

doi:10.18286/1816-4501-2024-4-102-108

579.62

Анализ разнообразия генотипов рода *Aeromonas*, выявленных с помощью метода ERIC -ПЦР

А. А. Ломакин, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы»

Н. А. Феоктистова ✉, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, дом 1

✉ feokna@yandex.ru

Резюме. Работа посвящена апробации метода ERIC-ПЦР для генотипирования бактерий рода *Aeromonas* – одного из основных ихтиопатогенов. В экспериментах было использовано 19 штаммов бактерий *Aeromonas spp.*, в том числе 4 референс-штамма и 15 «полевых» изолятов, которые были подвергнуты анализу методом ERIC-ПЦР, используя праймеры (ERIC 1: 5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' и ERIC 2: 5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). Анализ электрофорезограмм и создание дендрограмм проводили с использованием ПО PyElph версии 1.4. Кластеризацию изучаемых бактерий проводили на основе метода невзвешенных парных групп с анализом среднего арифметического (UPGMA) и коэффициента Дайса. На основании дендрограмм исследуемых штаммов *Aeromonas* было сформировано 6 генотипов. В кластеры «1-3» вошли представители вида *A. hydrophila*, к «4» кластеру были отнесены штаммы *Aeromonas spp.* AK, *A. caviae*, к «5» - штаммы *Aeromonas sp.* AM и *A. veronii bv.sobria* ATCC 9071. В шестой кластер вошли штаммы *Aeromonas spp.* M1, *Aeromonas spp.* 2BH, *Aeromonas bestiarum* ЧР, *A. salmonicida subsp. salmonicida* ATCC 33658.

На основании полученных данных было установлено, что штаммы бактерий *Aeromonas*, выделенные из разных источников, имели схожие профили энтеробактериальных повторяющихся межгенных консенсусных (ERIC) последовательностей. Так, коэффициент генетического разнообразия у ряда штаммов *A. hydrophila* был одинаков. При этом штаммы выделенные из одной географической зоны обладали большим генетическим разнообразием и были отнесены к разным генотипам (штаммы *Aeromonas spp.* AK и *Aeromonas spp.* AM). Апробированный метод ERIC - ПЦР позволяет оценить геноразнообразие бактериальных штаммов, циркулирующих в определенной географии, с целью расширения знаний о биологии бактерий рода *Aeromonas*.

Ключевые слова: бактерии, *Aeromonas*, генотип, межгенные консенсусные последовательности энтеробактерий, ERIC, ПЦР.

Для цитирования: Ломакин А. А., Феоктистова Н. А. Анализ разнообразия генотипов рода *aeromonas*, выявленных с помощью метода ERIC-ПЦР // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2024. №3 (67). С. 102-108. doi:10.18286/1816-4501-2024-3-102-108

Analysis of genotype diversity in the genus *aeromonas* identified using the ERIC-PCR method

Lomakin A. A., Feoktistova N. A. ✉

Ulyanovsk State Agrarian University

432017, Ulyanovsk, Novyi Venets Boulevard, 1

✉ feokna@yandex.ru

Abstract. The work is devoted to testing of the ERIC - PCR method for the genotyping of bacteria of the genus *Aeromonas* - one of the main ichthyopathogens. In the experiments, 19 strains of *Aeromonas spp.* were used, including 4 reference strains and 15 "field" isolates, which were subjected to analysis by the ERIC-PCR method, using primers (ERIC 1: 5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' and ERIC 2: 5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). Electrophoresis analysis and dendrogram creation were performed using PyElph version 1.4 software. The clustering of the studied bacteria was carried out based on the method of unweighted paired groups with arithmetic mean analysis (UPGMA) and Dice coefficient. Based on the dendrograms of the studied *Aeromonas* strains, 6 genotypes were formed. Clusters "1-3" included representatives of the species *A. hydrophila*, to cluster "4" strains of *Aeromonas spp.* AK, *A. caviae* ATCC 15468, к «5» - stains *Aeromonas spp.* AM and *A. veronii bv.sobria* ATCC 9071. In the sixth cluster, strains of *Aeromonas spp.* M1, *Aeromonas spp.* 2VN, *Aeromonas bestiarum* ChR, *A. salmonicida subsp. salmonicida*

ATCC 33658. Based on the data obtained, it was established that strains of *Aeromonas* bacteria, isolated from different sources, had similar profiles of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences. Thus, the coefficient of genetic diversity in the range of *A. hydrophila* strains was identical. At the same time, the strains isolated from the same geographical area had a large genetic diversity and were assigned to different genotypes (*Aeromonas* spp. AK and *Aeromonas* spp. AM strains). The tested ERIC - PCR method allows to estimate the diversity of bacterial strains circulating in a certain geolocation, with the aim of expanding knowledge about the biology of bacteria of the genus *Aeromonas*.

Keywords: bacteria, *Aeromonas*, genotype, intergenic consensus sequences of enterobacteria, ERIC, PCR.

For citation: Lomakin A. A., Feoktistova N. A. Analysis of genotype diversity in the genus *aeromonas* identified using the ERIC-PCR method // Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy. 2024;3(67): 102-108 doi:10.18286/1816-4501-2024-3-102-108

Введение

Бактерии рода *Aeromonas* представляют собой грамотрицательные бактерии, которые контаминируют воду, почву и пищевые продукты. Несколько видов данного рода ответственны за тяжелый геморрагический синдром у различных рыб и многочисленные заболевания у пойкилотермных животных [1].

Фенотипические методы, используемые для характеристики представителей *Aeromonas* spp. включают биотипирование, серотипирование, электрофорез эстеразы, меченные радиоактивным изотопом клеточные белки и профили белков внешней мембраны [2]. Экспериментально было установлено, что плазмидный анализ не всегда эффективен для типирования бактерии рода *Aeromonas*, так как носительство плазмид встречается у *A. hydrophila* в 20-58 % случаев [3]. Напротив, использование паттернов рестрикции генов рРНК обеспечивает более точную дифференциацию [4]. Однако, все вышеперечисленные методы дорогостоящи и трудоемки и не способны обеспечить надежные и быстрые результаты в рутинных условиях. Для бактериологических лабораторий предпочтительны простые и дешевые методы, и такие методы на основе ПЦР успешно применяются для эпизоотологического типирования различных видов бактерий. Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD) основана на амплификации случайных сегментов ДНК с помощью одного праймера с произвольной нуклеотидной последовательностью [5-6]. Альтернативный подход, основанный на семействах коротких и повторяющихся последовательностей, таких как повторяющиеся межгенные консенсусные последовательности энтеробактерий (ERIC) был использован Versalovic et al. (1991) в методе геномной дактилоскопии, называемом ERIC-PCR [7]. Последовательности ERIC представляют собой экстрагенную, высококонсервативную и рассредоточенную последовательность ДНК, которая наблюдалась у многих видов бактерий. Консенсусные праймеры, комплементарные каждому концу повторяющейся последовательности, ориентированы таким образом, что ПЦР-амплификация последовательностей ДНК происходит между соседними повторяющимися элементами ERIC [8].

Цель исследований – апробировать метод ERIC-ПЦР для генотипирования на коллекции аэромонадных изолятов бактерий.

Материалы и методы

В данной работе были использованы референс-штаммы *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071, *A. caviae* ATCC 15468, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, полученные из коллекции микроорганизмов кафедры МВЭ и ВСЭ Ульяновского ГАУ. Коллекция была дополнена «полевыми» изолятами *A. hydrophila* 11, *A. hydrophila* 12, *A. hydrophila* 13, *A. hydrophila* 14, *A. hydrophila* 15, *A. hydrophila* 16, *A. hydrophila* 17, *A. hydrophila* 18, *A. hydrophila* A1, *A. hydrophila* pA, *A. bestiarum* ЧР, *Aeromonas* spp. AK, *Aeromonas* spp. AM, *Aeromonas* psp. 2BH, *Aeromonas* spp. M1. В таблице 1 указаны источники выделения штаммов.

Коллекция бактерий *Aeromonas* хранилась при температуре -20 °C в лиофилизированном виде. Штаммы бактерий культивировали на LB-бульоне по Мюллеру в течение 24 часов при температуре 30°C.

Для выделения ДНК бактерий был использован «Набор реагентов «М-сорб-ООМ» для выделения ДНК и РНК из клинических образцов и объектов окружающей среды (на магнитных частицах)» (Синтол, РФ). Чистоту и концентрацию ДНК после выполненных выделений устанавливали при длинах волн $A_{260/280}$, которую доводили до показателя 100 мг /мл. Определение количества НК устанавливали при помощи спектрофотометра Eppendorf BioSpectrometer® kinetic (Eppendorf, Германия).

Все штаммы коллекции бактерий *Aeromonas* были подвергнуты анализу ERIC-ПЦР с целью определения их генотипов при помощи последовательностей праймеров (ERIC1: 5'- ATGTAAGCTCCTGGG-GATTCAC-3' и ERIC2: 5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), описанных Versalovic et al. [7]. ПЦР-анализы проводили в реакционной смеси общим объемом 25 мкл. На каждую реакцию праймеры добавляли объемом 2 мкл., концентрация каждого составляла 10 пмоль. Для постановки реакции использовали 2,5 x реакционную смесь (Синтол, РФ), на одну реакцию вносили 5 мкл ДНК исследуемого штамма, доведение до нужного объема осуществляли при помощи воды для молекулярной биологии (Neofroxx, Германия).

После серии экспериментов нами был выбран протокол для постановки реакции: первичная денатурация при 95°C в течение 5 минут (1 цикл), денатурация 95°C- 1 минута, отжиг при 52°C -1 минута, элонгация при 72°C - 5 минута (35 циклов), финальная элонгация в течение 10 минут при 72°C.

Для визуализации результата амплификации использовали 2% агарозный гель, который окрашивали 1% раствором бромистого этидия (AppliChem, США) в концентрации 200 мкл. на 1 литр геля. В данном эксперименте использовали источник питания PowerPac Basic (BioRad, США) и электрофорезную горизонтальную камеру Mini-Sub Cell GT (BioRad, США), сила тока при электрофорезировании составляла 100 В. Для визуализации результата электрофореза использовали геледокументирующую систему Bio-print CX4 Edge (Vilber, Франция).

Электрофорезограммы, полученные в результате ERIC-ПЦР, были проанализированы с использованием программного обеспечения PyElph версии

1.4 (доступно по адресу <https://sourceforge.net/projects/pyelph/files/releases/PyElph1.4installer.exe/download/>), дендрограммы создавали в этом же ПО. Кластеризацию изолятов проводили на основе метода невзвешенных парных групп с анализом среднего арифметического (UPGMA) и коэффициента Дайса.

Результаты

Согласно анализу фингерпринтинга ERIC-ПЦР и в зависимости от различий в количестве и размере последовательностей ERIC, обнаруженных в каждом изоляте, результаты показали, что показатель генетического расстояния между изолятами *A. hydrophila* варьировал от 2,9 до 20,7 (рис. 1).

Таблица 1. Источники выделения штаммов *Aeromonas*

№/№	Название	Место взятия пробы
1	<i>Aeromonas hydrophila</i> 11	пруд Сюткуль, Моргаушский муниципальный округ, Чувашская область, 2023 год
2	<i>Aeromonas hydrophila</i> 12	озеро Большое, Чердаклинский район, Ульяновская область, 2023 год
3	<i>Aeromonas hydrophila</i> 13	Красная река Старомайинский район, Ульяновская область, 2023 год
4	<i>Aeromonas hydrophila</i> 14	пруд, д. Малая Андреевка, Чувашская Республика, 2023 год
5	<i>Aeromonas hydrophila</i> 15	Михайловские пруды, Кинельский район, Самарская область, 2023 год
6	<i>Aeromonas hydrophila</i> 16	пруд Кортик, Цивильский муниципальный округ, п. Молодежный, Республика Чувашия, 2023 год
7	<i>Aeromonas hydrophila</i> 17	пруд, Пестравский район Самарской области, недалеко от села Тростянь, 2023 год
8	<i>Aeromonas hydrophila</i> 18	пруд, Волжский район, Самарская область, недалеко от с. Сухая Вязовка, 2023 год
9	<i>Aeromonas hydrophila</i> pA	карп, пруд, с. Новое Ахпердино Батыревский район, Республика Чувашия, 2022 год
10	<i>Aeromonas hydrophila</i> A1	карп, пруд, с. Новое Ахпердино Батыревский район, Республика Чувашия, 2022 год
11	<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	Жабры рыб <i>Labeo rohita</i> с клиническими симптомами септицемии
12	<i>A. caviae</i> ATCC 15648	Эпизоотика молодых морских свинок
13	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> ATCC 9071	Лягушка красноногая
14	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658	Лосось (<i>Salmo salar</i>)
15	<i>Aeromonas bestiarum</i> ЧР	Черное озеро, Засвияжский район, Ульяновск, Ульяновская область, 2023 год
16	<i>Aeromonas</i> sp. AK	Озеро Атца, Сенгилеевский район, Ульяновская область, 2022 год
17	<i>Aeromonas</i> sp. AM	Озеро Атца, Сенгилеевский район, Ульяновская область, 2022 год
18	<i>Aeromonas</i> sp. 2BH	карп, пруд, с. Новое Ахпердино Батыревский район, Республика Чувашия, 2022 год
19	<i>Aeromonas</i> sp. M1	Пруд д. Малая Андреевка 2 Чувашская Республика, 2022 год

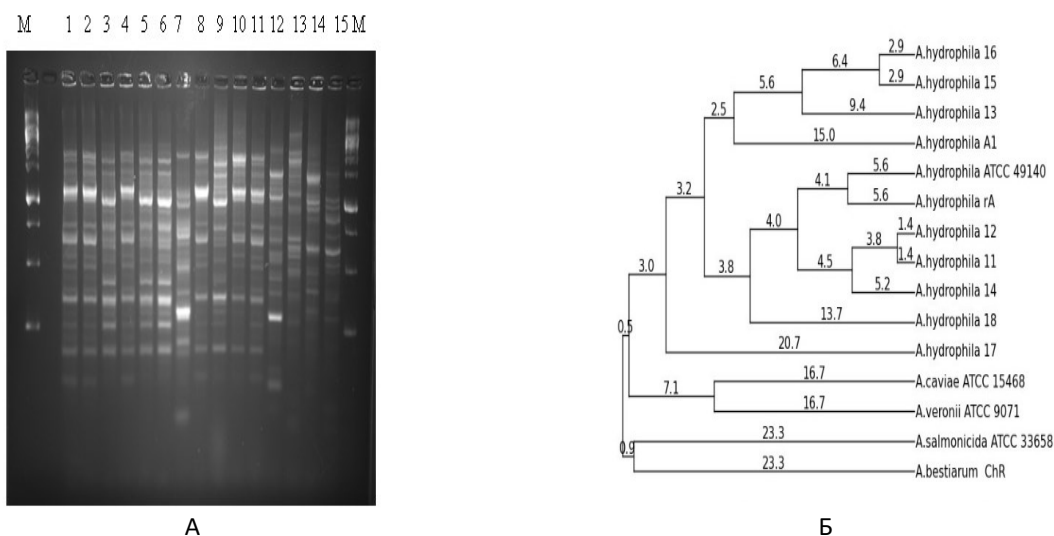


Рис. 1. А. Результаты фингерпринтинга ДНК штаммов рода *Aeromonas* методом ERIC-ПЦР: 1. *A. hydrophila* 11, 2. *A. hydrophila* 12, 3. *A. hydrophila* 13, 4. *A. hydrophila* 14, 5. *A. hydrophila* 15, 6. *A. hydrophila* 16, 7. *A. hydrophila* 17, 8. *A. hydrophila* 18, 9. *A. hydrophila* A1, 10. *A. hydrophila*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

На основании дендрограммы исследуемых штаммов *A. hydrophila* (рис. 1, Б), полученной на основе ERIC-ПЦР, были выделены три кластера (табл. 2). В первый кластер вошли штаммы *A. hydrophila* 13, *A. hydrophila* 14, *A. hydrophila* 15, *A. hydrophila* 16 и *A. hydrophila* A1. Было установлено сходство у штаммов *A. hydrophila* 15 и *A. hydrophila* 16, однако коэффициент генетической дистанции был выше у штаммов *A. hydrophila* 13 (9,4) и *A. hydrophila* A1 (15,0). Ко второму генотипу были отнесены штаммы *A. hydrophila* 11, *A. hydrophila* 12, *A. hydrophila* 14, *A. hydrophila* 18, *A. hydrophila* pA и *A. hydrophila* ATCC 49140. Наибольшую гомологию показали между собой *A. hydrophila* pA 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. В отдельный генотип вынесен изолят *A. hydrophila* 17. Стоит так же отметить, что штаммы *Aeromonas bestiarum* ЧР и *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC

33658 были выделены в отдельный генотип, показывая высокую схожесть.

Выполнен фингерпринтинг нетипированных до вида штаммов *Aeromonas* (рис. 2). Изоляты *Aeromonas* sp. AK, *Aeromonas* sp. AM и *Aeromonas* sp. 2BH, *Aeromonas* sp. M1. были отнесены к роду на основании изучения их биологических свойств и молекулярно-генетического анализа, в частности амплификации консервативных участков генов домашнего хозяйства (*zipA* и *16S rRNA*), характерными для данного рода, и детектированы участки генов, кодирующие факторы виртуальности.

Было установлено, что штаммы *Aeromonas* sp. M1 и *Aeromonas* sp. 2BH относятся к генетической группе «6» (табл.2), в которую также входят бактерии *A. bestiarum* ЧР и *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, при этом проявляя большую гомологию с последним из указанных штаммов. Штамм *Aeromonas* sp. AK, согласно анализу UPGMA, был отнесен к геногруппе «4», в которую входит штамм *A. caviae* ATCC 15468, а *Aeromonas* sp. AM вошел в состав группы «5», где располагался штамм *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071.

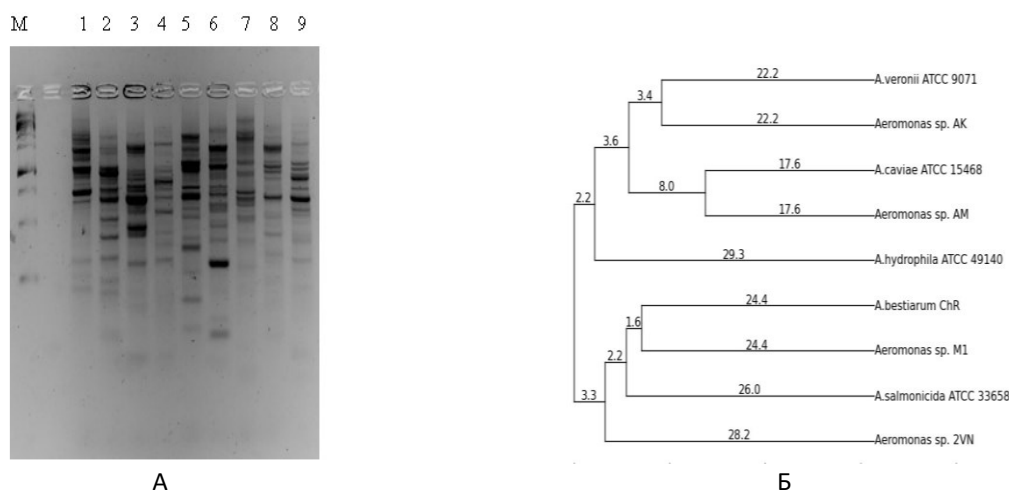


Рис. 2. А. Результаты фингерпринтинга ДНК штаммов рода *Aeromonas* методом ERIC-PCR: 1. *Aeromonas* spp. AK, 2. *Aeromonas* spp. AM, 3. *Aeromonas* spp. M1, 4. *Aeromonas* spp. 2BH, 5. *A. hydrophila* ATCC 49140, 6. *Aeromonas bestiarum* ЧР, 7. *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071, 8. *A. caviae* ATCC 15468, 9. *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, М. -маркер. Б. Кластеризация нетипированных до вида коллекционных штаммов рода *Aeromonas* методом UPGMA

В таблице 2 представлена кластеризация коллекционных изолятов бактерий рода *Aeromonas* на

основании результатов фингерпринтинга ДНК методом ERIC-PCR.

Таблица 2. Кластеризация коллекционных изолятов бактерий рода *Aeromonas* на основании результатов фингерпринтинга ДНК методом ERIC-PCR

Геногруппа	Наименование штаммов бактерий
1	<i>A. hydrophila</i> 13, <i>A. hydrophila</i> 15, <i>A. hydrophila</i> 16, <i>A. hydrophila</i> A1
2	<i>A. hydrophila</i> 11, <i>A. hydrophila</i> 12, <i>A. hydrophila</i> 14, <i>A. hydrophila</i> 18, <i>A. hydrophila</i> pA, <i>A. hydrophila</i> ATCC 49140
3	<i>A. hydrophila</i> 17
4	<i>Aeromonas</i> spp. AK, <i>A. caviae</i> ATCC 15468
5	<i>Aeromonas</i> spp. AM, <i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> ATCC 9071
6	<i>Aeromonas</i> spp. M1, <i>Aeromonas</i> spp. 2BH, <i>Aeromonas bestiarum</i> ЧР, <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658

Экспериментально было установлено, что штаммы *Aeromonas*, выделенные из разных источников, имели схожие профили энтеробактериальных повторяющихся межгенных консенсусных (ERIC) последовательностей. Так, например, у ряда изучаемых штаммов *A. hydrophila* коэффициент генетического разнообразия был одинаков. При этом штаммы бактерий, выделенные из одной географической зоны, характеризовались значительным генетическим разнообразием и были отнесены к разным генотипам (штаммы *Aeromonas* spp. AK и *Aeromonas* spp. AM).

Обсуждение

Аквакультура является одним из наиболее важных источников продовольствия, который мог бы обеспечить все население белком животного происхождения и уменьшить дефицит продовольствия из-за перенаселения. Фактически около 16% животного белка, потребляемого во всем мире, поступает из рыбы, и более миллиарда человек зависят от рыбы как от основного источника белка [9]. Бактерии рода *Aeromonas* являются одним из наиболее опасных патогенов, вызывающих большие ежегодные потери среди популяций рыб [10]. Существуют различные молекулярные методы, чтобы проследить, принадлежат ли два изолята бактерий *Aeromonas* к одному и тому же клону и, следовательно, имеют эпизоотологическое родство. К ним относятся повторяющаяся межгенная консенсусная ПЦР энтеробактерий (ERIC-PCR), случайно амплифицированная полиморфная ДНК-ПЦР (RAPD-PCR), полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP), гель-электрофорез в импульсном поле (PFGE) и типирование мультилокусных последовательностей (MLST) [11].

ERIC-ПЦР является одним из самых популярных методов генотипирования *Aeromonas*, поскольку его легко проводить, он не требует дорогостоящего оборудования и обладает высокой воспроизводимостью [12-13]. Энтеробактериальные повторяющиеся межгенные консенсусные (ERIC) последовательности представляют собой несовершенные палиндромные цепочки длиной 127 п.н., которые встречаются в множественных копиях в геномах кишечных бактерий, вибрионов и других родов бактерий [14]. Метод дает возможность установить эпизоотологические связи между изолятами и выявить те, которые патогены. Так же результаты экспериментов позволяют определить идентичность изолятов,

включенных в описание новых видов бактерий [15-16].

Soler L. et al (2003) показали, что методы: RFLP/RFLP ITS 16S-23S и REP-PCR, используя в эксперименте 26 штаммов *Aeromonas* spp., выделенных из различных геолокаций. Авторы статьи так же установили, что существует высокое генетическое разнообразие штаммов *A. hydrophila* от больного карпа, и они обнаружили три генотипические группы среди изолятов *A. hydrophila* у зараженных карпов из разных провинций Китая.

В исследовании, проведенном Figueras et al. (2006), показано, что метод ERIC-PCR дает аналогичные результаты в сравнении с данными, полученными при использовании методов AFLP и PFGE. Исследования Novákova et al. (2009) подтверждают, что метод ERIC-PCR эффективен для видовой и подвидовой идентификации [16].

Algammal et al. (2020) сообщил, что все найденные *A. hydrophila* из одного и того же географического региона не имеют генетического разнообразия, и все они имеют идентичные профили [17,18].

В свою очередь наше исследование выявило высокое генетическое разнообразие среди коллекционных штаммов *Aeromonas*. Было так же установлено, что некоторые изоляты имели высокую генетическую схожесть, но были выделены из разных природных зон. Talon D. et al. (1996) предполагали, что генетическая стабильность бактерий может быть взаимосвязана с адаптацией к условиям окружающей среды на физиологическом уровне [19]. Полученные авторами результаты согласуются с данными экспериментов Aguilera-Arreola et al. (2005), подтверждающими клональную связь штаммов *A. hydrophila*, выделенных из разных мест, имеющих 100 % идентичность [20].

Заключение

Было установлено генотипическое разнообразие бактериальных штаммов, составляющих коллекцию *Aeromonas*, выделенных из объектов водной среды и гидробионтов, методом ERIC-ПЦР. Было сформировано шесть генотипов на основе анализа фингерпринтинга изученных штаммов бактерий. Полученные данные позволяют производить видовую типизацию аэромонад. Исходя из данных Wei Ching Khor (2015), можно утверждать, что этот метод позволяет проводить как филогенетическое типирование, так и клональную дифференциацию бактериальных штаммов [21].

Литература

1. A cluster of cases of infections due to *Aeromonas hydrophila* revealed by combined RAPD and ERIC-PCR/ A. Davin-Regli, C. Bollet, E. Chamorey, V. Colonna D'Istria, A. Cremieux // Journal of medical microbiology. 1998. Vol. 47. No 6. P. 499-504. doi: 10.1099/00222615-47-6-499
2. The genus *Aeromonas*: A general approach/ R.B.G. Pessoa, W.F. de Oliveira, D.S.C. Marques, M.T. dos Santos Correia, E.V.M.M. de Carvalho, L.C.B.B. Coelho // Microbial pathogenesis. 2019. Vol. 130. P. 81-94. doi: 10.1016/j.micpath.2019.02.036
3. Janda J.M. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas* // Clinical microbiology reviews. 1991. Vol. 4. No 4. P. 397-410. doi: 10.1128/CMR.4.4.397

4. Development of a species-specific PCR-RFLP targeting *rpoD* gene fragment for discrimination of *Aeromonas* species/ S. M. Puah, W. C. Khor, B.P. Kee, J.A.M.A. Tan, S.D. Puthuchear, K.H. Chua, // Journal of medical microbiology. 2018. Vol. 67. No 9. P. 1271-1278. doi: 10.1099/jmm.0.000796
5. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers/ J. G. Williams, A. R. Kubelik, K. J. Livak, et al. // Nucleic acids research. 1990. Vol. 18. No. 22. P. 6531-6535. doi: 10.1093/nar/18.22.6531
6. Nybom H., Weising K., Rotter B. DNA fingerprinting in botany: past, present, future // Investigative genetics. 2014. Vol. 5. P. 1-35. doi: 10.1186/2041-2223-5-1
7. Versalovic J., Koeuth T., Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes // Nucleic acids research. 1991. Vol. 19. No. 24. P. 6823-6831. doi: 10.1093/nar/19.24.6823
8. Al-Fatlawy H. N. K., Aldahhan H. A., Alsaadi A. H. Phylogenetic of ERIC-DNA fingerprinting and new sequencing of *Aeromonas* species and *V. cholerae* DNA // American Journal of Applied Sciences. 2017. Vol 14. No 10. P. 955.964. doi: 10.3844/ajassp.2017.955.964
9. Effect of fish meal substitution with fermented soy pulp on growth performance, digestive enzyme, amino acid profile, and immune-related gene expression of African catfish (*Clarias gariepinus*) / Z. A. Kari, M. A. Kabir, M. A. Dawood, et al. // Aquaculture. 2022. Vol. 546. P. 737418. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737418
10. Janda J. M., Abbott S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection // Clinical microbiology reviews. 2010. Vol. 23. No 1. P. 35-73. doi: 10.1128/cmr.00039-09
11. Martínez-Murcia A. Molecular diagnostics by genetic methods / A. Martínez-Murcia, B. Lamy // *Aeromonas*; Academic Press: Norfolk, UK. 2015. P. 155-200. DOI: 10.21775/9781908230560.08
12. Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates/ L. Soler, M. J. Figueras, M. R. Chacón, et al. // Antonie van Leeuwenhoek. 2003. Vol. 83. P. 341-349.
13. Evaluation of different conditions and culture media for the recovery of *Aeromonas spp.* from water and shellfish samples / F. LatifEugenín, R. Beaz-Hidalgo, M.J. Figueras // Journal of Applied Microbiology. 2016. Vol. 121. No 3. P. 883-891. doi: 10.1111/jam.13210
14. Wilson L. A. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR / L.A. Wilson, P.M. Sharp // Molecular biology and evolution. 2006. Vol. 23. No 6. P.1156-1168. DOI: 10.1093/molbev/msj125
15. Reidentification of *Aeromonas* isolates from chironomid egg masses as the potential pathogenic bacteria *Aeromonas aquariorum*/ igueras / M.J. Figueras, R. BeazHidalgo, Y. Senderovich, S. Laviad, M. Halpern // Environmental Microbiology Reports. 2011. Vol. 3. No 2. P. 239-244. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2010.00216.x
16. Fernández Bravo A. et al. Epidemiology and pathogenic characterization of species of the genus *Aeromonas*. – 2019.
17. Molecular typing, antibiogram and PCR-RFLP based detection of *Aeromonas hydrophila* complex isolated from *Oreochromis niloticus*/ A.M. Algammal, M. F. Mohamed, B.A.Tawfik, W.N. Hozzein, W.M. El Kazzaz, M. Mabrok // Pathogens. 2020. Vol. 9. No 3. P. 238. doi: 10.3390/pathogens9030238
18. Taha Z.M. Genetic diversity and clonal relatedness of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from hemorrhagic septicemia's cases in common Carp (*Cyprinus carpio*) farms // Iraqi Journal of Veterinary Sciences. 2021. Vol. 35. No 4. P. 643-648. doi: 10.33899/ijvs.2020.127566.1511
19. Pulsedfield gel electrophoresis as an epidemiological tool for clonal identification of *Aeromonas hydrophila* / D. Talon, M.J. Dupont, J. Lesne, M. Thouverez, Y. Michel Briand // Journal of applied bacteriology. 1996. Vol. 80. No 3. P. 277-282. doi: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03220.x
20. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes / M. G. Aguilera-Areola, C. Hernández-Rodríguez, G. Zúñiga, et al. // FEMS microbiology letters. 2005. Vol. 242. No. 2. P. 231-240. doi: 10.1016/j.femsle.2004.11.011
21. Phenotypic and genetic diversity of *Aeromonas* species isolated from fresh water lakes in Malaysia / W. C. Khor, S. M. Puah, J. A. M. A. Tan, et al. // PLoS One. 2015. Vol. 10. No. 12. P. e0145933. doi: 10.1371/journal.pone.0145933

References

1. A cluster of cases of infections due to *Aeromonas hydrophila* revealed by combined RAPD and ERIC-PCR/ A. Davin-Regli, C. Bollet, E. Chamorey, V. Colonna D'Istria, A. Cremieux // Journal of medical microbiology. 1998. Vol. 47. No 6. P. 499-504. doi: 10.1099/00222615-47-6-499
2. The genus *Aeromonas*: A general approach/ R.B.G. Pessoa, W.F. de Oliveira, D.S.C. Marques, M.T. dos Santos Correia, E.V.M.M. de Carvalho, L.C.B.B. Coelho // Microbial pathogenesis. 2019. Vol. 130. P. 81-94. doi: 10.1016/j.micpath.2019.02.036
3. Janda J.M. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas* // Clinical microbiology reviews. 1991. Vol. 4. No 4. P. 397-410. doi: 10.1128/CMR.4.4.397
4. Development of a species-specific PCR-RFLP targeting *rpoD* gene fragment for discrimination of *Aeromonas* species/ S. M. Puah, W. C. Khor, B.P. Kee, J.A.M.A. Tan, S.D. Puthuchear, K.H. Chua, // Journal of medical microbiology. 2018. Vol. 67. No 9. P. 1271-1278. doi: 10.1099/jmm.0.000796

5. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers/ J. G. Williams, A. R. Kubelik, K. J. Livak, et al. // Nucleic acids research. 1990. Vol. 18. No. 22. P. 6531-6535. doi: 10.1093/nar/18.22.6531
6. Nybom H., Weising K., Rotter B. DNA fingerprinting in botany: past, present, future // Investigative genetics. 2014. Vol. 5. P. 1-35. doi: 10.1186/2041-2223-5-1
7. Versalovic J., Koeuth T., Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes // Nucleic acids research. 1991. Vol. 19. No. 24. P. 6823-6831. doi: 10.1093/nar/19.24.6823
8. Al-Fatlawy H. N. K., Aldahhan H. A., Alsaadi A. H. Phylogenetic of ERIC-DNA fingerprinting and new sequencing of *Aeromonas* species and *V. cholerae* DNA // American Journal of Applied Sciences. 2017. Vol 14. No 10. P. 955.964. doi: 10.3844/ajassp.2017.955.964
9. Effect of fish meal substitution with fermented soy pulp on growth performance, digestive enzyme, amino acid profile, and immune-related gene expression of African catfish (*Clarias gariepinus*) / Z. A. Kari, M. A. Kabir, M. A. Dawood, et al. // Aquaculture. 2022. Vol. 546. P. 737418. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737418
10. Janda J. M., Abbott S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection // Clinical microbiology reviews. 2010. Vol. 23. No 1. P. 35-73. doi: 10.1128/cmr.00039-09
11. Martínez-Murcia A. Molecular diagnostics by genetic methods / A. Martínez-Murcia, B. Lamy // *Aeromonas*; Academic Press: Norfolk, UK. 2015. P. 155-200. DOI: 10.21775/9781908230560.08
12. Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates/ L. Soler, M. J. Figueras, M. R. Chacón, et al. // Antonie van Leeuwenhoek. 2003. Vol. 83. P. 341-349.
13. Evaluation of different conditions and culture media for the recovery of *Aeromonas spp.* from water and shellfish samples / F. LatifEugenín, R. Beaz-Hidalgo, M.J. Figueras // Journal of Applied Microbiology. 2016. Vol. 121. No 3. P. 883-891. doi: 10.1111/jam.13210
14. Wilson L. A. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR / L.A. Wilson, P.M. Sharp // Molecular biology and evolution. 2006. Vol. 23. No 6. P.1156-1168. DOI: 10.1093/molbev/msj125
15. Reidentification of *Aeromonas* isolates from chironomid egg masses as the potential pathogenic bacteria *Aeromonas aquariorum*/ igueras / M.J. Figueras, R. BeazHidalgo, Y. Senderovich, S. Laviad, M. Halpern // Environmental Microbiology Reports. 2011. Vol. 3. No 2. P. 239-244. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2010.00216.x
16. Fernández Bravo A. et al. Epidemiology and pathogenic characterization of species of the genus *Aeromonas*. – 2019.
17. Molecular typing, antibiogram and PCR-RFLP based detection of *Aeromonas hydrophila* complex isolated from *Oreochromis niloticus*/ A.M. Algammal, M. F. Mohamed, B.A.Tawfiek, W.N. Hozzein, W.M. El Kazzaz, M. Mabrok // Pathogens. 2020. Vol. 9. No 3. P. 238. doi: 10.3390/pathogens9030238
18. Taha Z.M. Genetic diversity and clonal relatedness of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from hemorrhagic septicemia's cases in common Carp (*Cyprinus carpio*) farms // Iraqi Journal of Veterinary Sciences. 2021. Vol. 35. No 4. P. 643-648. doi: 10.33899/ijvs.2020.127566.1511
19. Pulsedfield gel electrophoresis as an epidemiological tool for clonal identification of *Aeromonas hydrophila* / D. Talon, M.J. Dupont, J. Lesne, M. Thouverez, Y. Michel Briand // Journal of applied bacteriology. 1996. Vol. 80. No 3. P. 277-282. doi: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03220.x
20. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes / M. G. Aguilera-Arreola, C. Hernández-Rodríguez, G. Zúñiga, et al. // FEMS microbiology letters. 2005. Vol. 242. No. 2. P. 231-240. doi: 10.1016/j.femsle.2004.11.011
21. Phenotypic and genetic diversity of *Aeromonas* species isolated from fresh water lakes in Malaysia / W. C. Khor, S. M. Puah, J. A. M. A. Tan, et al. // PLoS One. 2015. Vol. 10. No. 12. P. e0145933. doi: 10.1371/journal.pone.0145933