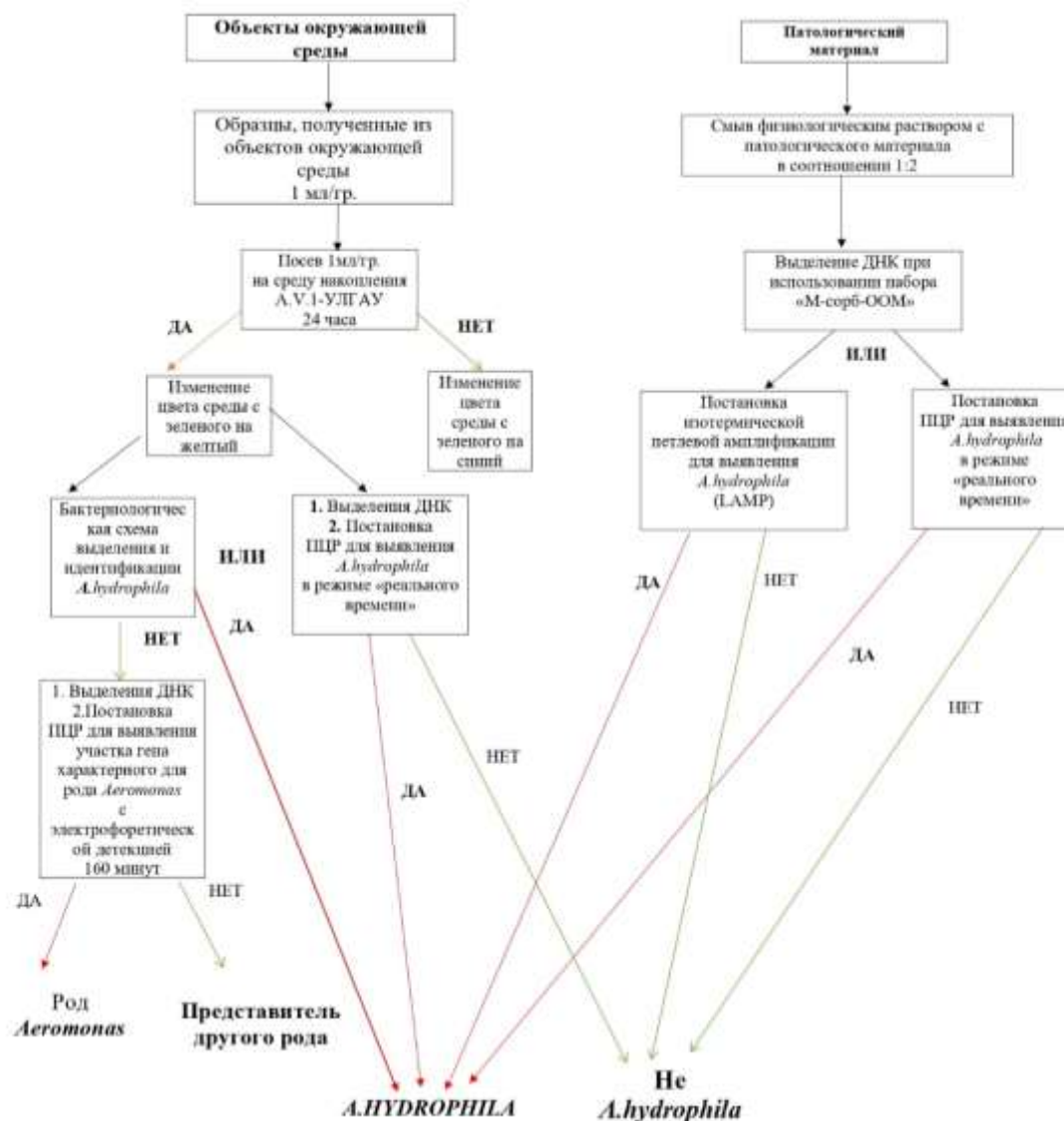


Рисунок 2 – Комплексная тест-система для выделения и идентификации *A. hydrophila*

Б) для выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila* в патологическом материале предпочтительно использовать метод LAMP с детекцией результата амплификации в режиме «реального времени».

Апробация комплексной тест-системы для 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.

В результате исследований установлено, что все выделенные штаммы - это грамотрицательные, каталазо- и оксидазоположительные палочки, располагающиеся в окрашенных бактериологических мазках парами. Изоляты *A. hydrophila* 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.

У всех выделенных штаммов был детектирован участок гена *gyrB*. Изоляты *A. hydrophila* были идентифицированы при помощи подобранных праймеров для детекции и идентификации бактерий методами ПЦР-РВ и петлевой изотермической реакцией (LAMP).

Изучение антибиотикорезистентности выделенных бактериальных изолятов

Установлено, что бактериальные изоляты, идентифицированные как *A. hydrophila*, характеризовались резистентностью к β -лактамным пенициллинам, были не устойчивы к мупироцину и эритромицину (Рисунок 3), были чувствительны к β -лактамным цефалоспорином и ряду фторхинолонов (ломефлоксацину, норфлоксацину).

Все выделенные штаммы бактерий обладали устойчивостью к аминогликозидам, линкозамидам и производным нитрофуранов.

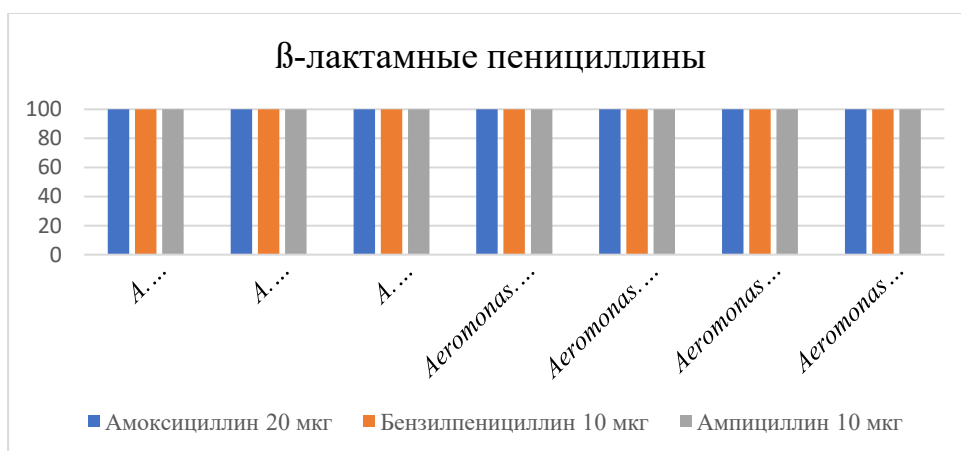


Рисунок 3 – Изучение устойчивости штаммов *Aeromonas* к β -лактамным пенициллинам

Штаммы *A. hydrophila* 11, *A. hydrophila* 12, *A. hydrophila* A1, *A. hydrophila* pA, *A. hydrophila* 14 и *Aeromonas* spp. M1 были чувствительны к триметоприм/сульфаметоксазолу. Необходимо отметить, что выделенные при апробации комплексной-тест системы штаммы *Aeromonas* spp M1, *Aeromonas* sp. AK, *Aeromonas* spp. AM и *Aeromonas* spp. 2BH проявляли устойчивость к широкому спектру антимикробных веществ по сравнению бактериями *A. hydrophila*.

Факторы вирулентности выделенных штаммов *Aeromonas*

В результате серии экспериментов у экспериментального пула бактерий рода *Aeromonas* было определено наличие генов, кодирующих факторы вирулентности: *aerA*, *aexT*, *alt*, *ascV*, *ascB*, *ast*, *fla*, *lip*, *ela*, *stx-1* и *vasH*. Полученные результаты представлены в таблице 2.

У всех изученных штаммов *A. hydrophila* были детектированы гены «домашнего хозяйства» (16s rRNA и *gyrB*), определено наличие генов аэролизина (*aerA*), гемолизина (*hlyA*), гена термостабильного цитотонического энтеротоксина (*ast*), термолабильного энтеротоксина (*alt*), белка, кодирующего субъединицу жгутика (*fla*), липазу (*lip*), эластазу (*ela*).

Таблица 2 – Характеристика штаммов рода *Aeromonas* по участкам генов, кодирующих факторы вирулентности

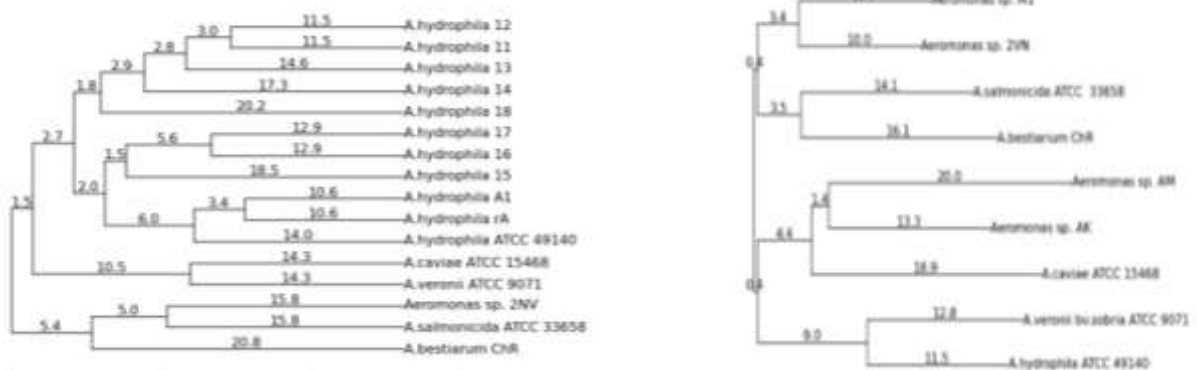
Ген	Штаммы									
	<i>A. hydrophila</i> N=10	<i>Aeromonas</i> sp. AK	<i>Aeromonas</i> sp. AM	<i>Aeromonas</i> sp. 2BH	<i>Aeromonas</i> sp. M1	<i>A. bestiarum</i> ЧР	<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33568	<i>A. caviae</i> ATCC 15468	<i>A. veronii</i> 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 - «+» наличие гена; «-» отсутствие гена.

Экспериментальный пул бактериальных изолятов *A. hydrophila* не характеризовался наличием генов, кодирующих АДФ-рибозилирующий токсин (aehT), компоненты системы секреции T3SS (aopB и ascV), систему секреция шестого типа (vasH). 9 из 10 штаммов *A. hydrophila* не имели участка гена шига-токсина (stx-1). Штамм *A. hydrophila* A1 характеризовался наличием участка гена stx-1.

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

Экспериментально было установлено, что все выделенные изоляты *Aeromonas* spp. имеют уникальный молекулярно-генетический профиль, Генотипирование методом BOX-PCR позволило разделить бактерии *A. hydrophila* на две основные геногруппы (Рисунок 4).



А

Б

Рисунок 4 – Результаты фингерпринтинга ДНК штаммов *Aeromonas* spp. А) методом BOX-PCR, Б) UPGMA

К первой были отнесены штаммы *A. hydrophila* 11, *A. hydrophila* 12, *A. hydrophila* 13, *A. hydrophila* 14, *A. hydrophila* 18. При использовании метода UPGMA была установлена близкородственность штаммов *A. hydrophila* 11, *A. hydrophila* 12, так как коэффициент генетического расстояния составил 11,5; для *A. hydrophila* 13 он составил 14,6; для *A. hydrophila* 14 – 17,3; для *A. hydrophila* 18 – 20,2.

Ко второй геногруппе были отнесены изоляты *A. hydrophila* 16, *A. hydrophila* 17, *A. hydrophila* pA, референс-штамм *A. hydrophila* ATCC 49140. Необходимо отметить, что бактериальные штаммы, выделенные от рыб (*A. hydrophila* A1 и *A. hydrophila* pA), показали высокую идентичность, согласно данным UPGMA, поэтому они были вынесены в отдельную подгруппу.

В отдельную геногруппу были объединены штаммы *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, *A. bestiarum* ЧР, *Aeromonas* sp. 2ВН и *Aeromonas* sp.

М1. Штаммы *A. salmonicida* и *Aeromonas* sp. 2ВН были выделены в одну геногруппу (показатель генетического расстояния - 17,3 и 16,0, соответственно).

Установлено, что штамм *Aeromonas* sp. М1 генетически ближе к *A. bestiarium* ЧР, *Aeromonas* sp. АК - к *A. hydrophila*, *Aeromonas* sp. АМ - к группе, в которую входили референс-штаммы *A. veronii* и *A. caviae*.

На основании дендрограммы, составленной на данных ERIC-ПЦР, было сформировано три группы. Первый генотип был характерен для штаммов *A. hydrophila* 13, *A. hydrophila* 14, *A. hydrophila* 15, *A. hydrophila* 16 и *A. hydrophila* А1. Зафиксирована идентичность у изолятов *A. hydrophila* 15 и *A. hydrophila* 16, но коэффициент генетической дистанции был выше у штаммов *A. hydrophila* 13 (9,4) и *A. hydrophila* А1 (15,0) (Рисунок 5).

Ко второму генотипу были отнесены штаммы *A. hydrophila* 11, *A. hydrophila* 12, *A. hydrophila* 14, *A. hydrophila* 18, *A. hydrophila* рА и *A. hydrophila* ATCC 49140. Максимальная гомология была установлена между *A. hydrophila* рА и *A. hydrophila* ATCC 49140, коэффициент генетического расстояния составил 5,9, в свою очередь коэффициент между штаммами *A. hydrophila* 11 и *A. hydrophila* 12 составил 1,4. Наиболее обособленно от других представителей этой группы находится штамм *A. hydrophila* 18.

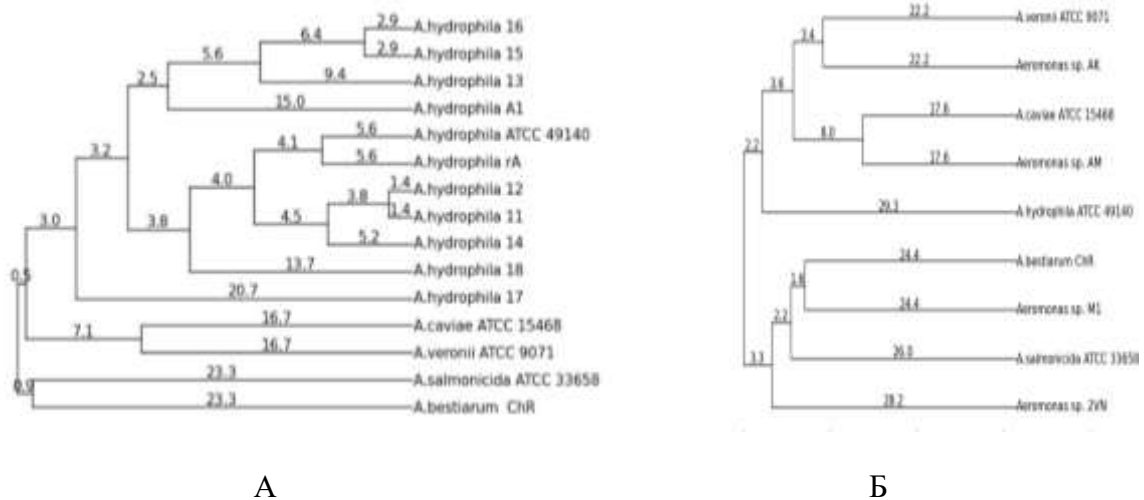


Рисунок 5 – Результаты фингерпринтинга ДНК штаммов *Aeromonas* spp. А) методом ERIC-PCR, Б) UPGMA

В отдельный генотип был вынесен изолят *A. hydrophila* 17.

Штаммы *A. bestiarium* ЧР и *A. salmonicida subsp. salmonicida* ATCC 33658 были выделены также в отдельный генотип. Было установлено, что штаммы *Aeromonas* sp. М1 и *Aeromonas* sp. 2ВН относятся к генетической группе, в которую так же входят бактерии *Aeromonas 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. AM вошел в состав группы, в которую входил *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071.

На основании полученных данных и проведенного анализа были выделены основных 6 геногрупп. В кластеры «1-3» входили представители вида *A. hydrophila*, к генотипу «4» были отнесены штаммы *Aeromonas* sp. AK, *A. caviae* ATCC 15468, к «5» - штаммы *Aeromonas* sp. AM и *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071. К «6» генотипу были отнесены штаммы *Aeromonas* sp. M1, *Aeromonas* sp. 2BH, *Aeromonas bestiarum* ЧР, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658.

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

В результате работы 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 А.в.1-УГАУ, дифференциально-диагностическую среду BSIBG-agar, изучение способности бактериальных изолятов к продукции ксилоты, 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. bestiarum* 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 в качестве одного из инструментов для эпизоотологического мониторинга и скрининговых исследований.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК

Минобрнауки России

1. Изучение профилей чувствительности бактерий рода *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. salmonicida*), выделенных из объектов ветеринарно-санитарного надзора / **А. А. Ломакин**, Н. А. Феоктистова, А. В. Мاستиленко, А.Н. Минаева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2023. – № 3(63). – С. 120–126.
2. Разработка и апробация схемы выделения и бактериологической идентификации *Aeromonas hydrophila* / **А. А. Ломакин**, Н. А. Феоктистова, Е. В. Сульдина, А.А. Нафеев // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2024. – № 1(65). – С. 117–124.
3. **Ломакин, А. А.** Анализ разнообразия генотипов рода *Aeromonas*, выявленных с помощью метода ERIC-ПЦР/ **А. А. Ломакин**, Н. А. Феоктистова // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2024. – № 4(68). – С. 102-108.

Работы, опубликованные в прочих изданиях

4. **Ломакин, А. А.** Разработка ускоренного метода идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* методом ПЦР-РВ / **А. А. Ломакин**, Н. А. Феоктистова, А. В. Мастиленко // Зыкинские чтения: Материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Леонида Федоровича Зыкина, Саратов, 28 апреля 2023 года. – Саратов: Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова, 2023. – С. 124-128.
5. Феоктистова, Н.А. Подбор дифференциально-диагностической среды для выявления бактерий *Aeromonas hydrophila* / Н.А. Феоктистова, **А.А. Ломакин**, М.А. Сергатенко // Фундаментальные аспекты и практические вопросы современной микробиологии и биотехнологии: Материалы Национальной научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 70-летию со дня рождения доктора биологических наук, профессора, Почётного работника высшего профессионального образования РФ,

Заслуженного деятеля науки и техники Ульяновской области Дмитрия Аркадьевича Васильева, Ульяновск, 27 ноября 2024 год – Ульяновск: Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, 2024.– С. 54-59.

6. Феоктистова, Н.А. Изучение резистентности к антибактериальным препаратам штаммов бактерий рода *Aeromonas* / Н.А. Феоктистова, **А.А. Ломакин**, М.А. Сергатенко // Фундаментальные аспекты и практические вопросы современной микробиологии и биотехнологии: Материалы Национальной научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 70-летию со дня рождения доктора биологических наук, профессора, Почётного работника высшего профессионального образования РФ, Заслуженного деятеля науки и техники Ульяновской области Дмитрия Аркадьевича Васильева, Ульяновск, 27 ноября 2024 год – Ульяновск: Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, 2024. – С. 60-66.

7. **Ломакин, А.А.** Анализ геноразнообразия коллекций бактерий рода *Aeromonas* методом Вох-ПЦР/ А.А. Ломакин, Н.А. Феоктистова // IV Пущинская кола-конференция молодых учёных, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие»: сборник тезисов, Пущино, 3–5 декабря 2024 г. –Пущино: ГЕОС–С. 38–40.

8. Аэромоназ карповых: возбудители, диагностика и профилактика инфекции: монография / Н. А. Феоктистова, **А. А. Ломакин**, И. И. Богданов, Е.В. Сульдина, А.А. Нафеев – Ульяновск: Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина, 2024. – 250 с.