

УДК 579.62:577.21

DOI 10.18286/1816-4501-2022-2-107-113

**РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ПОСТАНОВКИ (LAMP) ПЕТЛЕВОЙ
ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ
ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *BORDETELLA PETRII***

Ломакин Артём Андреевич, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарной экспертиза»

Мастиленко Андрей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарной экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, дом 1: тел.: 89603621517

e-mail: artemy.lomakin@yandex.ru

Ключевые слова: *Bordetella petrii*, праймеры, параметры, молекулярные методы, петлевая изотермическая амплификация, LAMP.

Статья посвящена разработке метода петлевой изотермической амплификации (LAMP) для ускоренной идентификации малоизученных бактерий *Bordetella petrii*, которые выделяются от животных и человека. LAMP основывается на идентификации консервативного гена в целевой группе микроорганизмов, против которой должна быть разработана серия из четырех-шести праймеров. Протокол исследования занимает менее одного часа и включает амплификацию целевого гена с использованием полимеразы *Bst* в изотермических условиях.

Авторами был выполнен дизайн видоспецифичных праймеров для идентификации бактерий *B. petrii*, в исследованиях использовали ген регулятора транскрипции *LysR*. Специфичность подобранных праймеров была подтверждена BLAST на сервере Национального центра биотехнологической информации (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Исследователями были подобраны параметры постановки реакции, проверена специфичность разработанного протокола и оптимальное время амплификации, определена чувствительность разработанного протокола LAMP для идентификации бактерий *B. petrii*. Установлено, что оптимальный результат амплификации регистрируется через 40-50 минут, проведение электрофореза в агарозном геле свидетельствует, что чувствительность разработанного протокола амплификации составляет 10 копий ДНК. Разработанный метод является специфичным, что подтверждается отрицательным результатом реакции на бактериях: *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes spp.*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella infantis*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*.

Введение

На протяжении большей части прошлого века виды *Bordetella* считались патогенами, с ограниченным ареалом распространения и с различной специфичностью к хозяину [1-2]. Однако, в 2001 г. из дехлорирующего биореактора, обогащенного речными осадками, были выделены бактерии, идентифицированные как *Bordetella petrii*. Этот представитель рода *Bordetella* является первым описанным видом, изолированным из объектов окружающей среды

[3-4]. Штаммы бактерий *B. petrii* также были обнаружены в морских губках, в травяных консорциумах, выделялись из источников подземных вод и других проб окружающей среды [5-7]. В литературе описаны данные, что бактерии *B. petrii* были изолированы от людей с ослабленным иммунитетом, больных муковисцидозом и хронической легочной болезнью, с остеомиелитом нижней челюсти [8-11]. Также есть информация, что *B. petrii* были выделены из проб, полученных от животных, в том числе и из сыро-

го верблюжьего молока [12-13]. Тем не менее, роль бактерий *B. petrii* в инфекционных процессах все еще не достаточно ясна, также как и не достаточно охарактеризован ареал распространения данного инфекционного агента [14-15].

Для решения этой проблемы все чаще стали использовать методы молекулярной диагностики, например на основе ПЦР (включая qPCR), которые чувствительны, но требуют дорогостоящего оборудования и реагентов, протокол исследования занимает несколько часов. Такие подходы, как секвенирование 16S рРНК или цельного метагенома обеспечивают отличную специфичность, но также являются дорогостоящими, длительными (от нескольких дней до недель) и требуют высокой квалификации исследователей. В настоящее время все большее применение получает метод петлевой изотермической амплификации LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification). Это новый метод амплификации нуклеиновых кислот, который может амплифицировать гены - мишени в изотермических условиях с преимуществом быстрого, простого и легкого выполнения, как сообщили Notomi и его коллеги [16]. Анализ изотермической амплификации опосредованной петлей (LAMP) сочетает в себе простой, быстрый и недорогой метод обнаружения с высокой чувствительностью и специфичностью [17]. LAMP-анализы являются эффективным диагностическим инструментом, их можно легко выполнить, поскольку они требуют минимального количества оборудования и используют недорогие реагенты. LAMP - тесты широко используются в пищевой промышленности и в клинических условиях для идентификации бактерии, грибов и вирусов [18-19]. LAMP основывается на идентификации консервативного гена в целевой группе микроорганизмов, против которой должна быть разработана серия из четырех-шести праймеров. Протокол исследования занимает менее одного часа и включает амплификацию целевого гена с использованием полимеразы Bst в изотермических условиях. Сообщалось о ряде методологий обнаружения, включая визуальную идентификацию мутности, колориметрические или флуоресцентные интеркаляторы ДНК и конечный электрофорез в агарозном геле [20-21].

Цель работы - разработать параметры постановки LAMP - петлевой изотермической амплификации для ускоренной идентификации бактерий *B. petrii*.

Данная цель достигалась выполнением следующих задач:

1. выполнить дизайн видоспецифичных праймеров для идентификации бактерий *B. petrii*,
2. подобрать параметры постановки реакции LAMP,
3. проверить специфичность разработанного протокола на основе метода LAMP,
4. подобрать оптимальное время амплификации для постановки реакции на основе метода LAMP,
5. определить чувствительность разработанного протокола LAMP для идентификации бактерий *B. petrii*.

Материалы и методы исследований

В работе мы использовали штамм *Bordetella petrii* ATCC BAA-461. Определение специфичности разработанного протокола LAMP в настоящем исследовании проводили на штаммах бактерий: *Bordetella bronchiseptica* 7, *Bordetella avium* ATCC BAA 1003, *Bordetella hinzii* ATCC 51784, *Bordetella holmesii* ATCC 51541, *Bordetella trematum* ATCC 700309, *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Alcaligenes spp* B-5269, *Acinetobacter calcoaceticus* B-5971, *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140, *Citrobacter freundii*-2, *Escherichia coli* K12, *Klebsiella pneumoniae* C6, *Salmonella infantis* 3, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* 103, полученных из музея микробиологии кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ. Все исследуемые штаммы бактерий культивировали на LB-бульоне при температуре 37°C в течение 24 часов. ДНК экстрагировали, используя набор Проба-Рapid (ДНК-технологии, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

В исследованиях использовали: ДНК-полимеразу Bst 3.0 (New England Biolabs, UK), буфер для изотермической амплификации II (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 150 mM KCl, 2 mM MgSO₄ 0.1% Tween® 20 при pH 8.8 и 25°C (New England Biolabs, UK), смесь dNTP (100mM) (New England Biolabs, UK), воду свободную от нуклеаз (New England Biolabs, UK), 2,0% агарозный гель.

Для разработки праймеров в качестве консервативного участка генома бактерии *B. petrii* использовали ген регулятора транскрипции LysR (номер в базе данных NCBI BPET_RS00155). Конструирование праймеров LAMP проводили при помощи Explore V5 (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) и NEB LAMP Primer Design Tool (<https://lamp.neb.com/#/>). Специфичность подобранных праймеров была подтверждена BLAST на сервере Национального центра био-

Праймеры LAMP для детекции бактерий вида *Bordetella petrii*

Название праймера	Тип праймера	Длина праймера	Сиквенс (5' → 3')
F3	Передний внешний праймер	17	GCGCCATGTCGACATCG
B3	Обратный внешний праймер	18	ACAGGCTGTCTGCTCTT
FIP	Передний внутренний праймер	37	ACGCACGCTGCCCTTCA GGTGCAGGCAATGCAGACCG
BIP	Обратный внутренний праймер	42	TGGCTTCATCATCCAGCCTG TCAGTTGACGTCGATATGC
Loop F	Передний кольцевой праймер	19	ACGCACGCTGCCCTTCAGG
Loop B	Обратный кольцевой праймер	22	TGGCTTCATCATCCAGCCTG

Результаты исследований

Последовательности подобранных для детекции бактерий вида *Bordetella petrii* праймеров представлены в таблице 1.

Реакцию LAMP проводили в 25 мкл смеси, содержащей по 0.2 μM каждого из праймеров F3/B3 (25x), по 40 μM каждого из праймеров BIP /FIP(25x), по 0,4 μM каждого из праймеров Loop F/Loop B (25x), ДНК-полимеразу Bst 3.0 (New England Biolabs, UK) 320 единиц/мл, 1x буфер для изотермической амплификации II, включающий 20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 150 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0.1% Tween® 20 при pH 8.8 и 25°C (New England Biolabs, UK), смесь dNTP(100mM) по 1,4 mM каждого (New England Biolabs, UK), пробу ДНК вносили в объеме 5 мкл.

До получения необходимого объема в реакцию добавляли воду свободную от нуклеаз (New England Biolabs, UK). Смесь инкубировали при (58-60°C) в течение 10-50 минут, а затем нагревали при 80°C в течение 5 минут на водяной бане для прекращения реакции. Продукты LAMP оценивали с помощью электрофореза в 2,0% агарозном геле, электрофорезирование проводили при 100 В. Визуализацию результатов проводили в УФ-свете при 312 нм.

Экстрагированную ДНК бактерий *B. petrii* использовали в качестве положительного контроля, а ДНК, экстрагированную из других бактерий, использовали в качестве отрицательного контроля. Условия реакции выполняли, как описано выше. Чтобы оценить чувствительность анализа LAMP для обнаружения *B. petrii*, последовательные разведения экстрагированной ДНК *B. petrii*, содержащей 5 × 10⁷ КОЕ/мл.

Специфичность системы LAMP для детекции бактерий вида *Bordetella petrii* была подтверждена на бактериях – представителях гомологичного рода *Bordetella* и представителях гетерологичных родов и семейств. Анализ результатов амплификации с детекцией в агарозном геле (рис. 1, табл.2) показал, что положительный результат, лестничная диаграмма с набором полос разного размера была только при использовании ДНК из *B. petrii* в качестве матрицы, в отличие от реакций, проводившихся с ДНК, полученной из других бактерий.

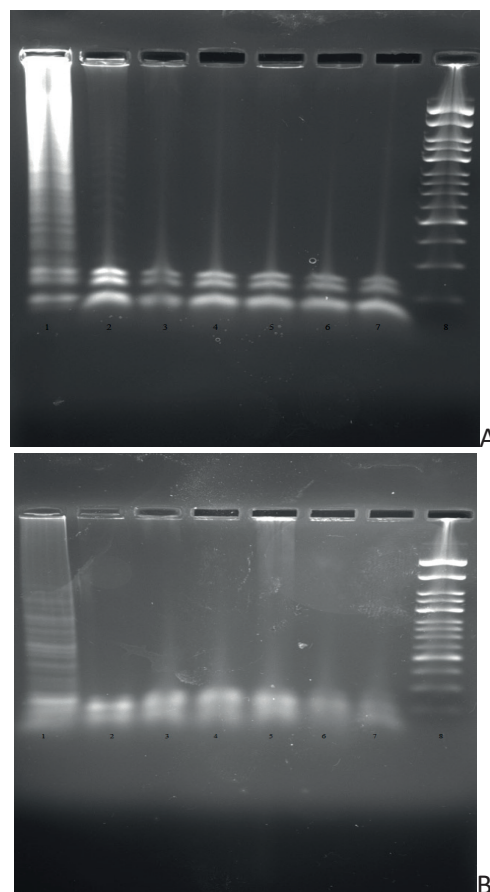


Рисунок 1 - Результаты изучения специфичности разработанной системы LAMP для детекции бактерий вида *Bordetella petrii*: А: 1 - *Bordetella petrii*, 2 - *Bordetella hinzii*, 3 - *Bordetella holmesii*, 4 - *Bordetella avium*, 5 - *Bordetella trematum*, 6 - *B. bronchiseptica*, 7 - контроль, 8 - маркер молекулярной массы; В: 1 - *Bordetella petrii*, 2 - *Alcaligenes spp.*, 3 - *Pseudomonas aeruginosa*, 4 - *Acinetobacter calcoaceticus*, 5 - *Aeromonas hydrophila*, 6 - *Citrobacter freundii*, 7 - контроль, 8 - маркер молекулярной массы

Таблица 2

Изучение специфичности разработанной тест-системы для детекции бактерий вида *Bordetella petrii* на основе метода LAMP

Штаммы бактерий	Результат электрофорезограммы
<i>Bordetella petrii</i> ATCC BAA-461	+
<i>Bordetella hinzii</i> ATCC 51784	-
<i>Bordetella trematum</i> ATCC 700309	-
<i>Bordetella avium</i> ATCC BAA 1003	-
<i>Bordetella holmesii</i> ATCC 51541	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i> 7	-
<i>Alcaligenes spp B-5269</i>	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus B-5971</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 49140	-
<i>Citrobacter freundii-2,</i>	-
<i>Escherichia coli K12</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae C6</i>	-
<i>Salmonella infantis 3</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa 1</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-
<i>Bacillus subtilis 103</i>	-

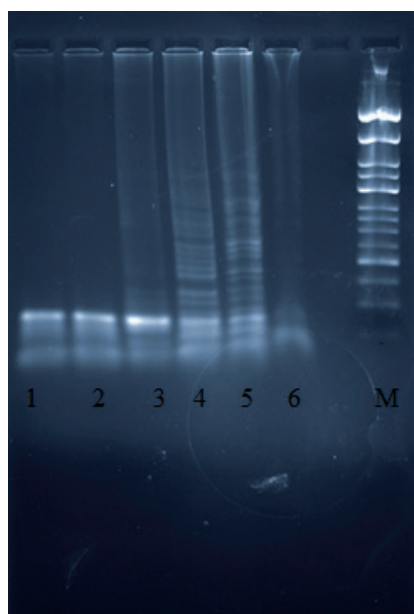


Рис.2 - Электрофорезограмма изучения оптимизации времени амплификации для проведения протокола LAMP. Треки: 1 - 10 минут амплификации, 2 - 20 минут амплификации, 3 - 30 минут амплификации, 4 - 40 минут амплификации, 5 - 50 минут амплификации, 6 - контроль, М - маркер

Следующим этапом нашего исследования был подбор оптимального времени амплификации для постановки реакции на основе метода LAMP. Для этого проводили амплификацию при тех же температурных условиях, что описаны выше, используя следующие временные параметры: 10 минут, 20 минут, 30 минут, 40 минут, 50 минут. После серии экспериментов было установлено, оптимальный результат амплификации регистрируется через 40-50 минут амплификации (рис. 2).

Было произведено изучение чувствительности разработанной тест-системы для детекции бактерий вида *Bordetella petrii* на основе метода LAMP. Для этого мы использовали культуру бактерии *B. petrii* после 24 часов культивирования при температуре 35°C. Было выполнено ее серийное разведение в физиологическом растворе. Для установления концентрации клеток произвели посев на LB-агаре 1мл из каждого разведения. Через 72 часа культивирования был произведен подсчет колоний, концентрация составила 5×10^7 КОЕ/мл. Поэтому в дальнейшем исследовании мы использовали пробирки с первого до седьмого разведения. После выделения нуклеиновой кислоты из указанных выше разведений была выполнена амплификация. В результате проведения амплификации и постановки электрофореза в агарозном геле было установлено, что чувствительность разработанного протокола амплификации составляет 10 копий ДНК.

Обсуждение

В настоящее время большее распространение получил метод петлевой изотермической амплификации LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) в силу своей простоты и быстроты, высокой чувствительности и специфичности. Главным достоинством данного метода является то, что для его проведения не требуется дорогостоящее оборудование.

В результате проведенной работы было установлено, что проблема идентификации бактерий *Bordetella petrii*, которая входит в спектр научных интересов многих исследователей [3, 5-6, 9-11, 14-15], может быть решена применением ускоренной детекции вышеназванных бактерий методом на основе LAMP. Разработанный метод является специфичным, что подтверждается отрицательным результатом реакции на бактериях: *Pseudomonas aeruginosa 1*, *Alcaligenes spp B-5269*, *Acinetobacter calcoaceticus B-5971*, *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140, *Citrobacter freundii-2*, *Escherichia coli K12*,

Klebsiella pneumoniae C6, *Salmonella infantis* 3, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* 103). Степень чувствительности разработанного протокола - 10 копий ДНК. Определенным достоинством является простота исследований, так как экспериментально определено, что оптимальным временем амплификации является временной диапазон в 40-50 минут. Мы согласны с учеными [17-21], которые считают, что благодаря своей простоте, скорости, чувствительности метод петлевой изотермической амплификации может получить широкое распространение в лабораторной практике.

Заключение

В результате проведенных экспериментов были разработаны параметры постановки LAMP - петлевой изотермической амплификации для ускоренной идентификации бактерий *Bordetella petrii*. Был выполнен дизайн видоспецифичных праймеров, подобраны параметры постановки реакции LAMP, проверена специфичность и подобрано оптимальное время амплификации, определена чувствительность разработанного протокола LAMP для идентификации бактерий *B. petrii*.

Разработана новая система идентификации *Bordetella petrii*, достоинствами которой являются простота, высокая чувствительность, простота и экономическая эффективность. Этот метод потенциально может быть использован для испытаний в полевых условиях.

Библиографический список

1. Genotypic and phenotypic adaptation of pathogens: lesson from the genus *Bordetella* / B. Linz, L. Ma, I. Rivera, E. T. Harvill // Current opinion in infectious diseases. – 2019. – Т. 32, № 3. – P. 223.
2. Kamanova, J. *Bordetella* type III secretion injectosome and effector proteins / J. Kamanova // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2020. – Т. 10. – P. 1-17.
3. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella* / F. von Wintzingerode, A. Schattke, R. A. Siddiqui, U. Rösick, U. B. Göbel, R. Gross // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2001. – Т. 51, № 4. – P. 1257-1265.
4. *Bordetella petrii* recovered from chronic pansinusitis in an adult with cystic fibrosis / L. Biederman, M. R. Rosen, B. S. Bobik, A. L. Roberts // IDCases. – 2015. – Т. 2, № 4. – P. 97-98.

5. Isolation and characterization of 1, 2, 4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil / F. Wang, S. Grundmann, M. Schmid, U. Dörfler, S. Roherer, J. C. Munch, R. Schroll // Chemosphere. – 2007. – Т. 67, № 5. – P. 896-902.

6. Species and metabolic pathways involved in bioremediation of Vietnamese soil contaminated with Agent Orange. *Bordetella petrii* emerges as a key player in degradation of 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid / T. L. A. Nguyen, Thi Cam Ha Dang, J. Koekkoek, M. Braster, J. Parsons, B. Brouwer, T. de Boer, R. J. M. van Spanning // Authorea. - 2020. - July 16. – DOI=10.3389/frsc.2021.692018.

7. Rivera, I. Evolution and Conservation of *Bordetella* Intracellular Survival in Eukaryotic Host Cells / I. Rivera, B. Linz, E. T. Harvill // Frontiers in Microbiology. – 2020. – Vol. 11. – P. 2318.

8. *Bordetella petrii* clinical isolate / N. K. Fry, J. Duncan, H. Malnick, M. Warner, A. J. Smith, M. S. Jackson, A. Ayoub // Emerging infectious diseases. – 2005. – Vol. 11, № 7. – P. 1131.

9. *Bordetella petrii* recovered from chronic pansinusitis in an adult with cystic fibrosis / L. Biederman, M. R. Rosen, B. S. Bobik, A. L. Roberts // IDCases. – 2015. – Vol. 2, № 4. – P. 97-98.

10. *Bordetella petrii* sinusitis in an immunocompromised adolescent / J. M. Nagata, G. W. Charville, J. M. Klotz, W. R. Wickremasinghe, D. C. Kann, H. T. Schwenk, C. A. Longhurst // The Pediatric infectious disease journal. – 2015. – Vol. 34, № 4. – P. 458.

11. Persistent *Bordetella petrii* Infection Related to Bone Fractures / S. S. Kwon, J. O. Kim, K. H. Kim, S. H. Jeong, K. Lee // Annals of laboratory medicine. – 2016. – Vol. 36, № 1. – P. 70-72.

12. Microbial Quality and Molecular Identification of Pathogenic Bacterial Strains Collected from Raw Camel's Milk in Taif Region / M. F. Samy, E. H. Yasser, A. L. Othman, S. A. Amer // Journal of Camel Practice and Research. – 2017. – Vol. 24, № 1. – P. 89-98.

13. Soumana Hamidou, I. Environmental origin of the genus *Bordetella* / I. Soumana Hamidou, B. Linz, E. T. Harvill // Frontiers in microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. 28.

14. Adaptability and persistence of the emerging pathogen *Bordetella petrii* / A. M. Zelazny, L. Ding, J. B. Goldberg, L. A. Mijares, S. Conlan, P. S. Conville, S. M. Holland // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 6. – P. e65102.

15. Nogi, M. Septic arthritis and osteomyelitis due to *Bordetella petrii* / M. Nogi, M. J. Bankowski, F. D. Pien // Journal of clinical microbiology. –

2015. – Vol. 53, № 3. – P. 1024-1027.

16. A rapid, sensitive, low-cost assay for detecting hydrogenotrophic methanogens in anaerobic digesters using loop-mediated isothermal amplification / A. M. Alessi, B. Tao, W. Zhang, Y. Zhang, S. Heaven, C. J. Banks, J. P. Chong // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8, № 5. – P. 740.

17. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects / T. Notomi, Y. Mori, N. Tomita, H. Kanda // *Journal of microbiology*. – 2015. – Vol. 53, № 1. – P. 1-5.

18. Rapid and sensitive detection of *Bordetella bronchiseptica* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) / H. Zhang, L. Zhu, Y. Zhou, H. Ji, H. Dai, W. Guo, Z. Xu // *Pesquisa Veterinária Brasileira*. – 2013. – Vol. 33. – P. 1222-1226.

19. The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants / L. Niessen, J. Luo, C. Denschlag, R. F. Vogel // *Food microbiology*. – 2013. – Vol. 36, № 2. – P. 191-206.

20. Mori, Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage / Y. Mori, T. Notomi // *Journal of Infection and Chemotherapy*. – 2020. – Vol. 26, № 1. – P. 13-17.

21. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms / Y. P. Wong, S. Othman, Y. L. Lau, S. Radu, H. Y. Chee // *Journal of applied microbiology*. – 2018. – Vol. 124, № 3. – P. 626-643.

DEVELOPMENT OF PARAMETER SETTING (LAMP) OF LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION FOR ACCELERATED IDENTIFICATION OF BORDETELLA PETRII BACTERIA

Lomakin A.A., Feoktistova N.A., Mastilenko A.V.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ulyanovsk State Agrarian University

432017, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, 1: tel.: 89603621517

e-mail: artemy.lomakin@yandex.ru

Key words: *Bordetella petrii*, primers, parameters, molecular methods, loop isothermal amplification, LAMP.

The article is devoted to development of loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for accelerated identification of little-studied bacteria *Bordetella petrii*, which are isolated from animals and humans. LAMP is based on identification of a conserved gene in a target group of microorganisms against which a series of four to six primers should be designed. The study protocol takes less than one hour and includes amplification of the target gene using *Bst* polymerase in isothermal conditions. Species-specific primers were designed to identify *B. petrii* bacteria, transcription regulator gene *LysR* was used in the studies. The specificity of the selected primers was validated by BLAST at National Center of Biotechnology Information (NCBI) server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The researchers selected parameters for layout of the reaction, tested specificity of the developed protocol and appropriate amplification time, also they determined sensitivity of the developed LAMP protocol for identification of *B. petrii* bacteria. It was established that appropriate amplification result is recorded after 40-50 minutes; agarose gel electrophoresis indicates that sensitivity of the developed amplification protocol is 10 DNA copies. The developed method is specific, which is confirmed by a negative reaction on bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes* spp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella infantis*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus sub*.

Bibliography:

1. Genotypic and phenotypic adaptation of pathogens: lesson from the genus *Bordetella* / B. Linz, L. Ma, I. Rivera, E. T. Harvill // *Current opinion in infectious diseases*. - 2019. - T. 32, № 3. - P. 223.
2. Kamanova, J. *Bordetella* type III secretion injectosome and effector proteins / J. Kamanova // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. - 2020. - V. 10. - P. 1-17.
3. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella* / F. von Wintzingerode, A. Schatke, R. A. Siddiqui, U. Rösick, U. B. Göbel, R. Gross // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. - 2001. - V. 51, № 4. - P. 1257-1265.
4. *Bordetella petrii* recovered from chronic pansinusitis in an adult with cystic fibrosis / L. Biederman, M. R. Rosen, B. S. Bobik, A. L. Roberts // *IDCases*. - 2015. - V. 2, № 4. - P. 97-98.
5. Isolation and characterization of 1, 2, 4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil / F. Wang, S. Grundmann, M. Schmid, U. Dörfler, S. Roherer, J. C. Munch, R. Schroll // *Chemosphere*. - 2007. - V. 67, № 5. - P. 896-902.
6. Species and metabolic pathways involved in bioremediation of Vietnamese soil contaminated with Agent Orange. *Bordetella petrii* emerges as a key player in degradation of 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid / T. L. A. Nguyen, Thi Cam Ha Dang, J. Koekkoek, M. Braster, J. Parsons, B. Brouwer, T. de Boer, R. J. M. van Spanning // *Authorea*. - 2020. - July 16. - DOI=10.3389/frsc.2021.692018.
7. Rivera, I. Evolution and Conservation of *Bordetella* Intracellular Survival in Eukaryotic Host Cells / I. Rivera, B. Linz, E. T. Harvill // *Frontiers in Microbiology*. - 2020. - Vol. 11. - P. 2318.
8. *Bordetella petrii* clinical isolate / N. K. Fry, J. Duncan, H. Malnick, M. Warner, A. J. Smith, M. S. Jackson, A. Ayoub // *Emerging infectious diseases*. - 2005. - Vol. 11, № 7. - P. 1131.
9. *Bordetella petrii* recovered from chronic pansinusitis in an adult with cystic fibrosis / L. Biederman, M. R. Rosen, B. S. Bobik, A. L. Roberts // *IDCases*. - 2015. - Vol. 2, № 4. - P. 97-98.
10. *Bordetella petrii* sinusitis in an immunocompromised adolescent / J. M. Nagata, G. W. Charville, J. M. Klotz, W. R. Wickremasinghe, D. C. Kann, H. T. Schwenk, C. A. Longhurst // *The Pediatric infectious disease journal*. - 2015. - Vol. 34, № 4. - P. 458.
11. Persistent *Bordetella petrii* Infection Related to Bone Fractures / S. S. Kwon, J. O. Kim, K. H. Kim, S. H. Jeong, K. Lee // *Annals of laboratory medicine*. - 2016. - Vol. 36, № 1. - P. 70-72.
12. Microbial Quality and Molecular Identification of Pathogenic Bacterial Strains Collected from Raw Camel's Milk in Taif Region / M. F. Samy, E. H. Yasser, A. L. Othman, S. A. Amer // *Journal of Camel Practice and Research*. - 2017. - Vol. 24, № 1. - P. 89-98.
13. Soumana Hamidou, I. Environmental origin of the genus *Bordetella* / I. Soumana Hamidou, B. Linz, E. T. Harvill // *Frontiers in microbiology*. - 2017. - Vol. 8. - P. 28.
14. Adaptability and persistence of the emerging pathogen *Bordetella petrii* / A. M. Zelazny, L. Ding, J. B. Goldberg, L. A. Mijares, S. Conlan, P. S. Conville, S. M. Holland // *PLoS One*. - 2013. - Vol. 8, № 6. - P. e65102.
15. Nagi, M. Septic arthritis and osteomyelitis due to *Bordetella petrii* / M. Nagi, M. J. Bankowski, F. D. Pien // *Journal of clinical microbiology*. - 2015. - Vol.

53, № 3. - P. 1024-1027.

16. A rapid, sensitive, low-cost assay for detecting hydrogenotrophic methanogens in anaerobic digesters using loop-mediated isothermal amplification / A. M. Alessi, B. Tao, W. Zhang, Y. Zhang, S. Heaven, C. J. Banks, J. P. Chong // *Microorganisms*. - 2020. - Vol. 8, № 5. - P. 740.

17. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects / T. Notomi, Y. Mori, N. Tomita, H. Kanda // *Journal of microbiology*. - 2015. - Vol. 53, № 1. - P. 1-5.

18. Rapid and sensitive detection of *Bordetella bronchiseptica* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) / H. Zhang, L. Zhu, Y. Zhou, H. Ji, H. Dai, W. Guo, Z. Xu // *Pesquisa Veterinária Brasileira*. - 2013. - Vol. 33. - P. 1222-1226.

19. The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants / L. Niessen, J. Luo, C. Denschlag, R. F. Vogel // *Food microbiology*. - 2013. - Vol. 36, № 2. - P. 191-206.

20. Mori, Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage / Y. Mori, T. Notomi // *Journal of Infection and Chemotherapy*. - 2020. - Vol. 26, № 1. - P. 13-17.

21. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms / Y. P. Wong, S. Othman, Y. L. Lau, S. Radu, H. Y. Chee // *Journal of applied microbiology*. - 2018. - Vol. 124, № 3. - P. 626-643.