

Р.В.Писанов¹, М.И.Ежова¹, Е.В.Монахова¹, А.В.Черкасов², Я.М.Краснов², А.С.Водопьянов¹,
Т.А.Кульшань², Л.Ф.Ливанова², С.А.Портенко², А.С.Абдрашитова², В.Д.Кругликов¹, С.В.Титова¹

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ГЕНОМА ТОКСИГЕННОГО ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* EL TOR ИНАБА, ВЫДЕЛЕННОГО В 2014 г. ИЗ ОТКРЫТОГО ВОДОЕМА В РОСТОВЕ-НА-ДОНУ

¹ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация; ²ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Проведено полногеномное секвенирование ДНК штамма *Vibrio cholerae* 81 биовара Эль Тор серовара Инаба, выделенного в 2014 г. из воды реки Темерник на территории Ростова-на-Дону в июле 2014 г. Установлено присутствие в его геноме гибридного профага CTX, содержащего ген *ctxB* классического типа (аллель *ctxB1*) и гена *rstR* типа Эль Тор, гена *tcpA* с мутациями в кодирующей и промоторной областях (аллель *tcpET^{CTRS}*), а также наличие null-мутации в гене *rtxA* (аллель *rtxA4*) и протяженной делеции в пределах острова пандемичности VSP-II. Все эти особенности характерны для геновариантов холерных вибрионов, которые обладают повышенным эпидемическим потенциалом и в последние годы вытесняют типичных представителей данного биовара.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, геноварианты, профаг CTX, RTX-кластер, остров пандемичности.

R.V.Pisanov¹, M.I.Ezhova¹, E.V.Monakhova¹, A.V.Cherkasov², Ya.M.Krasnov², A.S.Vodop'yanov¹,
T.A.Kul'shan'², L.F.Livanova², S.A.Portenko², A.S.Abdrashitova², V.D.Kruglikov¹, S.V.Titova¹

Peculiarities of Genome Structure of Toxigenic *Vibrio cholerae* El Tor Inaba Strain, Isolated from a Surface Water Body in the Territory of Rostov-on-Don in 2014

¹Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation; ²Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Carried out has been whole-genome sequencing of the *Vibrio cholerae* 81 El Tor Inaba strain DNA, isolated from Temernik River waters in the territory of Rostov-on-Don in July, 2014. Identified is the presence of hybrid CTX prophage, which contains *ctxB* gene of the classical type (*ctxB1* allele), as well as *rstR* gene El Tor type, *tcpA* gene with the mutations in coding and promoter regions (*tcpET^{CTRS}* allele), the null-mutation in *rtxA* gene, and extended deletion inside the pandemic island VSP-II. All the stated above peculiarities are characteristic of cholera vibrio genovariants, which have an enhanced epidemic potential and have recently replaced the typical strains of this biovar.

Key words: *Vibrio cholerae*, genovariants, CTX prophage, RTX-cluster, pandemicity island.

Современный этап 7-й пандемии холеры характеризуется глобальным распространением генетически измененных штаммов возбудителя, обладающих не только повышенной вирулентностью, но и более эффективными механизмами персистенции в различных экологических нишах [8, 13, 17]. На фоне неблагоприятной обстановки по холере во многих странах Азии, Африки и Южной Америки в течение последнего десятилетия неоднократно регистрировались случаи завоза измененных токсигенных штаммов на территорию России, что выражалось в выделении их как от больных, так и из объектов окружающей среды. Некоторые из этих штаммов были ранее охарактеризованы по генотипическим признакам с использованием ПЦР-, VNTR-типирования и секвенирования отдельных участков генома [5, 7, 9, 10]. Внедрение в практику полногеномного секвенирования открывает перспективы более глубокого анализа штаммов, выделяемых в Российской Федерации, что позволяет выявлять их родство с возбудителями эпидемий за рубежом и оценивать степень эпидемической опасности для населения нашей страны.

Цель настоящей работы состояла в полногеном-

ном секвенировании ДНК штамма *V. cholerae* 81 и биоинформационном анализе полученных нуклеотидных последовательностей.

Материалы и методы

В работе использован штамм *V. cholerae* 81 биовара Эль Тор, выделенный в ходе мониторинговых исследований из воды р. Темерник на территории Ростова-на-Дону в июле 2014 г. Все работы, связанные с культурами *V. cholerae*, проводили в соответствии с СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

Для культивирования бактерий использовали бульон и агар Luria-Bertani (LB). Фенотипические характеристики (серологические свойства, чувствительность к холерным фагам, продукцию ацетилметилкарбинола (реакция Фогеса-Проскауэра), гемолитическую активность по Грейгу) определяли общепринятыми методами [4]. Для оценки антибиотикочувствительности холерного вибриона использовали диско-диффузионный метод [4] с использованием

микробиологического анализатора BIOMIC (Giles Scientific, США) и программного обеспечения Trinity.

Вирулентность штаммов определяли по методу N.K.Dutta, M.K.Habbu [12]. Для заражения кроликов-сосунков массой 130–160 г использовали 4-часовую агаровую культуру, выращенную при 37 °С. Животным внутрикишечно вводили взвесь вибрионов в концентрации $1 \cdot 10^7$ и $1 \cdot 10^5$ КОЕ в 0,2 мл 0,14 М NaCl, строго соблюдая условия, предъявляемые к проведению экспериментальных исследований на животных. Наблюдения за ними вели в течение 48 ч. Всех погибших через 48 ч животных вскрывали для оценки развития специфического инфекционного процесса. VNTR-анализ по пяти локусам варибельных tandemных повторов проводили по методике, описанной ранее [2, 5].

Полногеномное секвенирование выполнялось двумя независимыми группами исследователей на разных платформах: MiSeq (Illumina) и ION PGM (Life Technologies). Пробоподготовка проводилась согласно протоколам производителей. Сборку контигов осуществляли с помощью программ Velvet (входит в состав программного обеспечения MiSeq) и Newbler gsAssembler ver 2.6. и SPAdes 3.1.

Биоинформационный анализ проводили с помощью программ BLASTN 2.2.29 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), Vector NTI Suite 11 (www.informax.com), Contiguator v.2 (<http://contiguator.sourceforge.net>), а также GeneExpert и SeqAnalyzer, разработанных в Ростовском противочумном институте с использованием ресурсов геномной базы данных NCBI. Кластерный анализ и построение дендрограмм проводили по методу UPGMA с использованием авторского программного обеспечения, встроенного в геоинформационную систему «Холера. Штаммы – VNTR» [3]. В качестве референс-геномов при выравнивании контигов и сравнительном анализе использовали полногеномные последовательности штаммов N16961 (AE003852), 2010EL-1786 (CP003069.1), CIRS101 (NZ_ACVWACVW000000000.1), 301 (AJFN02000000.1) и целого ряда других штаммов, представленных в базах GenBank.

Номера доступа сиквенса ДНК штамма *V. cholerae* 81, полученных в рамках настоящего исследования, в GenBank: JPOP00000000/SAMN02911891, JRQM00000000 (полногеномные сиквенсы), KM352500 (CTX), KM401563 (CTX+RTX), KM816583 (RS1), KM660639 (VSP-II).

Результаты и обсуждение

Первый этап работы был направлен на изучение фенотипических диагностически значимых свойств штамма. При определении серогруппы и серовара путем постановки развернутой реакции агглютинации с холерными агглютинирующими сыворотками O1, Инаба, Огава, РО и постановки слайд-агглютинации с холерной сывороткой O139 серогруппы установлено, что штамм *V. cholerae* 81 относился к O1 серо-

группе, серовару Инаба. Штамм лизировался в диагностическом рабочем титре холерным фагом эльтор, но был резистентен к классическому фагу. На основании этих данных штамм отнесли к биовару Эль Тор. При определении гемолитической активности по Грейгу штамм не лизировал эритроциты барана, а также образовывал ацетилметилкарбинол из глюкозы в реакции Фогес-Проскауэра.

Определение чувствительности к антимикробным препаратам показало, что изучаемый штамм чувствителен к гентамицину, доксициклину, ампициллину, рифампицину, цефтриаксону, но устойчив к триметоприму/сульфометоксазолу, налидиксовой кислоте, ципрофлоксацину, стрептомицину и умеренно устойчив к офлоксацину и левомицетину.

Проверяемый штамм был вирулентным для экспериментальных животных, поскольку все внутрикишечно инфицированные кролики-сосунки погибли через 24–48 ч. При их вскрытии наблюдалась типичная холерогенная реакция – перерастяжение толстого кишечника прозрачной бесцветной, слегка опалесцирующей жидкостью и растяжение тонкого кишечника полупрозрачным содержимым.

Далее нами проведено VNTR-типирование по пяти локусам варибельных tandemных повторов VcA, VcB, VcC, VcD и VcG [2], результаты которого показали, что штамм 81 совпадает со штаммами *V. cholerae* El Tor 301 (Таганрог, 2011 г.) и 18895 (Москва, 2005 г.) по локусам VcB, VcC, VcD и VcG, отличаясь всего на один повтор в гиперварибельном локусе VcA. Это позволяет сделать вывод о принадлежности этих штаммов к одному клону.

Данные полногеномного секвенирования, полученные двумя группами авторов на разных платформах, полностью совпали. При их анализе с помощью авторского программного обеспечения, встроенного в геоинформационную систему «Холера. Штаммы – VNTR» [3], в геноме исследуемого штамма выявлено большое количество точковых мутаций (в 1398 генах). На основании выявленных различий была построена дендрограмма, отражающая филогенетическое родство между различными штаммами холерных вибрионов (рис. 1). Как видно из рис. 1, штамм 81 оказался наиболее близкородственным штамму *V. cholerae* 301, но существенно отличался от штаммов, вызвавших эпидемические осложнения на о. Гаити в 2010 г.

Это родство подтверждено и при сравнительном анализе с помощью авторской программы GeneExpert и разработанных нами виртуальных праймеров, позволяющих выявлять гены, отличающиеся по длине за счет «делений-вставок» (Insertion-Deletion; InDel-маркеров). У штамма 81 выявлен ряд таких генов (таблица), причем InDel-маркеры в генах VC0809 и VC2501 были для него уникальны, в то время как полиморфизмы в генах VC0534, VC0784, VC0984, VC2699, VCA0785 идентичны таковым штамма 301.

С помощью программ BLASTN 2.2.29 и Vector NTI Suite 11 (Contig Express, AlignX) нам удалось со-

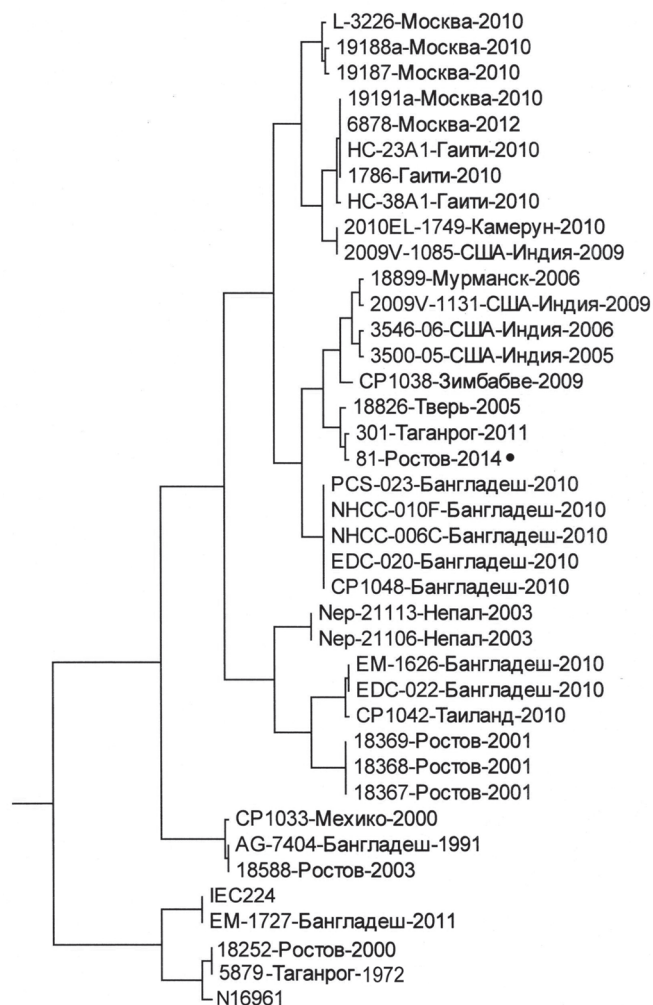


Рис. 1. Дендрограмма, построенная на основе кластерного анализа распределения точковых мутаций в 1398 генах методом UPGMA

брать и охарактеризовать несколько участков генома, наиболее значимых для определения эпидемического потенциала исследуемого штамма. В частности, определена полная последовательность фрагмента большой хромосомы, включающая одну копию профага CTX, и расположенный на 493 п.н. ниже него RTX-кластер, кодирующий синтез мультифункционального самопроцессирующегося токсина MARTX.

Профаг CTX, интегрированный в специфический сайт *attRS1*, состоял из RS2-элемента (гены *rstR*, *rstA2*, *rstB2*) и коровой области (гены *sep*, *orfU*, *ace*, *zot*, *ctxA*, *ctxB*). Ген *rstR* относился к типу Эль Тор, а ген *ctxB* — к классическому типу В1 (поскольку имел 2 нуклеотидных замены Т/С в позициях 115 и 203). Промоторная область *ctxAB*-оперона содержала 4 гептануклеотидных повтора ТТТТГАТ, что характерно для большинства штаммов биовара Эль Тор. Таким образом, CTX представлял собой «гибридный» профаг.

Кластер RTX включал все известные для него гены, из которых только *rtxA*, кодирующий собственно токсин MARTX, отличался от такового референс-штамма N16961 наличием однонуклеотидной замены (SNP) G/A в позиции 13602, то есть был представлен аллелем *rtxA4* согласно классификации, предложенной J.Dolores, K.J.F.Sachell [11]. Эта SNP привела к образованию стоп-кодона, «преждевременно» завершающего синтез MARTX, С-конец которого укорочен на 12 аминокислотных остатков. Ранее упомянутыми авторами было экспериментально доказано, что такой «укороченный» токсин утрачивает цитотоксическую и актин-связывающую активность по отношению к эукариотическим клеткам. Ими также установлено, что данная null-мутация встречается только у геновариантов холерных вибрионов Эль Тор, несущих в составе «гибридного» профага CTX аллель *ctxB* классического типа, и высказано предположение о том, что приобретенная способность к продукции холерного токсина (СТ) классического типа делает излишним энергоемкое функционирование высокомолекулярного многофункционального MARTX, поэтому новые геноварианты «специально» выводят его из строя в пользу сохранения энергии для обеспечения быстрого размножения клеток и успешной диссеминации. Косвенным подтверждением этому предположению может служить тот факт, что неспособность к продукции MARTX известна и для возбудителей шести предшествующих пандемий — классических холерных вибрионов, продуцирующих СТ классического типа, хотя они содержат не точковую мутацию, а протяженную делецию (более 7,8 т.п.н.) в области RTX-

INDEL полиморфизмы, выявленные у штамма *V. cholerae* 81 при биоинформационном анализе с помощью программы GeneExpert

Ген	Белок	Разница длины, п.н.	Последовательности праймеров 5'-3'
VC0534	RNA polymerase sigma-38 factor	5	ATCTCAGCGAAATTGGTTTTCAC ACGACGAGCATAAAGCACTTCTC
VC0784	sodium/alanine symporter	6	TATATCCGCCGTACCTTCAAAGTC CGATGCCATCAGTACAAGTTTGAG
VC0809	hypothetical protein	55	CAACGCAGAAAGTGAAGGCTCT GTGCTTGCATACGGCTTGATG
VC0984	cholera toxin transcriptional activator	5	TGTTCCGATTAGGACACAACCTCAA GGGATCAAAGGTAAATTTTCAGCA
VC2501	leucyl aminopeptidase	2	TGTTAAACACCGATGCCGAAG TTCAAAGCGTTCAACGTAAGTCAG
VC2699	anaerobic C4-dicarboxylate transporter	5	CTGTGTCTGTGTGCTGGGTGT TTCTTTGATGCCATCGACGTG
VCA0785	diguanylate cyclase	5	CCATTGTGGAAGGATAACCCAGAT ACACAAAGATCCAAAAAGCTCACC

фрагмент VSP-II V.cholerae N16961

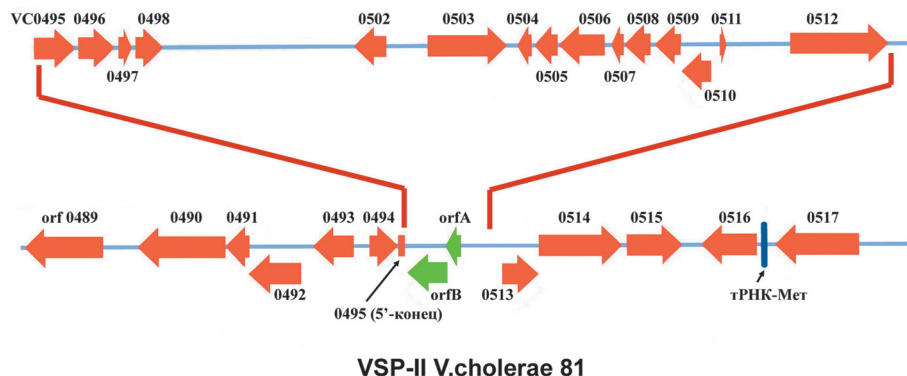


Рис. 2. Структура VSP-II *V. cholerae* 81 (вверху показаны гены референс-штамма, отсутствующие в VSP-II исследуемого штамма; все остальные полностью гомологичны)

кластера [14]. Интересно, что, если у части штаммов Эль Тор с аллелем *ctxB1* может присутствовать интактный ген *rtxA*, последний не обнаружен ни у одного из исследованных на сегодняшний день геновариантов с аллелем *ctxB7*, все они содержали *rtxA4* (то есть с null-мутацией в позиции 13602). Аллель *rtxA4* ранее выявлен у *ctxB1*⁺ штаммов, выделенных с 2002 по 2010 год в Пакистане, Индии, Бангладеш (CIRS101), Зимбабве, а также в 1991 г. в Мексике и в 2011 г. в России (штамм 301) [11].

В геноме нами был также обнаружен профаг RS1 (*rstR* типа Эль Тор, *rstA1*, *rstB1* и *rstC*), однако достоверно выявить место его интеграции на основании данных сборки не удалось. Тем не менее, нам представляется наиболее вероятным расположение профага RS1 в тандеме с RS2-элементом, между RS2 и TLC элементами (аналогичное таковому у штамма 2010EL-1786), что подтверждается данными картирования единичных прочтений, полученных при секвенировании штамма 81, на геном референсного штамма 2010EL-1786.

Ген *tcpA* относился к типу Эль Тор и по нуклеотидной последовательности промоторной и кодирующей областей оказался полностью идентичным таковому *V. cholerae* CIRS101, выделенного в 2002 г. в Бангладеш [15], то есть в промоторной области содержал две мутации: замену С/Т в позиции 128 и вставку единичного нуклеотида А в позиции 130, а в кодирующей – однонуклеотидную замену А/Г в позиции 266. Следует отметить, что такой же аллель гена *tcpA*, обозначенный как *tcpET^{CIRS}*, ранее обнаружен у вышеупомянутого штамма 301 [10] и ряда других штаммов, завезенных на территорию РФ в предшествующие годы [7].

Остров пандемичности VSP-II содержал обширную делецию генов, присутствующих в геноме референс-штамма N16961 (AE003852): VC0495 (делеция 60 % гена), VC0496-VC0512. На месте делетированной области находились гены субъединиц A и B транспозазы (рис. 2). Остальные гены данного острова полностью гомологичны VC0489-VC0494 и VC0515-VC 0517 штамма N16961 и расположены в том же порядке. Наличие протяженной делеции в

VSP-II в настоящее время принято считать показателем высокого эпидемического потенциала холерных вибрионов [16]; она характерна для большинства геновариантов, выделенных в течение последнего десятилетия, в том числе у штамма 301 (Таганрог, 2011) и ряда клинических штаммов, завезенных на территорию Российской Федерации (Башкортостан, Мурманск, Тверь, Москва) с 2004 по 2010 год. Это показано нами ранее с помощью ПЦР [1, 6], а также при секвенировании методом Сэнгера полных последовательностей VSP-II штаммов P18899 (Мурманск, 2006) и J3326 (Москва, 2010), депонированных в NCBI Genbank под номерами KJ626219.1 и KJ626223.1 соответственно.

При анализе с помощью авторской программы SeqAnalyzer в геноме штамма 81 были также выявлены гены *wbe* (определяющий принадлежность к O1 серогруппе), *ompU* и *ompW* (кодирующие белки наружной мембраны), *hlyA* (гемолизина) типа Эль Тор, *hapA* (гемагглютинин/протеазы), сериновой протеазы и протеазы PrtV, *cef* (CHO cell elongating factor), *toxR*, *toxT*, *hapR* (регуляторные), *mshA* (маннозочувствительных пилей адгезии), остров патогенности VPI-II, остров пандемичности VSP-I, кластер генов системы секреции 6 типа (T6SS) и кластер генов множественной антибиотикорезистентности: *floR* (устойчивость к хлорамфениколу), *strA* (устойчивость к аминогликозидам), *strB* (компонент устойчивости к стрептомицину), *sul2*, *dfrA1* (устойчивость к триметоприму). Данный кластер генов (интегративно-конъюгативный элемент «индийского» типа SXT-ICE-Ind) является типичным для эпидемических штаммов, выделенных в Бангладеш, Индии (1992 г.) и на Гаити (2010 г.). Кластер генов системы секреции 3-го типа (T3SS), а также гены термостабильного и шигаподобного токсинов, cholix-токсина, термостабильных гемолизинов TDH и TRH у данного штамма отсутствовали.

Таким образом, штамм 81 является геновариантом, сходным с *V. cholerae* 301 Инаба, выделенным из воды Таганрогского залива в 2011 г. [10].

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агафонов Д.А., Заднова С.П., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Конструирование ПЦР-тест-системы для дифференциации генетически измененных токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с разным эпидемиологическим потенциалом. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 2:85–8.
2. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин М.Б., Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н. Варибельные тандемные повторы, выявленные при компьютерном анализе генома *Vibrio cholerae*. *Биотехнология*. 2001; 6:85–8.
3. Водопьянов С.О., Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С. База данных «Холера. Штаммы – VNTR». Свидетельство о государственной регистрации № 2007620389.
4. Лабораторная диагностика холеры: МУК 4.2.2218-07. М.; 2007.
5. Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С., Ломов Ю.М. Мультилокусное VNTR-типирование культур холерных вибрионов, выделенных в г. Казань во время вспышки холеры летом 2001 года. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2003; 6:11–5.
6. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Заднова С.П., Черкасов А.В., Кутырев В.В. Алгоритм идентификации токсигенных генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2014; 2:36–46.
7. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Генетическая характеристика клинических штаммов *Vibrio cholerae*, завезенных на территорию Российской Федерации в современный период. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2011; 3:3–10.
8. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2010; 4:11–9.
9. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Агафонов Д.А., Шашкова А.В., Челдышова Н.Б., Черкасов А.В. Сравнительный молекулярно-генетический анализ мобильных элементов природных штаммов возбудителя холеры. *Генетика*. 2013; 49(9):1036–47.
10. Шашкова А.В., Агафонов Д.А., Черкасов А.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Фенотипический и молекулярно-генетический анализ генетически измененного токсигенного штамма *Vibrio cholerae* 301 биовара Эль Тор, изолированного в 2011 г. в России. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 4(114):61–4.
11. Dolores J., Satchell K.J.F. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique *rtxA* variants in environmental strains and an *rtxA* null-mutation in recent altered El Tor isolates. *mBio*. 2013; 4(2):e00624-12.
12. Dutta N.K., Habbu M.K. Experimental cholera in infant rabbits: a method for chemotherapeutic investigation. *Brit. J. Pharmacol.* 1955; 10(2):153–9.
13. Hasan N.A., Choi S.Y., Eppinger M., Clark P.W., Chen A., Alam M., Haley B.J., Taviani E., Hine E., Su Q., Tallon L.J., Prosper J.B., Furth K., Hoq M.M., Li H., Fraser-Liggett C.M., Cravioto A., Huq A., Ravel J., Cebula T.A., Colwell R.R. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109:E2010-17.
14. Lin W., Fullner K.J., Clayton R., Sexton J.A., Rogers M.B., Calia K.E., Calderwood S.B., Fraser C., Mekalanos J.J. Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96(2):1071–6.
15. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.-M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Faruque S.M., Faruque A.S.G., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(4):4211–3.
16. Nusrin S., Gil A.I., Bhuiyan N.A., Safa A., Asakura M., Lanata C.F., Hall E., Miranda H., Huapaya B., Vargas C.G., Luna M.A., Sack D.A., Yamasaki S., Nair G.B. Peruvian *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains possess a distinct region in the *Vibrio* seventh pandemic island-II that differentiates them from the prototype seventh pandemic El Tor strains. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(3):342–54.
17. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18:46–54.
18. potential]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 2:85–8.
19. Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Mishan'kin M.B., Suchkov I.Yu., Mishan'kin B.N. [Variable tandem repeats, identified by means of computer-based analysis of the *Vibrio cholerae* genome]. *Biotechnologia*. 2001; 6:85–8.
20. Vodop'yanov S.O., Suchkov I.Yu., Mishan'kin B.N., Vodop'yanov A.S. [Data base "Cholera. Strains – VNTR"]. Certificate of State Registration No 2007620389.
21. [Laboratory diagnostics of cholera: Methodological regulations]. MR 4.2.2218-07. M.; 2007.
22. Mishan'kin B.N., Vodop'yanov A.S., Lomov Yu.M. [Multi-locus VNTR-typing of cholera vibrios cultures, isolated in Kazan at the time of the cholera outbreak during summer, 2001]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2003; 6:11–5.
23. Sмирнова Н.И., Агафонов Д.А., Заднова С.П., Черкасов А.В., Кутырев В.В. [Algorithm for identification of toxigenic genetically altered *Vibrio cholerae* strains, biovar El Tor]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2014; 2:36–46.
24. Sмирнова Н.И., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. [Genetic characteristics of clinical *Vibrio cholerae* strains, imported onto the territory of the Russian Federation in the modern period]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2011; 3:3–10.
25. Sмирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. [Evolution of cholera agent genome in the modern period]. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 2010; 4:11–9.
26. Sмирнова Н.И., Заднова С.П., Агафонов Д.А., Шашкова А.В., Челдышова Н.Б., Черкасов А.В. [Comparative molecular-genetic analysis of mobile elements in cholera agent natural strains]. *Genetika*. 2013; 49(9):47–57.
27. Shashkova A.V., Agafonov D.A., Cherkasov A.V., Zаднова С.П., Sмирнова Н.И. [Phenotypic and molecular-genetic analysis of genetically modified toxigenic *Vibrio cholerae* El Tor strain 301, isolated in 2011 in Russia]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 4(114):61–4.
28. Dolores J., Satchell K.J.F. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique *rtxA* variants in environmental strains and an *rtxA* null-mutation in recent altered El Tor isolates. *mBio*. 2013; 4(2):e00624-12.
29. Dutta N.K., Habbu M.K. Experimental cholera in infant rabbits: a method for chemotherapeutic investigation. *Brit. J. Pharmacol.* 1955; 10(2):153–9.
30. Hasan N.A., Choi S.Y., Eppinger M., Clark P.W., Chen A., Alam M., Haley B.J., Taviani E., Hine E., Su Q., Tallon L.J., Prosper J.B., Furth K., Hoq M.M., Li H., Fraser-Liggett C.M., Cravioto A., Huq A., Ravel J., Cebula T.A., Colwell R.R. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109:E2010-17.
31. Lin W., Fullner K.J., Clayton R., Sexton J.A., Rogers M.B., Calia K.E., Calderwood S.B., Fraser C., Mekalanos J.J. Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96(2):1071–6.
32. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.-M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Faruque S.M., Faruque A.S.G., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(4):4211–3.
33. Nusrin S., Gil A.I., Bhuiyan N.A., Safa A., Asakura M., Lanata C.F., Hall E., Miranda H., Huapaya B., Vargas C.G., Luna M.A., Sack D.A., Yamasaki S., Nair G.B. Peruvian *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains possess a distinct region in the *Vibrio* seventh pandemic island-II that differentiates them from the prototype seventh pandemic El Tor strains. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(3):342–54.
34. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18:46–54.

References

1. Agafonov D.A., Zadnova S.P., Lozovsky Yu.V., Smirnova N.I. [Construction of PCR test-system for differentiation between genetically altered toxigenic *Vibrio cholerae* strains, biovar El Tor, with varied epidemic

Authors:

Pisanov R.V., Ezhova M.I., Monakhova E.V., Vodop'yanov A.S., Kruglikov V.D., Titova S.V. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru

Cherkasov A.V., Krasnov Ya.M., Kul'shan' T.A., Livanova L.F., Portenko S.A., Abdrashitova A.S. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

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

Черкасов А.В., Краснов Я.М., Кульшань Т.А., Ливанова Л.Ф., Портенко С.А., Абдрашитова А.С. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 29.10.14.