

УДК 616.932:579.25

Е.В. Монахова, И.В. Архангельская, С.В. Титова, Р.В. Писанов

MSHA-ПОДОБНЫЕ ПИЛИ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Цель исследования состояла в идентификации гомологов генов *msh*-кластера в геномах нетоксигенных холерных вибрионов, биоинформационном анализе их продуктов и изучении адгезивных свойств штаммов, содержащих измененные гены. **Материалы и методы.** В работе использовано 17 клинических штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 и 2 штамма O1 серогруппы, выделенные из водоемов. Гены *msh*-кластера идентифицировали в полных геномах с помощью программ BLASTN 2.2.29 и BioEdit 7.2.5; трансляцию генов, сравнительный анализ их нуклеотидных, аминокислотных последовательностей продуктов трансляции осуществляли с использованием пакета программ Vector NTI Advance 11 (Invitrogen). **Результаты и обсуждение.** В геномах 18 из 19 исследуемых штаммов идентифицированы кластеры генов, ответственных за продукцию пилей адгезии (*mshH-Q*), представленные разными аллелями, большинство из которых отличались по нуклеотидному составу от прототипных генов *msh*-кластера, однако имели такую же локализацию и порядок расположения. Лишь у одного штамма кластер был близок таковому у прототипа. Биоинформационный анализ продуктов их трансляции показал, что аминокислотная последовательность мажорной субъединицы пилей MshA лишь в небольшом N-концевом участке (1–41) гомологична таковой прототипа, тогда как остальная часть не имеет с ней ничего общего. Этот белок, сходный с описанным Н. Kuroki *et al.* (2001) VcfA и обозначенный нами как MshA-like, тем не менее сохранил потенциальный домен пилина. Аналогичная картина наблюдалась и в минорных субъединицах, обозначенных как MshC-like. Другие минорные субъединицы также сохранили характерные для них домены. Все штаммы агглютинировали эритроциты человека I группы крови и куриные эритроциты, причем у содержащих измененные гены *mshA-like* и *mshC-like* реакция не ингибировалась маннозой. Поскольку большинство изученных штаммов выделено от госпитализированных клинических больных, не исключено, что у нетоксигенных холерных вибрионов, лишенных острова патогенности VPI, MSHA-подобные пили могут служить фактором колонизации кишечника человека, в отличие от VPI-позитивных. Полученные данные создают основу для экспериментальной проверки этого предположения.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, пили MSHA, биоинформационный анализ, адгезия, гемагглютинация.

Корреспондирующий автор: Монахова Елена Владимировна, e-mail: monakhova_ev@antiplague.ru.

Для цитирования: Монахова Е.В., Архангельская И.В., Титова С.В., Писанов Р.В. [MSHA-подобные пили нетоксигенных штаммов холерных вибрионов]. Проблемы особо опасных инфекций. 2019; 3:75–80. (Англ. яз.). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-75-80

Маннозочувствительные пили (MSHA) в основном связывают с персистенцией холерных вибрионов в водоемах за счет формирования биопленок на абиотических и биотических поверхностях и противостояния поеданию водными беспозвоночными [1–3], тогда как их роль в колонизации кишечника человека считается незначительной [4–6], хотя это мнение разделяется не всеми авторами [7, 8]. Кластер *msh* включает 17 генов, организованных в два оперона: *mshHIJKLMNIJ* – кодирующий секреторные белки, и *mshBACDOPQ* – ответственный за синтез структурных компонентов (субъединиц) пилей MSHA [9].

Известно, что экспрессия пилей адгезии токсигенными штаммами зависит от места пребывания – в кишечнике возрастает продукция токсин-регулируемых пилей TCP, и подавляется синтез MSHA, а в воде наблюдается противоположный процесс [10]. Вместе с тем, отсутствие у большинства нетоксигенных штаммов TCP и Сер (пилина, кодируемого геном в составе профага CTX либо preCTX) говорит о том, что ответственность за их адгезивные свойства принимают на себя другие факторы, в том числе, возможно, и MSHA. Еще в 1990-х годах группой японских исследователей [11–13] изучены и описаны пили, продуцируемые тремя штаммами вибрионов неO1/неO139 серогрупп (НАГ-вибрионов)

и близкие, но не идентичные MSHA. Эти пили не только агглютинировали куриные, человеческие и кроличьи эритроциты, но также адгезировались к клеткам кишечника кролика. Последовательности N-концевых аминокислотных остатков (aa) в пилинах двух штаммов оказались идентичными, и одна – очень близкой таковой у MshA. Тем не менее все три белка различались между собой по молекулярным массам. Впоследствии гены двух из этих трех штаммов были секвенированы Н. Kuroki *et al.* [14] и обозначены как *vcfA* (*V. cholerae* flexible pili). Их продукты состояли из 161 и 162 aa, из которых только N-концевые aa (1–41) были гомологичны таковым MshA. Сами гены были фланкированы гомологами *mshB* и *mshC*, как в *msh*-кластере вибрионов O1/O139 серогрупп. С помощью ПЦР установлено широкое распространение *vcfA* среди НАГ-вибрионов. В дальнейшем авторы секвенировали еще несколько структурных генов, фланкирующих *vcfA* (*mshB*, *mshCDOP*) в геноме одного из этих штаммов, и установили, что они на 78–89 % гомологичны прототипам [15]. Ген *mshQ* (*vcfQ*) оказался на 651 п.н. длиннее прототипа, а его продукт, необходимый для сборки пилей, за исключением 270 N-концевых aa, был высоко гомологичен прототипному белку [16]. Однако полная последовательность *msh*-кластера не была

определена, в NCBI представлены лишь фрагменты оперона *mshBACDOPQ* (AB049152, AB050252, AB064660).

Ранее мы сообщали о выявлении *mshA*- и *mshC*-подобных генов у двух выделенных из водоемов штаммов O1 серогруппы, которые в условиях эксперимента отличались высокой скоростью формирования биопленок на абиотических поверхностях [17]. Большой интерес представляют также клинические штаммы НАГ-вибрионов, лишенные VPI, но вызывавшие заболевания людей. С помощью ПЦР у большинства из них гены *mshA* не выявлялись [18]. Осталось неизвестным, за счет каких факторов те и другие могут проявлять адгезивные свойства в разных экологических нишах.

Цель настоящего исследования состояла в идентификации гомологов генов *msh*-кластера в геномах нетоксигенных холерных вибрионов, биоинформационном анализе их продуктов и изучении адгезивных свойств штаммов, содержащих измененные гены.

Материалы и методы

Объектами исследования служили 17 клинических штаммов НАГ-вибрионов и 2 штамма O1 серогруппы, выделенные из водоемов. Их происхождение приведено на рис. 1 в разделе «Результаты и обсуждение».

Гены *msh*-кластера идентифицировали в полных геномах, секвенированных нами на платформе MiSeq (Illumina) согласно прилагаемому протоколу, с помощью программ BLASTN 2.2.29 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) и BioEdit 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit>). Трансляцию генов, сравнительный анализ их нуклеотидных последовательностей и аминокислотных последовательностей продуктов трансляции осуществляли с использованием пакета программ Vector NTI Advance 11 (Invitrogen). Прототипами служили соответствующие последовательности референс-штамма *V. cholerae* N16061 (AE004128). Для определения наличия и локализации активных доменов в белках, а также выявления их гомологов у штаммов из других регионов мира, выполняли Blastp-анализ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). В анализ были также включены продукты вышеупомянутых генов *vcfA*, найденные в NCBI [15, 16].

Постановку геммагглютинационного теста осуществляли, как описано в [11]. Клетки холерных вибрионов, осажденные центрифугированием из суточных культур, выращенных в бульоне Мартена (pH 7,2), троекратно отмывали физиологическим раствором и разводили до исходной концентрации 10^9 м.к./мл. Взвеси титровали в 96-луночном микропланшете в объеме 25 м.к. и добавляли в таком же объеме 1 % взвесь эритроцитов человека I группы крови или куриные эритроциты. Предварительно результаты учитывали после инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре, окончательный

учет проводили через 2 ч при 4 °С. Ингибирование реакции изучали, добавляя D-маннозу в конечной концентрации 1 %.

Результаты и обсуждение

Как отмечено выше, 18 из 19 отобранных для изучения штаммов в ПЦР с использованием праймеров для детекции прототипного гена мажорной субъединицы пилей *mshA* дали отрицательный результат [17, 18]. Однако в их полногеномных сиквенсах обнаружены гены, обладающие 5'-концевыми участками (1-122 п.н.) с высоким уровнем (96–100 %) гомологии прототипу, тогда как остальные последовательности не имели с ним практически ничего общего, а сами гены различались по длине (от 447 до 489 п.н.). Только у позитивного в ПЦР штамма 19093 ген *mshA* оказался на 99 % идентичен прототипу и имел такую же длину 537 п.н. Другие гены *msh*-кластера, кодирующие минорные субъединицы пилей (*mshB*, *C*, *D*, *O*, *P*) и белок, необходимый для их сборки (*mshQ*), в большинстве своем также различались по длине и нуклеотидному составу. Особенно отличались от прототипа гены *mshC*, и только у штамма 19093 ген имел нормальную длину 489 п.н., у 19261 – 498 п.н., у остальных – 513 п.н., они обозначены как *mshC-like*. Однако после транскрипции генов с помощью Vector NTI оказалось, что многие нуклеотидные замены представляют собой молчащие мутации, поэтому для дальнейшего анализа мы использовали аминокислотные последовательности их продуктов.

По данным AlignX-анализа, в который мы также включили два вышеупомянутых белка VcfA, продукты генов, обозначенных нами как *mshA-like*, длиной от 148 до 162 аа, представлены 11 вариантами, один из которых (штамм NAG-17751) близок VcfA штамма V10 (BAB58971), второй (двух штаммов O1 серогруппы) – VcfA NAGV14 [14], оба существенно отличались от всех остальных (рис. 1, а). N-концы (41 аа) были полностью гомологичны друг другу, прототипу и сходному с последним MshA штамма 19093, что совпало с данными вышеуказанных исследователей. Белки MshC-like (рис. 1, б), MshB и MshO характеризовались меньшей степенью изменчивости по сравнению с MshD, MshP и MshQ, что выражалось в меньших расстояниях между ветвями на дендрограммах. Варианты белков – продуктов разных аллелей генов оперона *mshBACDOPQ* исследуемых штаммов показаны в таблице. Даже на примере столь небольшой выборки штаммов можно проследить мозаичную структуру данного кластера. Например, у штаммов 6 и 9798 MshB идентичен белкам 16, 930, 10260, 9507, 17751, 18470, 19093, 19308, 434, а MshD и MshO – 12935; последний имеет такой же MshA, как у штаммов 16, 930 и 19260; 19093 – MshO как у 9767, 9699, 9786 и 9705. Кроме того, для некоторых из представленных в таблице вариантов (в частности, MshB, MshA-like, MshC-like) в NCBI найдены полные гомологи, принадлежащие штам-

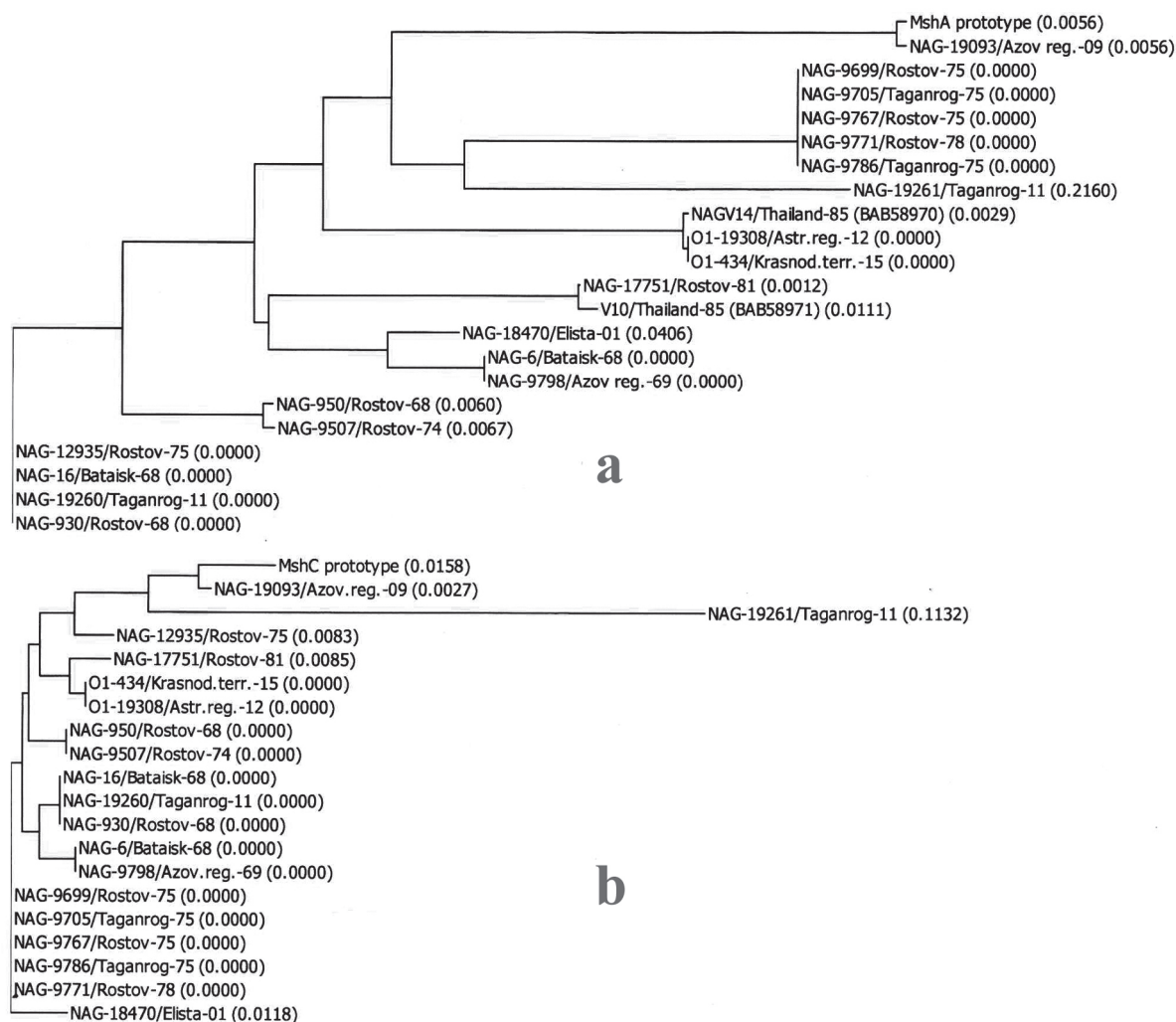


Рис. 1. Дендрограммы, построенные по результатам AlignX-анализа белков MshA-like (a) и MshC-like (b) нетоксигенных штаммов холерных вибрионов

мам из других регионов мира.

Программой Blastp во всех MshA-like идентифицирован такой же потенциальный домен пилина, как у прототипа, и в точно такой же локализации (4-45), что неудивительно, поскольку он находится в N-концевой части молекулы. Аналогичная картина наблюдалась и в белках MshC-like, часть которых содержала такой же домен PRK10574 (12-33 либо 10-44), другая часть – PRK10557 в позиции 12-97, в отличие от прототипа (6-89). В MshD и MshP также идентифицированы такие же домены, как у прототипов, а в MshB и MshO потенциальных доменов не выявлено, впрочем, как и у прототипов. В MshQ обнаружен домен lectin_VcfQ.

Ранее T. Miyazato *et al.* [16] сообщали, что у штамма NAGV14 ген *vcfQ* имеет длину 4410 п.н., будучи удлиннен с 5'-конца на 651 п.н. по сравнению с *mshQ*, причем этот фрагмент отличался пониженным содержанием GC, что могло указывать на его чужеродное происхождение. Однако в NCBI авторы депонировали неполную нуклеотидную последовательность этого гена (266-4410 п.н., AB064660), внутри которой мы обнаружили две открытые

рамки считывания (ORF) длиной 3660 и 3990 п.н. Вторая была близка по размеру *mshQ* штамма 19093 (3887 п.н.). Мы включили продукт трансляции этой ORF в AlignX-анализ, который показал 99,1 % сходства и 98,7 % идентичности данных белков. Домен lectin_VcfQ в них также присутствовал.

Наличие потенциальных доменов в структурных субъединицах, однако, еще не означает, что собранные из них пили обладают достаточными адгезивными свойствами, ранее они были подтверждены только для трех штаммов [11–14]. Поэтому мы определили способность 19 исследуемых культур вызывать агглютинацию эритроцитов человека I группы крови и куриных эритроцитов. Клетки всех штаммов вызывали агглютинацию эритроцитов обоих видов в разведениях до 1/32–1/128 ($3,12 \cdot 10^8$ – $7,8 \cdot 10^7$ м.к./мл). При этом реакция ингибировалась маннозой только у одного штамма 19093, содержащего гены *mshA* и *mshC*, близкие прототипам, тогда как у всех остальных, имеющих измененные гены *mshA-like* и *mshC-like*, ингибирование отсутствовало. Это совпадает с данными N. Nakasone *et al.* [11], показавших, что пили изученных ими штаммов

Варианты продуктов генов оперона *mshBACDOPQ* штаммов холерных вибрионов

Штаммы	Структурные единицы Msh							Усеченные гены биогенеза	Титр ГА
	B	A	C	D	O	P	Q		
O1 prototype	196	178	162	203	256	143	1252		1/32
NAG 6		148	170			141	1250	<i>mshL</i>	1/64
NAG 9798		148	170			141	1250		1/32
NAG 16		156	170	202				<i>mshF</i>	1/64
NAG 930		156	170	202					1/128
NAG 19260		156	170	202					1/128
NAG 19261		161	165			141	1245		1/32
NAG 950		157	170			141	1218	<i>mshH</i>	1/64
NAG 9507		157	170		259	nd	nd	<i>mshH</i>	1/64
NAG 12935		156	170			141	nd	<i>mshI</i>	1/32
NAG 17751		162	170			141	1240		1/32
NAG 9767		162	170			140	1332		1/128
NAG 9699		162	170			140	1332		1/128
NAG 9786		162	170			140	1332		1/128
NAG 9705		162	170			140	1332		1/128
NAG 9771		162	170			140	1328		1/32
NAG 18470		148	170	202		141		<i>mshN</i>	1.32
NAG 19093						140	1328		1/64
O1 434 (18787)		161	170	202					1/64
O 19308		161	170	202					1/64
NAGV14	nd	161	nd	202		140	1328*		nd

Примечания:

Варианты белков в каждом столбце обозначены разными цветами (идентичные – одинаковыми, неидентичные – разными). Цифрами обозначены числа aa в белках, отличающихся по длине от прототипов. В первом столбце заливкой выделены штаммы – представители разных клональных комплексов [17, 18]. ГА – гемагглютинация, nd – не определено.

*Продукт ORF, выявленной нами в неполном сиквенсе *vcfQ* (AB064660).

НАГ-вибрионов не чувствительны к маннозе. На рис. 2 показаны примеры агглютинации куриных эритроцитов несколькими штаммами.

В работах вышеупомянутых авторов [11, 14–16] охарактеризованы гены оперона *mshBACDOPQ* одного штамма НАГ-вибриона, и предложено обозначить этот локус как VCF. Нам же удалось собрать полные последовательности *msh*-кластеров большинства исследуемых штаммов, включая оперон *mshHIJKLMNIJ*, ответственный за секрецию структурных компонентов и сборку пилей. При этом установлено, что эти кластеры локализованы между такими же генами, как у прототипа (VC0397 и VC0415) и включают все входящие в их состав гены (*mshH-Q*), хотя в большинстве они существенно отличаются от типовых по длине и нуклеотидному составу. В связи с выявлением общей структуры и локализации этих кластеров мы сочли нецелесообразным использовать для них предложенное указанными авторами обозначение «VCF-локус» и во избежание путаницы при анализе сохранить за ними название «*msh*-кластер».

При анализе оперонов *mshHIJKLMNIJ* мы обратили внимание на то, что у отдельных штаммов усечен один из генов – *mshH*, *mshI*, *mshL*, *mshN* либо *mshF*, что существенно не повлияло на их способность к гемагглютинации, лишь иногда наблюдалось некоторое снижение титров (таблица). Известно, что MshN не участвует в биогенезе пилей, но в его гене находится промотор всего оперона [9, 19]. Мы дополнительно проверили промоторную область *mshI*, используя в качестве эталонного таковую референс-штамма [9]. У всех штаммов, в том числе и

у содержащих усеченный *mshH*, промотор *mshI* имел 100 % гомологии с прототипом. В опытах J.W. Marsh *et al.* [20] выключение гена *mshL* приводило к утрате гемагглютинирующей активности мутанта. Однако усеченный белок MshL штамма 6 сохранил активные домены секретина. Роль других белков в биогенезе пилей практически неизвестна. В MshF не обнаружено активных доменов, что не позволяет оценить значимость укорочения его гена у штамма 16. Усеченный MshI штамма 12935 утратил единственный домен PilN, свойственный белкам, ответственным за сборку пилей, а укороченный MshN штамма 18470, утратив прототипные домены, приобрел новые, в том числе TadD, также связанный со сборкой пилей. Тем не менее, перечисленные штаммы в той или иной степени агглютинировали эритроциты. Эти вопросы требуют дальнейших исследований, которые не проводились после 2009 г. В настоящий момент мы можем лишь высказать предположение о том, что продукты 10 генов оперона биогенеза, возможно, взаимозаменяемы, так что повреждение одного из них может компенсироваться действием других, что позволяет сохранить способность к продукции MSHA.

Известно, что во время пребывания в воде экспрессия *msh*-оперона происходит конститутивно, но при попадании в кишечник репрессируется. Ключевым фактором в этом процессе является регулятор ToxT, способный связываться с тремя промоторами в пределах локуса (*mshH*, *mshI*, *mshB*). Одновременно он активирует экспрессию генов *tcp* [19, 21]. Кроме репрессии на уровне транскрипции,

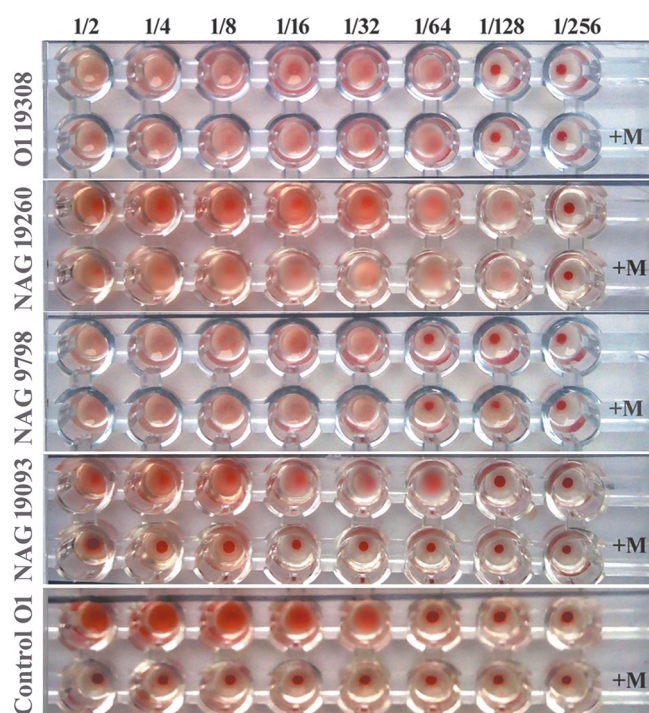


Рис. 2. Агглютинация куриных эритроцитов клетками холерных вибрионов. Начальная концентрация – 10 млрд м.к./мл, +M – реакция с добавлением маннозы

продукция MSHA подавляется на посттрансляционном уровне за счет ферментативной активности препилинпептидазы TspJ, разрушающей структурную единицу пилей [10]. Гены обоих этих белков (*toxT* и *tcpJ*) входят в состав острова VPI, и все экспериментальные данные получены авторами на штаммах, его содержащих, а делеционные мутанты созданы только по гену *tcpA* при сохранении всех остальных генов острова [4, 6]. Отсюда вытекает вполне логичное предположение, что штаммы, изначально лишенные VPI, могут конститутивно экспрессировать MSHA и *in vivo*.

С другой стороны, смысл репрессии MSHA *in vivo* состоит в том, что эти пили взаимодействуют с секреторным иммуноглобулином хозяина S-IgA, что препятствует проникновению вибрионов сквозь кишечную слизь и адгезии к эпителиоцитам [21], поэтому их обозначили как «фактор антиколонизации» [19]. S-IgA – гликопротеин, содержащий остатки маннозы, которые и связываются с MSHA, эта реакция маннозочувствительна [21]. Поэтому у VPI-штаммов, содержащих прототипный кластер *msh*, эти пили скорее всего продуцируются, но, будучи связанными с S-IgA, не могут способствовать адгезии к слизистой кишечника. Напротив, MSHA-подобные пили не чувствительны к маннозе, что позволяет полагать, что приобретение и сохранение в геноме их детерминант можно рассматривать как один из способов «обмануть» неспецифический иммунитет макроорганизма и обеспечить адгезивную активность возбудителя. Очевидно, что данная гипотеза требует экспериментальной проверки. Интересно, что один из наших штаммов, 17751, содержит профаг

preCTX и значительно измененный ген *tcpA*. В его полногеномном сиквенсе нам не удалось найти гена *toxT*, но был найден 94 % гомолог *tcpJ*. В условиях *in vitro* штамм продуцировал MSHA-подобные пили, но *in vivo* их продукция либо активность, вероятно, блокируется, и в качестве фактора адгезии служат TSP либо пилин Сер, кодируемый геном в составе preCTX. Что касается штаммов, лишенных генов *tcp* и *ser*, дальнейшие исследования покажут, могут ли их MSHA-подобные пили служить факторами колонизации кишечника человека.

Нуклеотидные последовательности *msh*-кластеров исследованных штаммов депонированы в NCBI GenBank под номерами MN172245-MN172261, MG551945, MG551946.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

- Chiavelli D.A., Marsh J.W., Taylor R.K. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(7):3220–5. DOI: 10.1128/AEM.67.7.3220-3225.2001.
- Wang J., Yan M., Gao H., Lu X., Kan B. *Vibrio cholerae* colonization of soft-shelled turtles. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83(14):e00713–17. DOI: 10.1128/AEM.00713-17.
- List C., Grutsch A., Radler C., Cakar F., Zingl F.G., Schild-Prüfert K., Schild S. Genes activated by *Vibrio cholerae* upon exposure to *Caenorhabditis elegans* reveal the mannose-sensitive hemagglutinin to be essential for colonization. *mSphere* 2018; 3(3):e00238–18. DOI: 10.1128/mSphereDirect.00238-18.
- Attridge S.R., Manning P.A., Holmgren J., Jonson G. Relative significance of mannose-sensitive hemagglutinin and toxin-coregulated pili in colonization of infant mice by *Vibrio cholerae* El Tor. *Infect. Immun.* 1996; 64(8):3369–73. PMID: 8757877. PMCID: PMC174231.
- Thelin K.H., Taylor R.K. Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and O139 strains. *Infect. Immun.* 1996; 64(7):2853–6. PMID: 8698524. PMCID: PMC174155.
- Tacket C.O., Taylor R.K., Losonsky G., Lim Y., Nataro J.P., Kaper J.B., Levine M.M. Investigation of the roles of toxin-coregulated pili and mannose-sensitive hemagglutinin pili in the pathogenesis of *Vibrio cholerae* O139 infection. *Infect. Immun.* 1998; 66(2):692–5. PMID: 9453628. PMCID: PMC107958.
- Dalsgaard A., Albert M.J., Taylor D.N., Shimada T., Meza R., Serichantalergs O., Echeverria P. Characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 serogroups obtained from an outbreak of diarrhea in Lima, Peru. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(10):2715–22. PMID: 8567912. PMCID: PMC228562.
- Ерошенко Г.А., Осин А.В., Щелканова Е.Ю., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ геномов вирулентных и авирулентных штаммов *Vibrio cholerae*. *Молекулярной генетики, микробиологии и вирусологии.* 2004; (2):11–6.
- Marsh J.W., Taylor R.K. Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus. *J. Bacteriol.* 1999; 181(4):1110–7. PMID: 9973335. PMCID: PMC93486.
- Hsiao A., Toscano K., Zhu J. Post-transcriptional cross-talk between pro- and anti-colonization pili biosynthesis systems in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2008; 67(4):849–60. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.06091.x
- Nakasone N., Iwanaga M. Pili of *Vibrio cholerae* non-O1. *Infect. Immun.* 1990; 58(6):1640–6. PMID: 1971257. PMCID: PMC258694.
- Yamashiro T., Nakasone N., Iwanaga M. Purification and characterization of pili of a *Vibrio cholerae* non-O1 strain. *Infect. Immun.* 1993; 61(12):5398–400. PMID: 7693601. PMCID: PMC281330.
- Yamashiro T., Iwanaga M. Purification and characterization of a pilus of a *Vibrio cholerae* strain: a possible colonization factor. *Infect. Immun.* 1996; 64(12):5233–8. PMID: 8945571. PMCID: PMC174513.
- Kuroki H., Toma C., Nakasone N., Yamashiro T., Iwanaga M. Gene analysis of *Vibrio cholerae* NAGV14 pilus and its distribution. *Microbiol. Immunol.* 2001; 45(6):417–24. DOI:

- 10.1111/j.1348-0421.2001.tb02640.x.
15. Toma C., Kuroki H., Nakasone N., Ehara M., Iwanaga M. Minor pilin subunits are conserved in *Vibrio cholerae* type IV pili. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2002; 33(1):35–40. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00569.x.
16. Miyazato T., Toma C., Nakasone N., Yamamoto K., Iwanaga M. Molecular analysis of VcfQ protein involved in *Vibrio cholerae* type IV pilus biogenesis. *J. Med. Microbiol.* 2003; 52(Pt 4):283–8. DOI: 10.1099/jmm.0.04967-0.
17. Титова С.В., Монахова Е.В., Алексеева Л.П., Писанов Р.В. Молекулярно-генетические основы биопленкообразования как составляющей персистенции *Vibrio cholerae* в водоемах Российской Федерации. *Экологическая генетика.* 2018; 16(4):23–32. DOI: 10.17816/ecogen16423-32.
18. Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Кругликов В.Д. Генетическая неоднородность популяции *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, выделенных в Ростовской области. *Здоровье населения и среда обитания.* 2015; 3:25–8.
19. Hsiao A., Xu X., Kan B., Kulkarni R.V., Zhu J. Direct regulation by the *Vibrio cholerae* regulator ToxT to modulate colonization and anticolonization pilus expression. *Infect. Immun.* 2009; 77(4): 1383–8. DOI: 10.1128/iai.01156-08.
20. Marsh J.W., Sun D., Taylor R.K. Physical linkage of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin secretory and structural subunit gene loci: identification of the *mshG* coding sequence. *Infect. Immun.* 1996; 64(2):460–5. PMID: 8550192. PMCID: PMC173786.
21. Hsiao A., Liu Z., Joelsson A., Zhu J. *Vibrio cholerae* virulence regulator-coordinated evasion of host immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(39):14542–7. DOI: 10.1073/pnas.0604650103.

Об авторах:

Монахова Е.В., Архангельская И.В., Титова С.В., Писанов Р.В. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaaanet.ru.

Поступила 19.07.19.

Отправлена на доработку 02.08.19.

Принята к публ. 06.08.19.