

doi:10.18286/1816-4501-2024-3-145-152
УДК 579.6: 619

Разработка тест-системы для индикации и идентификации бактерий вида *Aeromonas caviae* методом LAMP

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. Целью проведения исследования стала разработка быстрого и чувствительного метода обнаружения и идентификации бактерий вида *Aeromonas caviae* методом изотермической амплификации (LAMP). В качестве гена интереса был определен ген транспозон *Aeromonas caviae*, Tn903 - прерванная последовательность, частичный ген *ftsX* предполагаемого мембранного белка деления клеток. Подбор олигонуклеотидных праймеров осуществлялся при помощи программы SnapGene. Для определения оптимальной концентрации подобранных праймеров было проанализировано четыре варианта и установлено, что увеличение концентрации праймеров повышает эффективность реакции. При оценке видоспецифичности реакции использовали ДНК штаммов гетерологичных видов аэромонад. Специфичность праймерной системы в отношении бактерий вида *Aeromonas caviae* составила 100%. Для визуализации LAMP в режиме реального времени было решено использовать флуоресцентный краситель. Кривая усиления флуоресценции отслеживалась на приборе в режиме реального времени по каналу FAM. В результате проведенных исследований положительный сигнал флуоресценции наблюдался только в присутствии геномной ДНК *Aeromonas caviae*. Чувствительность праймерных систем составила 10 копий/мл. Апробация результатов разработанной тест-системы LAMP была проведена с использованием 9 штаммов *Aeromonas caviae*, выделенных нами из объектов внешней среды. Результаты этого исследования иллюстрируют потенциал изотермической амплификации (LAMP) как портативного, экономичного, чувствительного и действенного метода для быстрого обнаружения *Aeromonas caviae* в объектах внешней среды. Разработанная тест-система на основе петлевой изотермической амплификации LAMP позволяет выделить и идентифицировать бактерии вида *Aeromonas caviae* из объектов внешней среды в течение 50 часов.

Ключевые слова: *Aeromonas caviae*, аэромонад, петлевая изотермическая амплификация, праймер, бактерии, заболевания.

Для цитирования: Родионова А. В., Сульдина Е. В., Богданов И. И. Разработка тест-системы для индикации и идентификации бактерий вида *Aeromonas caviae* методом LAMP // Вестник Ульяновской государственной академии. 2024. №3(67). С. 145-152. doi:10.18286/1816-4501-2024-3-145-152

Development of the test system for indication and identification of bacteria *Aeromonas caviae* species by the LAMP method

A. V. Rodionova, E. V. Suldina, I. I. Bogdanov,

FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017 Ulyanovsk, Novy Venets Boulevard, 1

✉arina.rodionova-arina2012@yandex.ru

Abstract. The aim of the study was to develop fast and sensitive method for the detection and identification of bacteria of the species *Aeromonas caviae* by isothermal amplification (LAMP). The *Aeromonas caviae* transposon gene, Tn903 - interrupted sequence, partial *ftsX* gene of the supposed membrane protein of cell division was defined as a gene of interest. The selection of oligonucleotide primers was carried out using the SnapGene program. To determine the optimal concentration of the selected primers, four variants were analyzed and it was established that the increase in the concentration of primers increases the effectiveness of the reaction. DNA from strains of heterologous aeromonad species was used to assess the species specificity of the reaction. The specificity of the primer system for bacteria of *Aeromonas caviae* species was 100%. To visualize the LAMP in real time, it was decided to use a fluorescent dye. The fluorescence gain curve was monitored on the device in real time through the FAM channel. As a result of the conducted studies, a positive fluorescence signal was observed only in the presence of *Aeromonas caviae* genomic DNA. The

sensitivity of the primer systems was 10 copies/ml. The results of the developed LAMP test system were tested using 9 strains of *Aeromonas caviae* which we isolated from environmental objects. The results of this study demonstrate the potential of isothermal amplification (LAMP) as a portable, economical, sensitive and effective method for the rapid detection of *Aeromonas caviae* in environmental objects. The developed test system based on the loop isothermal amplification LAMP makes it possible to isolate and identify bacteria of the species *Aeromonas caviae* from environmental objects within 50 hours.

Keywords: *Aeromonas caviae*, aeromonosis, loop isothermal amplification, primer, bacteria, diseases.

For citation: Rodionova A. V., Suldina E. V., Bogdanov I. I. Development of a test system for the indication and identification of bacteria of the species *Aeromonas caviae* by the LAMP method // Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy. 2024;3(67): 145-152 doi:10.18286/1816-4501-2024-3-145-152

Введение

Род *Aeromonas* представляет собой группу бактерий с космополитическим распространением, выделяемых из широкого спектра источников, таких как пресная вода, почва, фрукты и овощи [1]. Бактерии характеризуются как факультативно-анаэробные, оксидазо- и каталазо-положительные грамотрицательные палочки и считаются условно-патогенными микроорганизмами, проявляясь как вторичная инфекция [2]. Частота встречаемости аэромоназ зависит от географического местоположения и может быть связана с недостаточной гигиеной в слабо развитых регионах [3, 4]. Было идентифицировано более 30 различных видов *Aeromonas*, которые угрожают различным экологическим нишам и здоровью человека [5, 6]. *Aeromonas caviae* патогенны для человека и ответственны за широкий спектр кишечных и внекишечных инфекций [7]. Инфекция, вызываемая *Aeromonas caviae*, характеризуется широким спектром клинических симптомов-от острой диареи до синдрома системной воспалительной реакции [8-12].

Ранее сообщалось о случае инфекции шунта *Aeromonas caviae* и менингите у новорожденной девочки [13]. Lamy et al, сообщает, что *A. caviae*, вызывающий гастроэнтерит и бактериемию во Франции, был наиболее распространенным видом *Aeromonas* [14]. Сообщается, что *A. caviae* преобладали при первичной бактериемии и инфекциях желчевыводящих путей на юге Тайваня [15]. Однако эпидемиологические характеристики, профили устойчивости к противомикробным препаратам, гены вирулентности и филогенез *A. caviae*, вызывающие внекишечные инфекции, остаются неясными.

На данный момент разработаны методы выявления некоторых видов *Aeromonas* с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени [16]. Однако, мы считаем, что для оперативного реагирования на заболевание необходимы более точные, быстрые и простые в использовании методы выявления и идентификации представителей данного рода бактерий.

Цель исследований – разработка быстрого и чувствительного метода обнаружения и идентификации бактерий вида *Aeromonas caviae* методом изотермической амплификации (LAMP).

Материалы и методы

Для валидации метода и оценки его специфичности в этом исследовании использовали ДНК 3

штаммов бактерий *Aeromonas caviae*, а также штаммы гетерологичных видов *Aeromonas salmonicida* 33658, *Aeromonas sobria* 6, *Aeromonas hydrophila* 49140, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

Апробацию результатов разработанной тест-системы LAMP проводили с использованием 9 штаммов *Aeromonas caviae*, выделенных нами из объектов внешней среды.

Для выделения ДНК использовали наборы «Лира+» 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 LAMP применяли реакционную смесь, состоящую из следующих компонентов: 1x Isothermal Amplification Buffer II, MgSO₄, dNTP, Bst 3.0 полимеразы и стандартный набор лабораторного оборудования и расходных материалов.

Результаты

Последовательности гена *Aeromonas caviae* были получены из базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI). В качестве гена интереса был определен ген транспозона *Aeromonas caviae*, Tn903 - прерванная последовательность, частичный ген *ftsX* предполагаемого мембранного белка деления клеток.

Также была проверена специфичность подобранных праймеров Ac2FIP, Ac2BIP, Ac2F1c, Ac2B1c.

Для определения оптимальной концентрации подобранных праймеров были изучены следующие варианты:

- | | |
|--|---|
| 1. BIP и FIP – по 1 мкл
каждый
F3 и B3 – по 0,2 мкл
каждый,
F1c и B1c – по 0,4 мкл
каждый | 2. BIP и FIP – по 1,6 мкл
каждый
F3 и B3 – по 0,5 мкл
каждый
F1c и B1c – по 0,6 мкл
каждый |
| 3. BIP и FIP – по 1,6 мкл
каждый
F3 и B3 – по 0,2 мкл
каждый,
F1c и B1c – по 0,4 мкл
каждый | 4. BIP и FIP – по 2 мкл
каждый
F3 и B3 – по 1 мкл
каждый
F1c и B1c – по 1 мкл
каждый |

LAMP-анализ проводили в конечном объеме 25 мкл, содержащем следующие компоненты: 1x Isothermal Amplification Buffer II 2,5 мкл, MgSO₄ – 1.5 мкл, dNTP – 3,5 мкл, Bst 3.0 полимеразы – 1 мкл, образец ДНК матрицы – 5 мкл, общий объем реакции

доводили деионизованной водой до 25 мкл. В качестве ДНК матрицы использовали штамм *Aeromonas caviae* 15468.

Реакцию проводили в течение 50 мин при температуре 55°C и максимальной 75°C на амплификаторе Bio-Rad T100 (Bio-Rad, США), а затем образцы анализировали методом электрофореза в 2,0 % агарозном геле.

Подбирая оптимальную концентрацию праймеров, нами было установлено, что увеличение концентрации праймеров влияет на эффективность реакции, поэтому в качестве оптимальной концентрации был выбран следующий вариант ВРР и FРР – по 2 мкл каждый, F3 и В3 – по 1 мкл каждый, F1с и В1с – по 1 мкл каждый. ДНК штамма *Aeromonas caviae* 15468 в данной концентрации показала лестничный рисунок при электрофорезе.



Рис.1 – Информация об участке гена транспозона *Aeromonas caviae*, Tn903 - прерванная последовательность



Рис. 2 – Подбор праймеров с помощью программы SnapGene

Концентрация № 1



Концентрация № 2 Концентрация № 3



Концентрация № 4



Рис. 3 – Результаты электрофореза продукта амплификации при подборе оптимальной концентрации праймеров

Специфичность подобранных праймеров оценивали с использованием ДНК штаммов *Aeromonas salmonicida* 33658, *Aeromonas sobria* 6, *Aeromonas hydrophila* 49140. Результаты отслеживали при

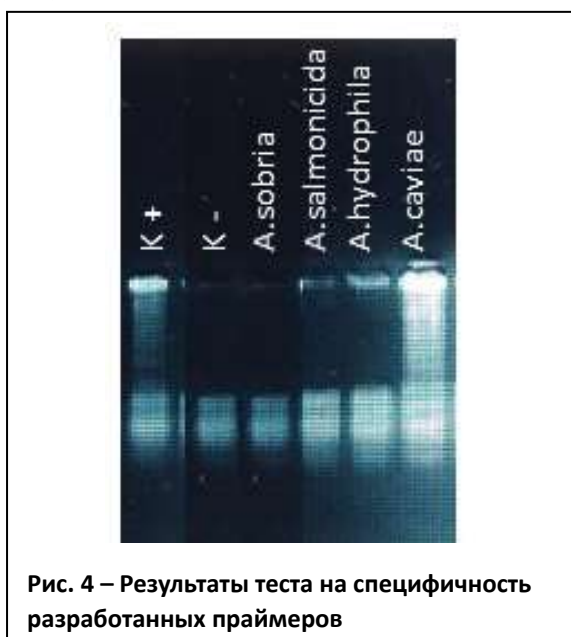


Рис. 4 – Результаты теста на специфичность разработанных праймеров

помощи электрофоретической детекции в 2% агарозном геле по образованию лестничного рисунка.

Для визуализации LAMP в режиме реального времени можно использовать флуоресцентный краситель по следующей схеме: 1x Isothermal Amplification Buffer II 2,5 мкл, MgSO₄ – 1,5 мкл, dNTP – 3,5 мкл, Bst 3.0 полимеразы – 1 мкл, образец ДНК матрицы – 5 мкл, праймеры BIP – 2 мкл, FIP – 2 мкл, праймеры F3 и B3 – по 1 мкл каждый, F1c и B1c – 1 мкл каждый, флуоресцентный краситель, в количестве 0,5 мкл на реакцию, деионизованная вода – 3 мкл.

Амплификацию проводили на приборе ДТ96 (ДНК-Технология) по следующему протоколу:

1. Отжиг 60,0 °C – 40 сек
2. Отжиг 60,0 °C – 20 сек

50 циклов

Для постановки реакции в качестве матрицы использовали ДНК 3 штаммов бактерий *Aeromonas caviae*, а также штаммы гетерологичных видов *Aeromonas salmonicida* 33658, *Aeromonas sobria* 6, *Aeromonas hydrophila* 49140. Кривую усиления флуоресценции отслеживали на приборе в режиме реального времени по каналу FAM.

Номер лунки	Идентификатор пробики	Ср. Fam	Ср. Hex	Результат
E3	<i>Aeromonas caviae</i>	27,8		+
E4	<i>Aeromonas sobria</i>			-
E5	<i>Aeromonas caviae</i> SK	44,4		+
E6	<i>Aeromonas hydrophila</i>			-
E7	<i>Aeromonas salmonicida</i>			-
E8	<i>Aeromonas caviae</i> 15468	41,9		+
E9	K-			-
E10	K+	27,9		+

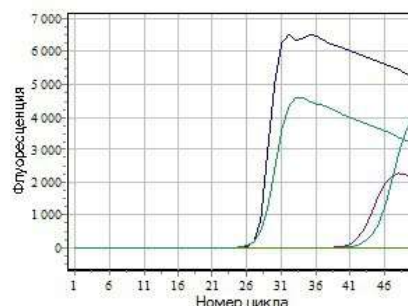


Рис. 5. Результаты применения флуоресцентного красителя для отслеживания LAMP в режиме реального времени

Результаты показали, что положительный сигнал флуоресценции наблюдался только в присутствии геномной ДНК *Aeromonas caviae* в реакционной смеси. Кроме того, геномная ДНК, выделенная из других штаммов, не показала какого-либо положительного сигнала амплификации, что указывает на высокую специфичность метода.

Для определения чувствительности праймерной системы геномную ДНК экстрагировали из суточной бульонной культуры с концентрацией клеток 1×10^8 КОЕ/мл. 1000 мкл суточной бульонной культуры *Aeromonas caviae* 15468 с начальной концентрацией $1,57 \times 10^2$ нг/мкл использовали для последовательных серийных разведений. Были

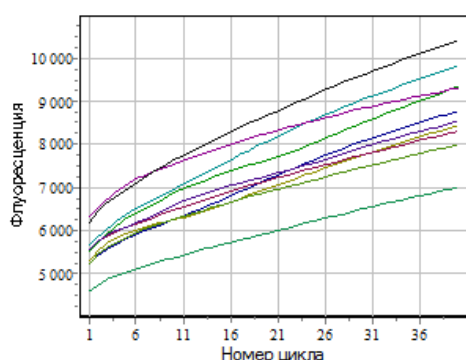


Рис. 6 – Результаты оценки чувствительности праймерной системы для *Aeromonas caviae*

произведены разведения для получения семи градиентов концентрации от 10^{-1} до 10^{-7} . По результа-



Рис. 7 – Результаты анализа продуктов амплификации LAMP методом электрофореза в агарозном геле

там эксперимента установлено, что чувствительность праймерной системы составляет 10 копий/мл.

Для проверки эффективности и апробации разработанной тест-системы LAMP использовали 9 штаммов *Aeromonas caviae*, выделенных нами из объектов внешней среды. В результате исследования установлено, что все 9 штаммов дали положительный результат и идентифицированы как *Aeromonas caviae*.

На рисунке 8 нами предложена схема выделения и идентификации бактерий *Aeromonas caviae* методом петлевой изотермической амплификации LAMP из объектов внешней среды, позволяющая сократить время исследований до 50 ч.

Обсуждение

Разработка исключительно чувствительного диагностического метода для раннего выявления заболеваний аквакультуры, в частности *Aeromonas caviae*, имеет важное значение для эффективного управления вспышками заболеваний в местах аквакультуры [17]. В этом исследовании был разработан быстрый и чувствительный диагностический анализ с использованием петлевой изотермической амплификации (LAMP) *Aeromonas caviae*.

Петлевая изотермическая амплификация (LAMP) нашла широкое применение при обнаружении патогенных бактерий. Например, разработан чувствительный и специфичный метод обнаружения *Shigella spp.* с использованием LAMP в сочетании с анализом кальцеина и нуклеиновых кислот (NADA), достигающий предела обнаружения 2×10^2 копий/мкл рекомбинантной плазмиды, содержащей целевой ген, который оказался в десять раз чувствительнее традиционных методов, основанных на ПЦР [18, 19, 20]. Аналогичным образом Чжоу С. разработал метод LAMP-HNB (краситель гидроксиафтол синий) для быстрого обнаружения *Aeromonas salmonicida*, демонстрирующий высокую специфичность, чувствительность и предел обнаружения $3,077 \times 10^{-6}$ нг/мкл без каких-либо ложноположительных или ложноотрицательных результатов [21]. Кроме того, LAMP использовался для диагностики гомозиготной геморрагической болезни жаб у гетерозиготных карасей, вызванной вирусом герпеса *Cyprinus carpio-2* (CyHV-2) [22]. Bst-полимераза, используемая при амплификации LAMP, обладает высокой устойчивостью к ингибиторам нуклеиновых кислот и может быть использована для генетического тестирования в клинических условиях [23], а также для экспресс-тестирования образцов пищевых продуктов и окружающей среды [24], даже в случаях загрязнения образцов или при недоступности образцов нуклеиновых кислот высокой чистоты.

Заключение

Полученные результаты в ходе проведенного исследования иллюстрируют потенциал LAMP как ценного инструмента для быстрого и точного обнаружения *Aeromonas caviae* из объектов внешней среды. Предложенная схема выделения и идентификации бактерий *Aeromonas caviae* методом петлевой изотермической амплификации LAMP из объектов внешней среды позволяет сократить время исследований до 50 ч.

Разработанный метод LAMP обладает специфичностью и чувствительностью. Технология изотермической амплификации не требует установки этапов термического цикла при различных температурах, таких как денатурация, отжиг и продление ПЦР-амплификации, что сокращает время реакции и более подходит для обнаружения возбудителя в местах обитания и в условиях, не связанных с лабораторией, что имеет потенциальные

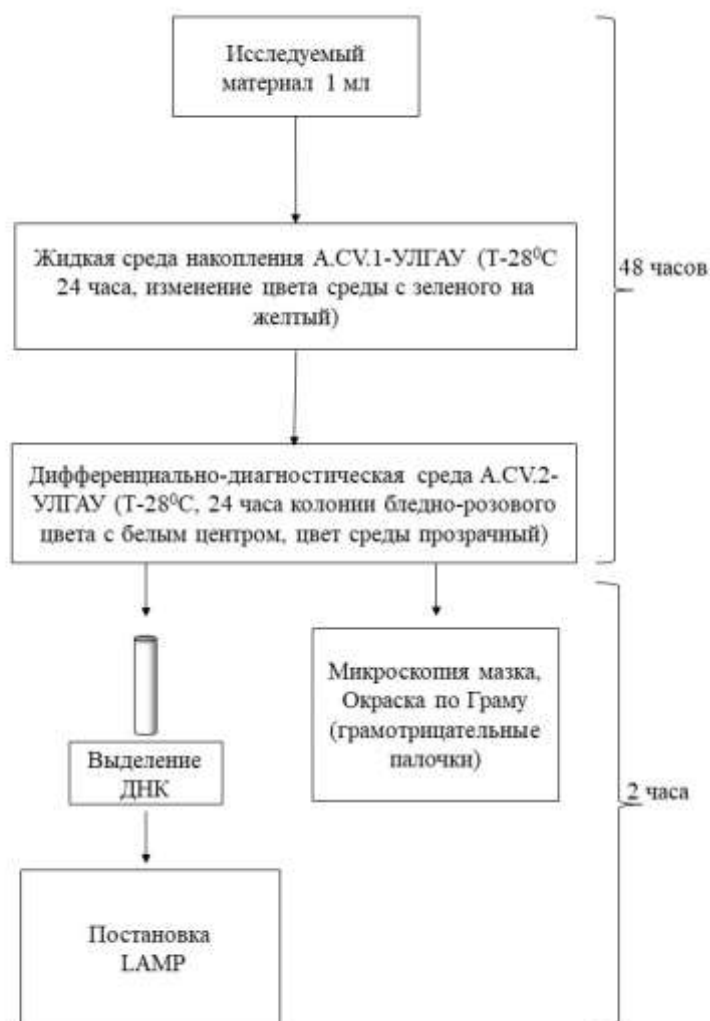


Рис. 8 – Схема выделения и идентификации бактерий *Aeromonas caviae* с помощью метода петлевой изотермической амплификации LAMP

преимущества. Его можно использовать для крупномасштабного исследования на месте и

селекционного скрининга инфекции *Aeromonas caviae* для ранней и быстрой диагностики.

Литература

1. The genus *Aeromonas*: a general approach/ R.B. Goncalves Pessoa, W.F. Oliveira, D.S.C. Marques, et al. // Microb Pathog. 2019. Vol. 130 P. 81-94. doi: 10.1016/j.micpath.2019.02.036
2. *Aeromonas*: an emerging pathogen associated with extraintestinal infection in Cuba/ L. Bravo, L. Morier, N. Castañeda, et al. // Rev Cubana Med Trop. 2003. Vol. 55(3) P.208-209. PMID: 15849928
3. *Aeromonas*-associated infections in developing countries/ K.S. Ghenghesh, S.F. Ahmed, R.A. El-Khalek, et al. // Infect Dev Ctries. 2008. Vol. 2(2) P. 81–98. doi: 10.3855/T2.2.81
4. Genetic and phenotypic determinants of resistance to antibiotics in *Aeromonas* spp., strains isolated from pediatric patients/ J.M. Bello-Lopez, C. Sanchez-Garibay, G. Ibanez-Cervantes et al. // J Infect Dev Ctries. 2020. Vol. 14(10) P. 1146-1154. doi: 10.3855/jidc.12966
5. Hoel S., Vadstein O., Jakobsen A. The significance of mesophilic *aeromonas* spp. in minimally processed ready-to-Eat seafood // Microorganisms. 2019. Vol. 91. P. 1-25. doi: 10.3390/microorganisms7030091
6. *Aeromonas caviae* septicemia in immunocompetent gastrointestinal carriers/ M. Dwivedi, A. Mishra, A. Prasad, et al. // Infect. Dis. 2008. Vol. 12, P. 547–548. doi: 10.1590/S1413-86702008000600023
7. Different clinical characteristics among *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Aeromonas caviae* monomicrobial bacteremia/ H. C. Chuang, Y. H. Ho, C. J. Lay, et al. // J. Korean Med. Sci. 2011. Vol. 26. P. 1415–1420. doi: 10.3346/jkms.2011.26.11.1415
8. Multidrug-resistant *Aeromonas hydrophila* causing fatal bilateral necrotizing fasciitis in an immunocompromised patient: a case report/ A. Ugarte-Torres, S. Perry, A. Franko, et al. // J Med Case Rep. 2018. Vol. 12(1) P. 326. doi: 10.1186/s13256-018-1854-1

9. Clebak K. T., Malone M. A. Skin infections // *Prim Care*. 2018. Vol. 45(3) P. 433-454. doi: 10.1016/j.pop.2018.05.004
10. Necrotising fasciitis in both calves caused by *Aeromonas caviae* following aesthetic liposuction/ S.Y. Park, W.K. Jeong, M.J. Kim, et al. // *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010. Vol. 63(9) P. 695. doi: 10.1016/j.bjps.2010.04.006
11. Parker J. L., Shaw J. G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease // *J Infect*. 2011. Vol. 62(2) P. 109-118. doi: 10.1016/j.jinf.2010.12.003
12. Meningitis due to carbapenemase-producing *Aeromonas hydrophila*: a case report/ C. Vanzo, S. Gareis, A. Gomila, et al. // *Arch Argent Pediatr*. 2023. Vol. 121(1) P. 202102448. doi: 10.5546/aap.2021-02448.eng
13. Clinical characteristics of seven patients with *Aeromonas* septicemia in a Japanese hospital/ Y. Morinaga, K. Yanagihara, N. Araki, et al. // *Tohoku J Exp Med*. 2011. Vol. 225(2) P. 81-84. doi: 10.1620/tjem.225.81
14. Lamy B., Kodjo A., Laurent F. Prospective nationwide study of *aeromonas* infections in France // *J. Clin. Microbiol*. 2009. Vol. 47. P. 1234–1237. doi: 10.1128/JCM.00155-09
15. Pancreaticobiliary cancers and *aeromonas* isolates carrying type secretion system genes *ascF-ascG* are associated with increased mortality: An analysis of 164 *aeromonas* infection episodes in southern Taiwan/ Y. W. Chen, S. L. Su, C. W. Li, et al. // *Front. Cell Infect. Microbiol*. 2021. Vol. 11, P. 749269. doi: 10.3389/fcimb.2021.749269
16. One Step Rapid Sensitive Method for the Diagnosis of Hemolysin Gene of *Aeromonas hydrophila* by Polymerase Chain Reaction/ S. Hota, V. Sugumar, A. Alex et al. // *Journal of Pharmacy and Bioassociated Sciences*. 2024. Vol. 16(Suppl 2). P. S1287-S1290. doi: 10.4103/jpbs.jpbs_571_23
17. Comparison of species, virulence genes and clones of *aeromonas* isolates from clinical specimens and well water in Okinawa prefecture, Japan/ K. Miyagi, N. Shimoji, S. Shimoji, et al. // *J. Appl. Microbiol*. 2021. Vol. 131. P. 1515–1530. doi: 10.1111/jam.15038
18. Identity, virulence genes, and clonal relatedness of *aeromonas* isolates from patients with diarrhea and drinking water/ M. Pablos, M. A. Remacha, J. M. Rodriguez-Calleja, et al. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2010. Vol. 29. P. 1163–1172. doi: 10.1007/s10096-010-0982-3
19. Prevalence and genetic analysis of chromosomal *mcr-3/7* in *aeromonas* from U.S. animal-derived samples/ Y. Wang, N. Hou, R. Rasooly, et al. // *Front. Microbiol*. 2021. Vol. 12. P. 667406. doi: 10.3389/fmicb.2021.667406.
20. Visual and rapid detection of *Plesiomonas shigelloides* using loop-mediated isothermal amplification method/ H. Liu, H. Yu, Z. Q. Peng, et al. // *Lett. Appl. Microbiol*. 2019. Vol. 69. P. 411–416. doi: 10.1111/lam.13225
21. Rapid visual detection of *Aeromonas salmonicida* by loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye/ Z. Zhou, Q. Huang, M. Yu, et al. // *J. Fish Dis*. 2021. Vol. 44. P. 1993–2001. doi: 10.1111/jfd.13513.
22. Identification and rapid diagnosis of the pathogen responsible for haemorrhagic disease of the gill of *Allogynogenetic crucian carp*/ M. Zhu, B. Liu, G. Cao, et al. // *J. Virol. Methods*. 2015. Vol. 219. P. 67–74. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.03.019
23. Rapid detection of a novel B1- β -lactamase gene, *blaAFM-1* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay/ Y. Qin, X. Duan, Y. Peng, et al. // *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob*. 2021. Vol. 20(1) P. 80. doi: 10.1186/s12941-021-00486-z
24. Rapid Detection of *Clostridium botulinum* in Food Using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)/ Y. Chen, H. Li, L. Yang, et al. // *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021. Vol. 18(9). P. 4401. doi: 10.3390/ijerph18094401

References

1. The genus *Aeromonas*: a general approach/ R.B. Goncalves Pessoa, W.F. Oliveira, D.S.C. Marques, et al. // *Microb Pathog*. 2019. Vol. 130 P. 81-94. doi: 10.1016/j.micpath.2019.02.036
2. *Aeromonas*: an emerging pathogen associated with extraintestinal infection in Cuba/ L. Bravo, L. Morier, N. Castañeda, et al. // *Rev Cubana Med Trop*. 2003. Vol. 55(3) P.208-209. PMID: 15849928
3. *Aeromonas*-associated infections in developing countries/ K.S. Ghenghesh, S.F. Ahmed, R.A. El-Khalek, et al. // *Infect Dev Ctries*. 2008. Vol. 2(2) P. 81–98. doi: 10.3855/T2.2.81
4. Genetic and phenotypic determinants of resistance to antibiotics in *Aeromonas* spp., strains isolated from pediatric patients/ J.M. Bello-Lopez, C. Sanchez-Garibay, G. Ibanez-Cervantes et al. // *J Infect Dev Ctries*. 2020. Vol. 14(10) P. 1146-1154. doi: 10.3855/jidc.12966
5. Hoel S., Vadstein O., Jakobsen A. The significance of mesophilic *aeromonas* spp. in minimally processed ready-to-Eat seafood // *Microorganisms*. 2019. Vol. 91. P. 1-25. doi: 10.3390/microorganisms7030091
6. *Aeromonas caviae* septicemia in immunocompetent gastrointestinal carriers/ M. Dwivedi, A. Mishra, A. Prasad, et al. // *Infect. Dis*. 2008. Vol. 12, P. 547–548. doi: 10.1590/S1413-86702008000600023
7. Different clinical characteristics among *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Aeromonas caviae* monomicrobial bacteremia/ H. C. Chuang, Y. H. Ho, C. J. Lay, et al. // *J. Korean Med. Sci*. 2011. Vol. 26. P. 1415–1420. doi: 10.3346/jkms.2011.26.11.1415

8. Multidrug-resistant *Aeromonas hydrophila* causing fatal bilateral necrotizing fasciitis in an immunocompromised patient: a case report/ A. Ugarte-Torres, S. Perry, A. Franko, et al. // J Med Case Rep. 2018. Vol. 12(1) P. 326. doi: 10.1186/s13256-018-1854-1
9. Clebak K. T., Malone M. A. Skin infections // Prim Care. 2018. Vol. 45(3) P. 433-454. doi: 10.1016/j.pop.2018.05.004
10. Necrotising fasciitis in both calves caused by *Aeromonas caviae* following aesthetic liposuction/ S.Y. Park, W.K. Jeong, M.J. Kim, et al. // J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010. Vol. 63(9) P. 695. doi: 10.1016/j.bjps.2010.04.006
11. Parker J. L., Shaw J. G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease // J Infect. 2011. Vol. 62(2) P. 109-118. doi: 10.1016/j.jinf.2010.12.003.
12. Meningitis due to carbapenemase-producing *Aeromonas hydrophila*: a case report/ C. Vanzo, S. Gareis, A. Gomila, et al. // Arch Argent Pediatr. 2023. Vol. 121(1) P. 202102448. doi: 10.5546/aap.2021-02448.eng
13. Clinical characteristics of seven patients with *Aeromonas* septicemia in a Japanese hospital/ Y. Morinaga, K. Yanagihara, N. Araki, et al. // Tohoku J Exp Med. 2011. Vol. 225(2) P. 81-84. doi: 10.1620/tjem.225.81
14. Lamy B., Kodjo A., Laurent F. Prospective nationwide study of aeromonas infections in France // J. Clin. Microbiol. 2009. Vol. 47. P. 1234–1237. doi: 10.1128/JCM.00155-09
15. Pancreaticobiliary cancers and aeromonas isolates carrying type secretion system genes ascF-ascG are associated with increased mortality: An analysis of 164 aeromonas infection episodes in southern Taiwan/ Y. W. Chen, S. L. Su, C. W. Li, et al. // Front. Cell Infect. Microbiol. 2021. Vol. 11, P. 749269. doi: 10.3389/fcimb.2021.749269
16. One Step Rapid Sensitive Method for the Diagnosis of Hemolysin Gene of *Aeromonas hydrophila* by Polymerase Chain Reaction/ S. Hota, V. Sugumar, A. Alex et al. // Journal of Pharmacy and Bioassociated Sciences. 2024. Vol. 16(Suppl 2). P. S1287-S1290. doi: 10.4103/jpbs.jpbs_571_23
17. Comparison of species, virulence genes and clones of aeromonas isolates from clinical specimens and well water in Okinawa prefecture, Japan/ K. Miyagi, N. Shimoji, S. Shimoji, et al. // J. Appl. Microbiol. 2021. Vol. 131. P. 1515–1530. doi: 10.1111/jam.15038
18. Identity, virulence genes, and clonal relatedness of aeromonas isolates from patients with diarrhea and drinking water/ M. Pablos, M. A. Remacha, J. M. Rodriguez-Calleja, et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2010. Vol. 29. P. 1163–1172. doi: 10.1007/s10096-010-0982-3
19. Prevalence and genetic analysis of chromosomal mcr-3/7 in aeromonas from U.S. animal-derived samples/ Y. Wang, N. Hou, R. Rasooly, et al. // Front. Microbiol. 2021. Vol. 12. P. 667406. doi: 10.3389/fmicb.2021.667406
20. Visual and rapid detection of *Plesiomonas shigelloides* using loop-mediated isothermal amplification method/ H. Liu, H. Yu, Z. Q. Peng, et al. // Lett. Appl. Microbiol. 2019. Vol. 69. P. 411–416. doi: 10.1111/lam.13225
21. Rapid visual detection of *Aeromonas salmonicida* by loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye/ Z. Zhou, Q. Huang, M. Yu, et al. // J. Fish Dis. 2021. Vol. 44. P. 1993–2001. doi: 10.1111/jfd.13513
22. Identification and rapid diagnosis of the pathogen responsible for haemorrhagic disease of the gill of Allogynogenetic crucian carp/ M. Zhu, B. Liu, G. Cao, et al. // J. Virol. Methods. 2015. Vol. 219. P. 67–74. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.03.019
23. Rapid detection of a novel B1- β -lactamase gene, blaAFM-1 using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay/ Y. Qin, X. Duan, Y. Peng, et al. // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 2021. Vol. 20(1) P. 80. doi: 10.1186/s12941-021-00486-z
24. Rapid Detection of *Clostridium botulinum* in Food Using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)/ Y. Chen, H. Li, L. Yang, et al. // Int. J. Environ. Res. Public Health 2021. Vol. 18(9). P. 4401. doi: 10.3390/ijerph18094401