

Разработка тест-системы для детекции *Aeromonas caviae* методом ПЦР-РВ

А. В. Родионова[✉], аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Е. В. Сульдина, старший преподаватель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

И. И. Богданов, кандидат ветеринарных наук, доцент, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017 г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1

[✉]arina.rodionova-arina2012@yandex.ru

Резюме. Работу проводили с целью разработки тест-системы на основе метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для идентификации бактерий вида *Aeromonas caviae*. В качестве гена интереса был определен ген тиопуриновой S-метилтрансферазы (tpm) *Aeromonas caviae*. При помощи программы SnapGene были подобраны олигонуклеотидные праймеры. Специфичность разработанных праймеров была проверена в системе Primer-BLAST в базе данных последовательностей NCBI. Проведены исследования по оптимизации работы праймеров с интеркалирующим красителем SYBR Green. Видоспецифичность подобранных праймерных систем оценивали с использованием референсных штаммов гетерологичных видов *Aeromonas salmonicida* 33658, *Aeromonas sobria* 6, *Aeromonas hydrophila* 49140. Были идентифицированы только штаммы вида *Aeromonas caviae*, что подтверждает видоспецифичность предложенных праймерных систем. Для получения более чувствительной и специфичной ПЦР-РВ с помощью программы UGENE был подобран олигонуклеотидный зонд – CGAGTATCAGCCCCGAGCAGCAG флуоресцентный краситель FAM, гаситель – BHQ1. Концентрация зонда оптимизирована на уровне 0,5 pM на реакцию. Чувствительность тест-системы составила 10² копий/мл. Апробация системы на основе праймеров и зонда позволила подтвердить видовую принадлежность 9 полевых штаммов *Aeromonas caviae*, ранее выделенных нами из объектов внешней среды. Разработанная тест-система на основе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени может быть использована в качестве одного из этапов в схеме ускоренного выделения и идентификации бактерий вида *Aeromonas caviae* из объектов внешней среды и позволит сократить время исследований до 50...52 ч.

Ключевые слова: *Aeromonas caviae*, аэромоназ, полимеразная цепная реакция, праймер, зонд, бактерии, инфекционные заболевания.

Для цитирования: Родионова А. В., Сульдина Е. В., Богданов И. И. Разработка тест-системы для детекции *Aeromonas caviae* методом ПЦР-РВ // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2024. №2 (66). С. 143-148. doi:10.18286/1816-4501-2024-2-143-148

Development of a test system for detection of *Aeromonas caviae* by RT-PCR

A. V. Rodionova[✉], E. V. Sulдина, I. I. Bogdanov

FSBEI HE Ulyanovsk State Agrarian University

432017 Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, 1; 89374545651

[✉]arina.rodionova-arina2012@yandex.ru

Abstract. The work was carried out with the aim of developing a test system based on the real-time polymerase chain reaction method for identifying bacteria of *Aeromonas caviae* species. The thiopurine S-methyltransferase (tpm) gene of *Aeromonas caviae* was identified as the gene of interest. Oligonucleotide primers were selected using the SnapGene program. The specificity of the designed primers was checked using the Primer-BLAST system in the NCBI sequence database. Research was carried out to improve the performance of primers with the intercalating dye SYBR Green. The species specificity of the selected primer systems was assessed using reference strains of the heterologous species *Aeromonas salmonicida* 33658, *Aeromonas sobria* 6, *Aeromonas hydrophila* 49140. Only strains of *Aeromonas caviae* species were identified, which confirms the species specificity of the proposed primer systems. To obtain a more sensitive and specific RT-PCR, an oligonucleotide probe was selected using the UGENE program - CGAGTATCAGCCCCGAGCAGCAG fluorescent dye FAM, quencher BHQ1. The probe concentration is optimized at 0.5 pM per reaction. The sensitivity of the test system was 10² copies/ml. Testing of a system based on primers and a probe made enabled to confirm the species identity of 9 field strains of *Aeromonas caviae* that we had previously isolated from environmental objects. The developed test system based on real-time polymerase chain reaction can be used as one of the stages in the scheme for

accelerated isolation and identification of bacteria of *Aeromonas caviae* species from environmental objects and will reduce the research time to 50...52 hours.

Keywords: *Aeromonas caviae*, aeromonosis, polymerase chain reaction, primer, probe, bacteria, infectious diseases.

For citation: Rodionova A. V., Suldina E. V., Bogdanov I. I. Development of a test system for detection of *Aeromonas caviae* by RT-PCR // Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy. 2024;2(66): 143-148 doi:10.18286/1816-4501-2024-2-143-148

Введение

Aeromonas caviae – представители семейства *Aeromonadaceae*, грамотрицательные палочки размером 1,0/3,5×0,3/1,0 мкм с одним полярным жгутиком [1]. Это условно-патогенные бактерии, которые вызывают инфекции у таких водных животных, как индийский сом, радужная форель, белая креветка, рак, карп обыкновенный, белый амур и др. [2]. Симптоматика заражения инфекцией сопровождается отсутствием аппетита, поверхностным плаванием, вялостью, язвами и вздутием брюха. [3]. Инфекции, вызванные *Aeromonas caviae*, наносят серьезный ущерб развитию аквакультуры [4].

Данный микроорганизм часто встречается в свежем мясе [5, 6] (говядина, птица и свинина) и молочных продуктах [7] (сырое молоко и мороженое).

Вода и продукты питания могут стать причиной заражения аэромоназом людей, вызывая гастроэнтерит и раневые инфекции, особенно у лиц с печеночной недостаточностью и циррозом печени [8]. Симптомы гастроэнтерита, вызываемого *Aeromonas caviae*, варьируют от острой водянистой диареи (наиболее распространенная форма) до дизентерийной или хронической болезни [9]. Стул при острой водянистой диарее жидкий, эритроциты и лейкоциты в кале отсутствуют [10], боль в животе, лихорадка, рвота и тошнота. *Aeromonas caviae* может даже провоцировать воспаление кишечника у детей [11]. Наиболее часто аэромонады выделяют из организма человека при ранах из раневого отделяемого и из крови при сепсисе [12].

Основываясь на молекулярной идентификации 1851 штамма аэромонад, выделенных в ходе различных исследований по всему миру, 37,3 % штаммов, ассоциированных с инфекциями человека, соответствуют виду *A. caviae* [13,14]. Чаще всего культура была выделена из фекалий, крови и раневого отделяемого (рис. 1).

По статистике более 60% инфекций, не связанных с кишечными, вызванными *Aeromonas caviae*, развиваются у людей старше 65 лет, имеющих ослабленный иммунитет либо основные заболевания (злокачественные новообразования, сахарный диабет, почечную недостаточность и др.). Кроме того, более 50% пациентов с инфекцией, вызванной *Aeromonas caviae*, имели сопутствующие заболевания гепатобилиарной системы, включая желчные камни, обструктивную болезнь желчных путей, опухоль желчного пузыря или желчевыводящих путей и рак печени [15].

В настоящее время в Российской Федерации методы идентификации *Aeromonas caviae* представлены изучением морфологических, культуральных и биохимических свойств, определением устойчивости к противомикробным препаратам, но они не совершенны в

связи с текучестью биохимических свойств [17,18] и недостатком информации относительно внутриродовой дифференцировки [16].

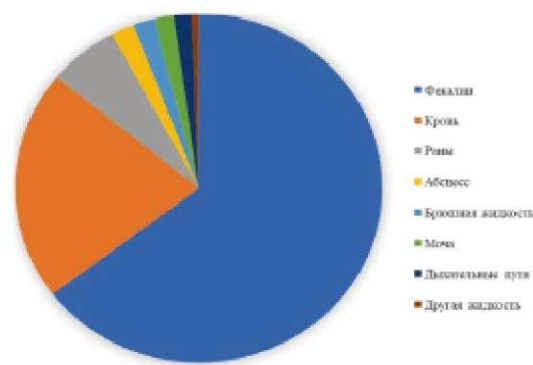


Рис. 1. Распространение *Aeromonas caviae*, идентифицированных молекулярными методами и выделенных из разных источников, связанных с инфекциями человека

Для расширения диагностических возможностей и своевременной идентификации *Aeromonas caviae* целью наших исследований стала разработка тест-системы для детекции *Aeromonas caviae* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и ее апробация.

Материалы и методы

Объектами исследования стали референс-штаммы *Aeromonas caviae* SK, *Aeromonas caviae* 15468, *Aeromonas caviae* ATCC, штаммы гетерологичных видов: *Aeromonas salmonicida* 33658, *Aeromonas sobria* 6, *Aeromonas hydrophila* 49140, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

Для апробации результатов исследований в работе использовали ДНК, полученную из штаммов, ранее выделенных нами из внешней среды и идентифицированных как *Aeromonas caviae* по биологическим свойствам: 1асв, 4асв, 8асв, 11асв, 12асв, 15асв, 17асв, 23асв, 24асв.

Выделение ДНК осуществляли с помощью наборов «Лириат» для выделения РНК и ДНК (Биолабмикс-LRP-100-2, Россия), «S-Сорб» для выделения ДНК на сорбенте (Синтол, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

Для постановки ПЦР применяли реакционную смесь «БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2*)» (Биолабмикс, Россия) и стандартный набор лабораторного оборудования и расходных материалов.

Результаты

Первым этапом исследования стал анализ последовательности генома *Aeromonas caviae* в системе NCBI (рис. 2). В качестве гена интереса был определен ген тиопуриновой S-метилтрансферазы (*trpM*) *Aeromonas caviae*.

thiopurine S-methyltransferase [Aeromonas caviae]

GenBank: W0887405.1
 Identical Proteins FASTA Graphics
 LOCUS W0887405 215 aa linear BCT 17-DEC-2023
 DEFINITION thiopurine S-methyltransferase [Aeromonas caviae].
 ACCESSION W0887405
 VERSION W0887405.1
 DBLINK BioProject: PRJNA1047486
 BioSample: SAMN08562718
 accession CP139974.1
 DBSOURCE
 KEYWORDS
 SOURCE aeromonas caviae
 ORGANISM *Aeromonas caviae*
 Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; Aeromonas.
 REFERENCE 1 (residues 1 to 215)
 AUTHORS Hogle, S.L.
 TITLE Genome sequencing and assembly of bacterial species from a model synthetic community
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (residues 1 to 215)
 AUTHORS Hogle, S.L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-DEC-2023) Biology, University of Turku, FI-20014 Turun yliopisto, Turku 20014, Finland
 COMMENT The annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP). Information about PGAP can be found here: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/

Рис. 2. Аннотированный в системе NCBI ген тиопуриновой S-метилтрансферазы (*trpM*) *Aeromonas caviae* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/2636518331>)

Праймеры к выбранному участку были подобраны в программе SnapGene (рис. 3). Специфичность разработанных праймеров была проверена в системе Primer-BLAST в базе данных последовательностей NCBI (рис. 4).

Последовательности праймеров были следующими:

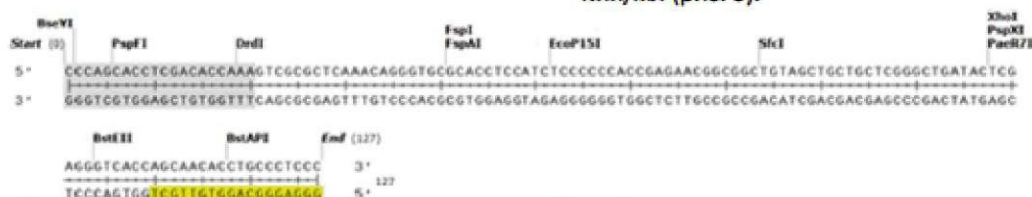


Рис. 3. Подбор праймеров с помощью программы SnapGene

Primer pair 1	Sequence (5'-3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGGAGGGCAGGTGTTGCT	18	61.97	66.67	3.00	0.00
Reverse primer	CCCAGCTCGACACCAA	20	62.67	60.00	4.00	0.00

Products on target templates

NCPI39974.1 *Aeromonas caviae* strain HAMB1_1972 chromosome, complete genome

product length = 126
 Forward primer 1 GGGAGGGCAGGTGTTGCT 18
 Template 2529234 2529197
 Reverse primer 1 CCCAGCTCGACACCAA 20
 Template 2529889 2529288

NCPI32937.1 *Aeromonas caviae* strain LZSFT54 chromosome, complete genome

product length = 126
 Forward primer 1 GGGAGGGCAGGTGTTGCT 18
 Template 3818888 3818881
 Reverse primer 1 CCCAGCTCGACACCAA 20
 Template 3818773 3818792

NCPI099742.1 *Aeromonas caviae* strain OT55 chromosome, complete genome

product length = 126
 Forward primer 1 GGGAGGGCAGGTGTTGCT 18
 Template 3687851 3687838
 Reverse primer 1 CCCAGCTCGACACCAA 20
 Template 3687790 3687889

Рис. 4. Проверка специфичности подобранных праймеров при помощи NCBI Primer-BLAST

F: GGGAGGGCAGGTGTTGCT
 R: CCCAGCACCTCGACACCAA

Оптимизацию работы праймеров с интеркалирующим красителем SYBR Green проводили с использованием выделенной ДНК штамма *Aeromonas caviae* 15468, используя следующие параметры постановки полимеразной цепной реакции в режиме реального времени: 1. Предварительная денатурация – 95°C – 5 минут. 2. 40 циклов: Денатурация – 95°C в течение 10 сек, Отжиг– 62 °C в течение 15 сек.

Видоспецифичность подобранных праймерных систем оценивали с использованием штаммов *Aeromonas salmonicida* 33658, *Aeromonas sobria* 6, *Aeromonas hydrophila* 49140. В результате проведенной реакции были идентифицированы только штаммы вида *Aeromonas caviae*. Не было зафиксировано ни одного ложноположительного результата, что подтверждает видоспецифичность предложенных праймерных систем (рис. 5).

Для получения более чувствительной и специфичной системы с помощью программы UGENE был подобран олигонуклеотидный зонд – CGAGTATCAGCCCGAGCAGCAG флуоресцентный краситель FAM, гаситель – BHQ1. Концентрация зонда оптимизирована на уровне 0,5 pM на реакцию. Анализ ПЦР проводили при следующих показателях цикла: 1. Предварительная денатурация – 95°C – 5 минут. 2. 45 циклов: Денатурация – 95°C в течение 10 сек. Отжиг – 62 °C в течение 15 сек. Основываясь на результатах проведенных экспериментов, установлено, что чувствительность праймерной системы с олигонуклеотидным зондом составляет 10² копий/мл (рис. 6).

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fам	Результат
E3	<i>Aeromonas caviae</i>	28,8	+
E4	<i>Aeromonas sobria</i>		-
E5	<i>Aeromonas hydrophila</i>		-
E6	<i>Aeromonas caviae</i> SK	27,3	+
E7	<i>Aeromonas caviae</i> 15468	24,7	+
E8	<i>Aeromonas salmonicida</i>		-
E9	К-		-

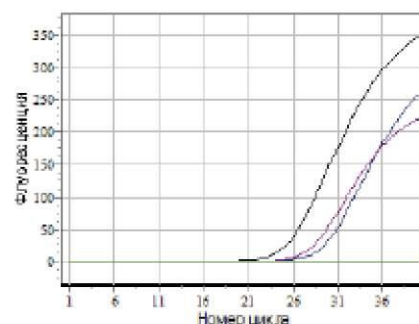
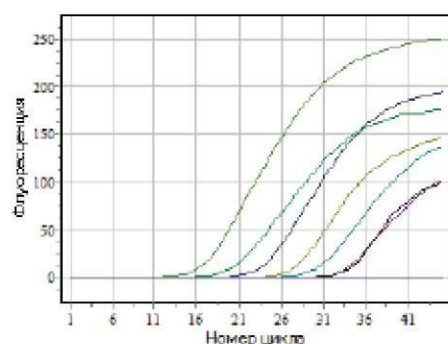


Рис. 5. Результаты определения специфичности тест-системы ПЦР-РВ для идентификации *Aeromonas caviae*



Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fам	Результат
D2	<i>A. caviae</i> -1 раз	19,8	+
D3	<i>A. caviae</i> -2 раз	23,3	+
D4	<i>A. caviae</i> -3 раз	27,3	+
D5	<i>A. caviae</i> -4 раз	29,9	+
D6	<i>A. caviae</i> -5 раз	33,1	+
D7	<i>A. caviae</i> -6 раз	33,9	+
D8	<i>A. caviae</i> -7 раз		-
D9	<i>A. caviae</i> исх	16,6	+
D10	К-		-
D11	К-		-

Рис. 6. Определение чувствительности тест-системы ПЦР-РВ для идентификации *Aeromonas caviae*

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fам	Результат
E2	1 acv	33,8	+
E3	4 acv	28,6	+
E4	8 acv	22,3	+
E5	11 acv	29,5	+
E6	12 acv	27,1	+
E7	15 acv	30,3	+
E8	17 acv	29,9	+
E9	23 acv	23,4	+
E10	24 acv	28,8	+
E11	К-		-

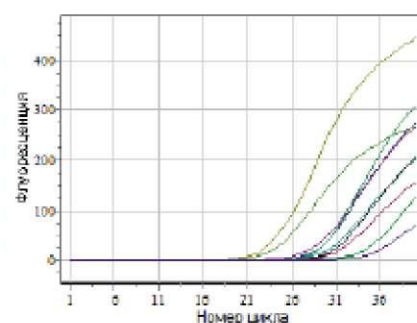


Рис. 7. Апробация тест-системы ПЦР-РВ для идентификации *Aeromonas caviae*

Для апробации разработанной тест-системы ПЦР в режиме реального времени было протестировано 9 штаммов *Aeromonas caviae*, ранее выделенных нами из объектов окружающей среды и изученных по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам.

В результате проведенного исследования установлено, что все 9 штаммов относятся к виду *Aeromonas caviae* (рис. 7).

Обсуждение

Aeromonas caviae является патогеном с высокой приспособляемостью к окружающей среде и широко распространенным в различных водных средах [19]. Он может инфицировать не только разнообразные водные организмы, но и млекопитающих, в том числе человека, нанося огромный ущерб аквакультуре и серьезную угрозу здоровью людей [20]. Однако, на сегодняшний день не разработано

эффективных мер диагностики, профилактики и борьбы с ним. Особенно это вызывает опасение в связи с проблемами безопасности общественного здравоохранения, вызванными устойчивостью к химиотерапевтическим препаратам из-за злоупотребления антибиотиками [21].

В настоящее время классические методы обнаружения и идентификации *Aeromonas caviae* включают в себя в основном выделение бактерий и биохимическую идентификацию, что отнимает много времени и может серьезно задержать получение результатов.

В этом исследовании мы разработали тест-систему на основе метода ПЦР в режиме реального времени для возможности своевременной идентификации *Aeromonas caviae*.

Разработанная система на основе праймеров и зонда позволила идентифицировать 9 образцов как

положительные без ложноположительных или ложноотрицательных результатов. Все вышеупомянутые данные свидетельствуют о том, что разработанная тест-система на основе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени может быть использована в качестве одного из этапов в схеме ускоренного выделения и идентификации бактерий вида *Aeromonas caviae* из объектов внешней среды.

Заключение

Разработана тест-система для выявления генома *Aeromonas caviae* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени из объектов внешней среды и проведена ее апробация на 9 полевых штаммах. Специфичность тест системы составила 100 %, чувствительность 10^2 копий/мл. Тест-система, встроенная в схему ускоренного выделения и идентификации *Aeromonas caviae*, позволит сократить время исследований до 50...52 часов.

Литература

1. Emergence of VIM-producing *Aeromonas caviae* in Israeli hospitals / A. Adler, M. V. Assous, S. Paikin., et al. // J. Antimicrob. Chemater. 2014. Vol. 69. P. 1211–1214. doi:10.1093/jac/dkt505.
2. First report of bla (OXA-181)-mediated carbapenem resistance in *Aeromonas caviae* in combination with pKP3-A: threat of rapid spread / S. Anandan, R. Gopi, N. K. Devanga Raghupathi, et al // J. Globe. Antimicrobial. Resist. 2017. Vol. 10. P. 310–314. doi:10.1016/j.jgar.2017.07.006.
3. Figueres M. J., Biz-Hidalgo R. Infections caused by *Aeromonas* in humans. In *Aeromonas* // Academic Press: Norfolk, UK. 2015. P. 65–108.
4. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: Evolution and diversity / X. Bellanger, S. Payot, N. Leblond-Bourget, et al. // FEMS Microbiology Reviews. 2014. Vol. 38. No. 4. P. 720–760. doi: 10.1111/1574-6976.12058.
5. BLAST: A more efficient report with improved usability / G. M. Boratin, C. Camacho, P. S. Cooper, et al. // Nucleic Acids Res. 2013. Vol. 41. P. 29–33. doi: 10.1093/nar / gkt282.
6. Botelho J., Schulenburg H. The role of integrative and conjugative elements in the evolution of antibiotic resistance // Trends Microbiol. 2021. Vol. 29. P. 8–18. doi: 10.1016/j.tim.2020.05.
7. UniProtKB/swiss-prot, manually annotated uniprot knowledge base topic: How to use the input view / E. Bute, D. Lieberherr, M. Tognolli, et al. // Methods Mol. Biol. 2016. Vol. 1374. P. 23–54. doi: 10.1007/978-1-4939-3167-5_2.
8. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for creating custom annotation pipelines and annotating genome packages / T. Brettin, J. J. Davis, T. Dees, et al. // Sci. Rep. 2015. Vol. 5. P. 8365. doi: 10.1038/srep08365.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI M100 add-on. Wayne, PA: CLSI, 2020. 90. p.
10. The hidden life of integrative and conjugative elements / F. Delawat, R. Miyazaki, N. Carraro, et al. // FEMS Microbiol. Ed. 2017. Vol. 41. P. 512–537. doi:10.1093/femsre/fux008.
11. Signature region in *Aeromonas popoffii* 16S rDNA sequences / A. Demarta, M. Tonolla, A. P. Caminada, et al. // FEMS Microbiol. Lett. 1999. Vol. 172. P. 239–246. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13474.
12. Dorthe L., Poirel L., Nordmann P. Worldwide distribution of NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria // Biomed Res. Int. 2014. P. 249856. doi: 10.1155/2014/249856
13. Ribosomal protein S10 is a common target for tigecycline sensitization / K. Beabout, T. G. Hammerstrom, A. M. Perez, et al. // Antimicrobial. Agents of Chemoter. 2015. Vol. 59. P. 5561–5566. doi: 10.1128/aac.00547-15.
14. Edgar R. K. MUSCLE: A method for multiple sequence alignment with less time and space // BMK Bioinformatics. 2004. Vol. 5. P. 113. doi: 10.1186/1471-2105-5-113.
15. An Z., Brasel A. L., Sakhar N. Acute cholangitis: causes, diagnosis and treatment // Gastroenterol. The wedge. North Am. 2021. Vol. 50. P. 403–414. doi: 10.1016/j.gtc.2021.02.005.
16. Janda, J.M. *Aeromonas* and *Plesiomonas* / In M. Sussman (ed.), *Molecular Medical Microbiology*, Academic Press, London, England, 2001. P. 1237–1270.
17. Esteve K., Gutierrez M. K., Ventosa A. *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels // J. Clin. Microbiol. 1995. Vol. 45. P. 462–466.
18. *Aeromonas popoffii* sp. November., mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs / G. Huys, P. Kempfer, M. Altwegg, et al. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. Vol. 47. P. 1165–1171.
19. Integration of the bla NDM-1 carbapenemase gene into the novel integrative and conjugative element SXT/R391 in *Proteus vulgaris* / L. H. Kong, R. Xiang, Y. L. Wang, et al // J. Antimicrob. Chemater. 2020. Vol. 75. P. 1439–1442.
20. Sequencing and comparative genomic analysis of IncHI2 plasmids pT5282-*mphA* and p112298-*catA* and IncHI5 plasmid pYNKPO01-*dfrA*. / Q. Liang, Z. Yin, Y. Zhao, et al. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2017. Vol. 49. P. 709–718. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.01.021.
21. Chromosomal integration of huge and complex bla-bearing genetic elements (NDMs) in Enterobacteriaceae. Front. / X. Luo, Z. Yin, L. Zeng, et al // Cell infection. Microbiol. 2021. Vol. 11. P. 690799. doi: 10.3389/fcimb.2021.690799.

References

1. Emergence of VIM-producing *Aeromonas caviae* in Israeli hospitals / A. Adler, M. V. Assous, S. Paikin., et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2014. Vol. 69. P. 1211–1214. doi:10.1093/jac/dkt505.
2. First report of bla (OXA-181)-mediated carbapenem resistance in *Aeromonas caviae* in combination with pKP3-A: threat of rapid spread / S. Anandan, R. Gopi, N. K. Devanga Raghupathi, et al // *J. Globe. Antimicrobial. Resist.* 2017. Vol. 10. P. 310–314. doi:10.1016/j.jgar.2017.07.006.
3. Figueres M. J., Biz-Hidalgo R. Infections caused by *Aeromonas* in humans. In *Aeromonas* // Academic Press: Norfolk, UK. 2015. P. 65–108.
4. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: Evolution and diversity / X. Bellanger, S. Payot, N. Leblond-Bourget, et al. // *FEMS Microbiology Reviews.* 2014. Vol. 38. No. 4. P. 720–760. doi: 10.1111/1574-6976.12058.
5. BLAST: A more efficient report with improved usability/ G. M. Boratin, C. Camacho, P. S. Cooper, et al. // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41. P. 29–33. doi: 10.1093/nar / gkt282.
6. Botelho J., Schulenburg H. The role of integrative and conjugative elements in the evolution of antibiotic resistance // *Trends Microbiol.* 2021. Vol. 29. P. 8–18. doi: 10.1016/j.tim.2020.05.
7. UniProtKB/swiss-prot, manually annotated uniprot knowledge base topic: How to use the input view / E. Bute, D. Lieberherr, M. Tognolli, et al. // *Methods Mol. Biol.* 2016. Vol. 1374. P. 23–54. doi: 10.1007/978-1-4939-3167-5_2.
8. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for creating custom annotation pipelines and annotating genome packages / T. Brettin, J. J. Davis, T. Dees, et al. // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. P. 8365. doi: 10.1038/srep08365.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI M100 add-on. Wayne, PA: CLSI, 2020. 90. p.
10. The hidden life of integrative and conjugative elements / F. Delawat, R. Miyazaki, N. Carraro, et al. // *FEMS Microbiol. Ed.* 2017. Vol. 41. P. 512–537. doi:10.1093/femsre/fux008.
11. Signature region in *Aeromonas popoffii* 16S rDNA sequences / A. Demarta, M. Tonolla, A. P. Caminada, et al. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1999. Vol. 172. P. 239–246. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13474.
12. Dorthe L., Poirel L., Nordmann P. Worldwide distribution of NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria // *Biomed Res. Int.* 2014. P. 249856. doi: 10.1155/2014/249856
13. Ribosomal protein S10 is a common target for tigecycline sensitization / K. Beabout, T. G. Hammerstrom, A. M. Perez, et al. // *Antimicrobial. Agents of Chemoter.* 2015. Vol. 59. P. 5561–5566. doi: 10.1128/aac.00547-15.
14. Edgar R. K. MUSCLE: A method for multiple sequence alignment with less time and space // *BMK Bioinformatics.* 2004. Vol. 5. P. 113. doi: 10.1186/1471-2105-5-113.
15. An Z., Brasel A. L., Sakhar N. Acute cholangitis: causes, diagnosis and treatment // *Gastroenterol. The wedge. North Am.* 2021. Vol. 50. P. 403–414. doi: 10.1016/j.gtc.2021.02.005.
16. Janda, J.M. *Aeromonas* and *Plesiomonas* / In M. Sussman (ed.), *Molecular Medical Microbiology*, Academic Press, London, England, 2001. P. 1237–1270.
17. Esteve K., Gutierrez M. K., Ventosa A. *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels // *J. Clin. Microbiol.* 1995. Vol. 45. P. 462–466.
18. *Aeromonas popoffii* sp. November., mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs/ G. Huys, P. Kempfer, M. Altwegg, et al. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997. Vol. 47. P. 1165–1171.
19. Integration of the bla NDM-1 carbapenemase gene into the novel integrative and conjugative element SXT/R391 in *Proteus vulgaris* / L. H. Kong, R. Xiang, Y. L. Wang, et al // *J. Antimicrob. Chemater.* 2020. Vol. 75. P. 1439–1442.
20. Sequencing and comparative genomic analysis of INCH12 plasmids pT5282-*mphA* and p112298-*catA* and INCH15 plasmid pYNKP001-*dfrA*. / Q. Liang, Z. Yin, Y. Zhao, et al. // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2017. Vol. 49. P. 709–718. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.01.021.
21. Chromosomal integration of huge and complex bla-bearing genetic elements (NDMs) in Enterobacteriaceae. *Front. / X. Luo, Z. Yin, L. Zeng, et al // Cell infection. Microbiol.* 2021. Vol. 11. P. 690799. doi: 10.3389/fcimb.2021.690799.