

Л.В.Миронова, Ж.Ю.Хунхеева, Е.А.Басов, А.С.Пономарева, С.К.Миткеева, С.В.Балахонov

АНАЛИЗ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОТИПА *VIBRIO CHOLERAЕ* В УСЛОВИЯХ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И ДЕФИЦИТА ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт, Иркутск, Российская Федерация

Цель работы. Экспериментальное исследование влияния низкой температуры и дефицита питательных веществ на стабильность комплекса генетических локусов *Vibrio cholerae* El Tor. **Материалы и методы.** В экспериментальных микрокосмах исследовалась стабильность комплекса генетических локусов (основные гены патогенности; участки генома, содержащие вариабельные тандемные повторы и сайты узнавания редкощепящих рестриктаз, определяющие VNTR- и PFGE-профиль изолятов соответственно; гены жизнеобеспечения холерного вибриона) четырех штаммов *Vibrio cholerae* El Tor на разных этапах инкубации. **Результаты и выводы.** Установлено, что при культивировании исследуемых штаммов в условиях дефицита питательных веществ и низкой температуры произошло формирование клонов с измененным VNTR- и PFGE-профилями, частота обнаружения которых составила $4-8 \cdot 10^{-2}$. Изменений в структуре генов «домашнего хозяйства» и утраты генов патогенности в составе мобильных генетических элементов не выявлено. Результаты исследования доказывают вероятность изменения анализируемых локусов генома *V. cholerae* в период пребывания микроорганизма в неблагоприятных условиях среды, что следует принимать во внимание при интерпретации результатов молекулярного типирования.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, стабильность генотипа, адаптация, VNTR, PFGE, гены «домашнего хозяйства», гены патогенности.

Корреспондирующий автор: Миронова Лилия Валерьевна, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

L.V.Mironova, Zh.Yu.Khunkheeva, E.A.Basov, A.S.Ponomareva, S.K.Mitkeeva, S.V.Balakhonov

Analysis of *Vibrio cholerae* Genotype Stability at Low Temperature and Nutrients Deficiency

Irkutsk Research Anti-Plague Institute of the Rospotrebnadzor, Irkutsk, Russian Federation

Objective is an experimental study of the low temperature and nutrient deficiency effects on the stability of *Vibrio cholerae* El Tor genetic loci complex. **Materials and methods.** The stability of the genetic loci (i.e. the basic pathogenicity genes; genome fragments containing variable tandem repeats and sites of rare cutting restrictionase recognition defining VNTR- and PFGE-profiles of the isolates, accordingly; *V. cholerae* «housekeeping» genes) of the four *Vibrio cholerae* El Tor strains was investigated on the experimental microcosm at different stages of incubation. **Results and conclusions.** The study demonstrated that clones with altered VNTR- and PFGE-profiles (the detection frequency was $4-8 \cdot 10^{-2}$) were being formed when strains were cultivated under nutrient deficiency and low temperature conditions. Neither changes in the structure of «housekeeping» genes nor loss of pathogenicity genes of the mobile genetic elements were revealed. The findings affirm the probability of analyzed *V. cholerae* loci alteration occurrence under unfavorable environment conditions. Obtained results should be taken into consideration for interpretation of molecular typing data.

Key words: *Vibrio cholerae*, genotype stability, adaptation, VNTR, PFGE, «housekeeping» genes, pathogenicity genes.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Liliya V. Mironova, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Citation: Mironova L.V., Khunkheeva Zh.Yu., Basov E.A., Ponomareva A.S., Mitkeeva S.K., Balakhonov S.V. Analysis of *Vibrio cholerae* Genotype Stability at Low Temperature and Nutrients Deficiency. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 3:52–56. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-52-56

Изменчивость микроорганизмов рассматривается как лежащее в основе их эволюции свойство приобретать или утрачивать исходные признаки в определенных условиях существования [1, 3]. Известно, что фенотипические модификации свойств бактерий нестабильны, тогда как генетическая изменчивость, обусловленная мутационными процессами в геноме или различного рода рекомбинациями генетического материала [3, 8], характеризуется относительной стабильностью и при условии закрепления изменений в популяции является основой диверсифицирующего отбора.

Для генотипирования микроорганизмов, изучения генетического разнообразия микробных популя-

ций используется анализ структуры определенных локусов и, соответственно, вопрос сохранения стабильности исходного генотипа в различных условиях существования микроорганизмов оказывается важным при проведении эпидемиологических исследований, а также в эволюционном анализе. Поскольку известно, что для холерного вибриона характерна высокая пластичность генома, изучение вопросов стабильности применяемых для генотипирования локусов данного патогена приобретает особую актуальность. Ранее, при макрорестрикционном анализе хромосомной ДНК, нами выявлена вариабельность пульс-электротипов изолированных при эпидемических осложнениях штаммов *Vibrio chole-*

rae Eltor [7]. Кроме того, в эксперименте показана возможность реорганизации генома токсигенного холерного вибриона посредством утраты генов СТХ профага в условиях недостатка питательных веществ [4], обнаружена способность *V. cholerae* к спонтанной элиминации детерминант патогенности в составе мобильных генетических элементов при пассаже на питательных средах [6], а также утрате генов вирулентности генетически измененными вариантами вибриона элтор [5]. Вместе с тем отсутствуют данные об экспериментальном влиянии стрессовых факторов окружающей среды на стабильность таких используемых для генотипирования холерного вибриона локусов как вариабельные tandemные повторы, участки генома, содержащие сайты узнавания редкощеплящих рестриктаз и определяющие профиль рестрикции ДНК изолятов при PFGE-типировании, гены жизнеобеспечения холерного вибриона и др.

С учетом изложенного цель работы – экспериментальное исследование влияния низкой температуры и дефицита питательных веществ на стабильность комплекса генетических локусов *Vibrio cholerae* Eltor.

Материалы и методы

В эксперимент включено четыре штамма *V. cholerae* Eltor, выделенные на территории Сибири и Дальнего Востока при разных эпидемиологических ситуациях из клинического материала (*V. cholerae* Eltor O1 № И-441 (генотип *ctxAB*⁺(*ctxB3*)*tcpA*⁺*toxR*⁺) и № И-1300 (генотип *ctxAB*⁺(*ctxB1*)*tcpA*⁺*toxR*⁺)) и из объектов окружающей среды (*V. cholerae* Eltor O1 № И-1310 (генотип *ctxAB*⁺(*ctxB1*)*tcpA*⁺*toxR*⁺) и № И-1462 (генотип *ctxAB*⁻ *tcpA*⁻ *toxR*⁺)).

Экспериментальные микрокосмы формировали во флаконах с забуференным физиологическим раствором, в которые вносили микробную взвесь исследуемых штаммов в конечной концентрации 10⁷ м.к./мл. Инкубацию проводили при температуре 6 °С с контрольными посевами (на 12, 26, 54 и 82-е сутки) на плотные питательные среды до прекращения высеваемости. Также исследованию подвергали последние обнаруживаемые на питательных средах вегетативные клетки штаммов.

На каждом этапе контрольных исследований оценивали морфологию колоний, отбирали по три колонии каждого штамма (субкультуры) для анализа комплекса молекулярно-генетических свойств (наличие основных генов вирулентности – *ctxAB*, *tcpA* и регуляторного гена *toxR*; определение пульс-электротипа, VNTR-профиля и сиквенса-типа). Кроме того, проводили MALDI-ToF масс-спектрометрическую оценку видовой принадлежности субкультур. После прекращения роста штаммов в посевах из микрокосмов осуществляли центрифугирование их содержимого при 6 тыс. об/мин, 30 мин, осадок подвергался комплексному молекулярно-генетическому исследованию и иммуно-флуоресцентному анализу.

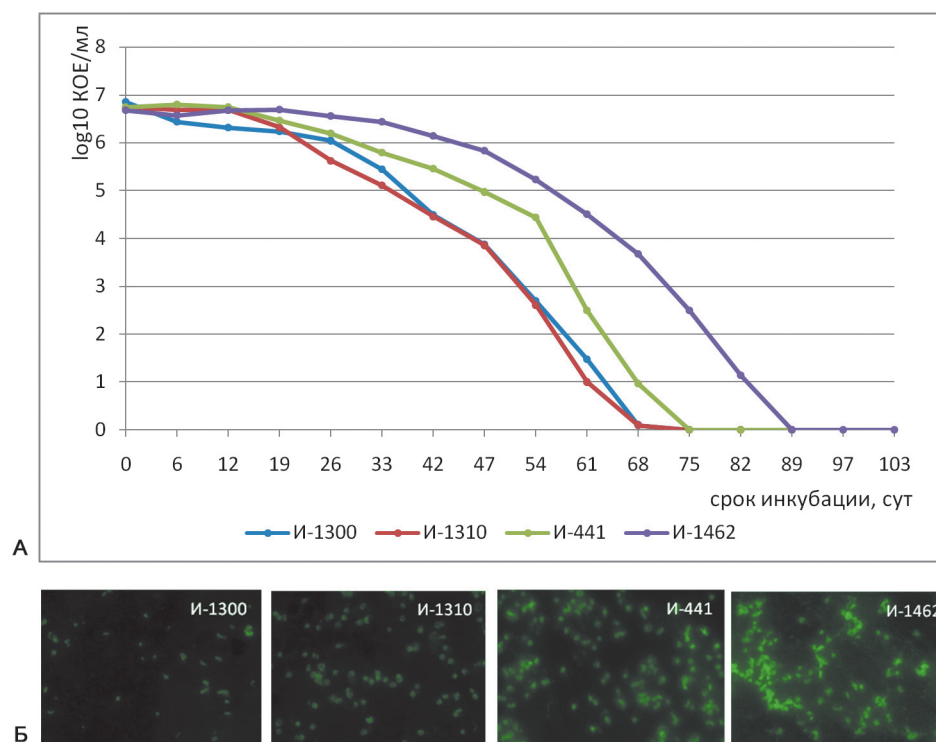
Экстракция белков для масс-спектрометрического анализа проводили посредством обработки микробной взвеси этиловым спиртом и 70 % муравьиной кислотой с последующим добавлением ацетонитрила. Выделение ДНК осуществляли с использованием стандартного набора для экстракции нуклеиновых кислот.

Фрагменты генов *ctxAB*, *tcpA* и *toxR* детектировали в мультиплексной ПЦР. Анализ структуры вариабельных tandemных повторов *V. cholerae* проводили по пяти локусам – VcA, VcB, VcC, VcD, VcG [2] с определением размера ампликонов капиллярным электрофорезом. Для уточнения структуры локусов с измененным размером ампликона проводили их секвенирование. Макрорестрикционный анализ хромосомной ДНК выполняли с использованием эндонуклеаз *NotI* и *SfiI* в соответствии с предложенным PulseNet протоколом. Стабильность структуры генов жизнеобеспечения изучали на основании секвенирования пяти локусов – *dnaE*, *lap*, *recA*, *pgm*, *cat*.

Результаты и обсуждение

Пребывание исследуемых культур *V. cholerae* в микрокосмах в условиях низкой температуры и дефицита питательных веществ привело к постепенному снижению концентрации микробных клеток: вегетативные клетки в посевах токсигенных штаммов обнаруживались до 68 сут эксперимента, нетоксигенного – до 82 сут (рис. 1, А). Полученный после прекращения высеваемости осадок содержимого микрокосмов не содержал вегетативных клеток, что подтверждено отсутствием роста при посеве его на жидкие и плотные питательные среды. Люминесцентная микроскопия полученных из осадка препаратов обнаружила присутствие в них полиморфных клеток с преобладанием округлых форм с интенсивной флуоресценцией оболочек при окрашивании специфическими холерными иммуноглобулинами. Подобные изменения морфологии клеток являются одним из свидетельств перехода микроорганизма в некультивируемое состояние (рис. 1, Б).

В ходе эксперимента существенных изменений морфологии колоний *V. cholerae* в контрольных посевах не выявлено. Однако при анализе последних посевов из микрокосмов в популяции штамма *V. cholerae* Eltor И-1300 обнаружены единичные мелкие сухие морщинистые непрозрачные желтоватые колонии. Микроскопически колонии неоднородной структуры с валиком по периферии и вдавленным центром, с признаками диссоциации и формированием дочерних, типичных для холерного вибриона, колоний (рис. 2, А). Последующие пересевы привели к постепенному увеличению в популяции доли морфологически типичных форм. Наряду с изменением морфологии колоний, произошло существенное снижение агглютинанельности холерными сыворотками О- и Огава, утрата способности ферментировать сахарозу (рис. 2, А), замедление ферментации глюкозы,



снижение подвижности микробных клеток. Масс-спектрометрически субкультура идентифицирована как *V. cholerae* (score value 2,48–2,62). Установленные изменения биологических свойств штамма могут рассматриваться как формирование «персистирующего» фенотипа («persister») – одного из вариантов адаптивной изменчивости холерного вибриона [12]. Исследование фенотипических свойств субкультуры последнего высева *V. cholerae* Eltor И-1310 выявило отсутствие у нее продукции декарбоксилазы орнитина и незначительную гемолитическую активность. У остальных штаммов изменений фенотипа в экспериментальных микрокосмах не выявлено.

MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ субкультур на контрольных этапах эксперимента показал сохранение исходного профиля референсных белков холерного вибриона (все образцы идентифи-

цированы как *V. cholerae*, score value 2,44–2,70).

При ПЦР-детекции установлено сохранение исходного набора детерминант патогенности во всех исследуемых образцах. Стабильной оказалась и нуклеотидная последовательность генов «домашнего хозяйства», определенная в полученных на последнем этапе эксперимента субкультурах.

VNTR-анализ показал изменение структуры содержащих вариабельные тандемные повторы локусов в двух отобранных при первом контрольном исследовании субкультурах: в субкультуре штамма *V. cholerae* Eltor O1 И-1462 (локус VcA) и штамма *V. cholerae* Eltor O1 И-441 (локус VcB). В обоих случаях произошла дупликация, что привело к увеличению размера локуса на один повтор (VcA 12→13, VcB 25→26). Выявленное изменение структуры локусов подтверждено секвенированием. Частота из-

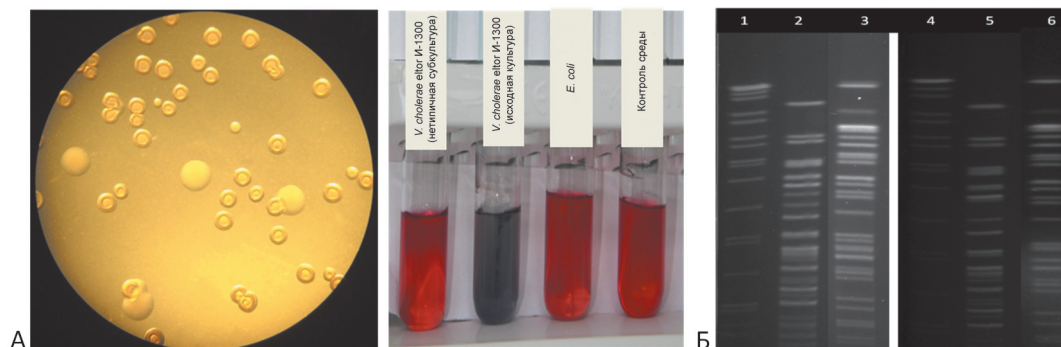


Рис. 2. Фенотипические (А) и молекулярно-генетические (Б) свойства субкультуры штамма *V. cholerae* Eltor И-1300:

А – полиморфные колонии *V. cholerae* Eltor И-1300 на щелочном агаре и ферментация сахарозы на полужидкой питательной среде; Б – PFGE-паттерны исходного штамма *V. cholerae* Eltor И-1300 и экспериментальной морфологически измененной субкультуры: 1–4 – ДНК *Salmonella* ser. Braenderup N98124, рестрицированная *XbaI* (размерный стандарт – 668,9; 452,7; 398,4; 336,5; 310,1; 244,4; 216,9; 173,4; 167,4; 138,9; 104,5; 78,2; 76,8; 54,7; 33,3; 28,8; 20,5 kb); 2–3 – *NotI*- и *SfiI*-генерируемые паттерны рестрикции ДНК исходного штамма *V. cholerae* Eltor И-1300; 5–6 – *NotI*- и *SfiI*-генерируемые паттерны рестрикции ДНК измененной субкультуры *V. cholerae* Eltor И-1300

менчивости VNTR-профиля составила $4 \cdot 10^{-2}$ и касалась только локусов VcA и VcB.

При макрорестрикционном анализе хромосомной ДНК установлено изменение структуры *NotI*- и *SfiI*-генерируемых профилей двух субкультур штамма *V. cholerae* Eltor O1 И-1300, полученных через 7 сут пребывания в микрокосмах. В структуре *NotI*-генерируемого паттерна произошло формирование дополнительного фрагмента и смещение в сторону уменьшения размера фрагмента в диапазоне 104,5–138,9 kb. Изменение профиля рестрикции *SfiI* заключалось в утрате бэнда в размерном диапазоне 76,8–78,2 kb. Кроме того, на 54-е сутки эксперимента (третье контрольное исследование) выявлено изменение полученного при гидролизе экзонуклеазой *SfiI* PFGE-профиля штамма *V. cholerae* Eltor O1 И-1310: профиль одной из субкультур демонстрирует сдвиг фрагмента в сторону увеличения размера в области 216,9–244,4 kb, другой – уменьшения в области 78,2–104,5 kb (рис. 3). Частота изменчивости PFGE-профиля составила $8 \cdot 10^{-2}$, с неравномерным распределением показателя между двумя рестриктазами (*SfiI* – $6 \cdot 10^{-2}$, *NotI* – $2 \cdot 10^{-2}$). Следует отметить, что модификации профиля рестрикции ДНК выявлены только у атипичных генетически измененных штаммов вибриона эльтор.

Анализ структурной организации исследуемых участков генома фенотипически измененной субкультуры *V. cholerae* Eltor O1 И-1300 выявил трансформацию паттернов рестрикции ДНК эндонуклеазами *NotI* (утрата одного фрагмента в диапазоне 104,5–138,9 kb) и *SfiI* (увеличение размера фрагмента в области 216,9–244,4 kb) (рис. 2, Б), при сохранении исходных VNTR- и амплификационных профилей.

Таким образом, инкубация холерного вибриона

в экспериментальных условиях привела к формированию клонов с геномными перестройками отдельных анализируемых локусов. Изменения VNTR-профиля выявлены только на начальном этапе эксперимента и заключались в дупликации повторов VcA и VcB. Известно, что одним из широко распространенных вариантов адаптации бактериальных геномов к стрессовым условиям являются дупликации-амплификации генов (gene duplication-amplification), которые могут служить основой для дальнейших генетических модификаций при условии получения селективных преимуществ измененными клонами [10]. Соответственно, обнаруженные в эксперименте изменения VNTR-профиля можно рассценивать как первичную реакцию генома на стресс, а отсутствие в последующем измененных клонов в популяции свидетельствует о нестабильности вариантов с данными модификациями. Вариабельность и изменчивость VNTR-генотипа *V. cholerae* показана ранее при исследовании в динамике материала от больных холерой и контактировавших с ними лиц в Бангладеш и *in vitro* при пассаже штаммов на питательных средах [13]. Данные о возможности изменения структуры VNTR-локусов в эксперименте *in vivo* получены при исследовании *Salmonella enterica* Typhimurium [11], метициллин-резистентного *S. aureus* [14].

Менее стабильным в эксперименте оказался макрорестрикционный профиль штаммов: измененные по данному признаку клоны выявлялись на всем протяжении опыта с большей частотой в сравнении с VNTR-профилем. Характер изменений PFGE-профиля также может свидетельствовать в пользу дупликаций участков генома как в области сайтов рестрикции (генерирование дополнительных бэндов), так и за их пределами (увеличение размера фрагментов) [10]. Наряду с этим, изменение паттернов рестрикции может быть обусловлено и другими генетическими модификациями, в т.ч. не затрагивающими сайты рестрикции делециями, что рассматривается как один из признаков процесса компактизации генома микроорганизма [8, 9]. Следует сказать, что изменчивость PFGE-профилей выявлена при проспективном исследовании генотипов *V. cholerae* в ходе эпидемии холеры на о. Гаити [15], а также у метициллин-резистентного *S. aureus* *in vivo* [14].

Проведенные исследования доказывают вероятность изменения отдельных локусов генома в период пребывания *V. cholerae* в неблагоприятных условиях среды, что следует принимать во внимание при интерпретации результатов молекулярного типирования. Учитывая особенности экологии холерного вибриона (наличие сапрофитической и паразитической форм существования), необходимо проведение дальнейших экспериментальных исследований по изучению стабильности генотипа изолятов *in vitro* и *in vivo* для комплексной оценки эффективности и информативности применения того или иного подхода к типированию в рамках эпидемиологического надзора за холерой и изучения филогении возбудителя.

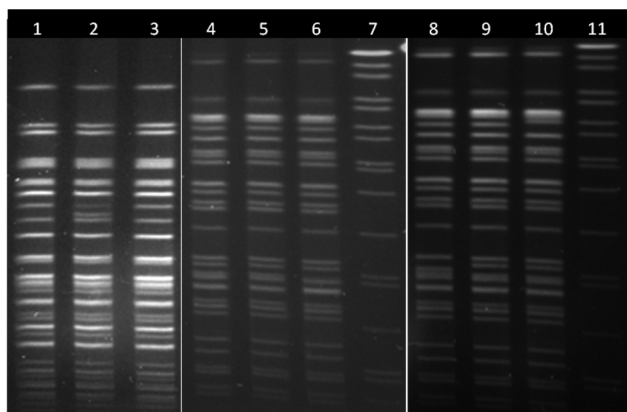


Рис. 3. PFGE-паттерны экспериментальных субкультур *V. cholerae* Eltor:

1–3 – *NotI*-генерируемые паттерны рестрикции ДНК *V. cholerae* Eltor И-1300 (7 сут исследования): 1 – 1 колония, 2 – 2 колония (измененный паттерн), 3 – 3 колония; 4–6 – *SfiI*-генерируемые паттерны рестрикции ДНК *V. cholerae* Eltor И-1300 (7 сут исследования): 4 – 1 колония, 5 – 2 колония, 6 – 3 колония (измененный паттерн); 8–10 – *SfiI*-генерируемые паттерны рестрикции ДНК *V. cholerae* Eltor И-1310 (54 сут исследования): 8 – 1 колония (измененный паттерн), 9 – 2 колония, 10 – 3 колония (измененный паттерн); 7, 11 – ДНК *Salmonella* ser. Braenderup H98124, рестрицированная *XbaI* (размерный стандарт – 668,9; 452,7; 398,4; 336,5; 310,1; 244,4; 216,9; 173,4; 167,4; 138,9; 104,5; 78,2; 76,8; 54,7; 33,3; 28,8; 20,5 kb)

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бельский В.А., Калупкий П.В., Киселева В.В., Шаталова Е.В., Закарян Л.М. Гетерогенность микробных популяций. М.: Медицинское информационное агентство; 2008. 160 с.
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. Красильников А.П., Романовская Т.Р. Микробиологический словарь-справочник. Минск: Асар; 1999. 397 с.
4. Кулышань Т.В., Топорков А.В., Смирнова Н.И. Генетические изменения вирулентных штаммов холерных вибрионов биовара Эльтор при их обитании в водной среде. *Пробл. особо опасных инф.* 2006; 1(91):41–4.
5. Кулышань Т.В., Заднова С.П., Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И. Оценка функциональных особенностей и стрессоустойчивости изогенных токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара элтор. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2015; 3:11–7.
6. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Кожевникова А.С., Половинкина В.С., Куликалова Е.С., Афанасьев М.В. Молекулярно-генетический анализ заносных эпидемически опасных штаммов *Vibrio cholerae* eltor, изолированных в Сибирском и Дальневосточном регионах России. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2012; 2:13–20.
7. Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Басов Е.А., Урбанович Л.Я., Балахонов С.В. Ретроспективный макрорестрикционный анализ штаммов *Vibrio cholerae* eltor, изолированных при эпидемических осложнениях на Дальнем Востоке России. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2014; 2:29–36.
8. Равин Н.В., Шестаков С.В. Геном прокариот. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013; 17(4/2):972–84.
9. Смирнов Г.Б. Механизмы приобретения и потери генетической информации бактериальными геномами. *Усп. современной биол.* 2008; 128(1):52–76.
10. Andersson D.I., Hughes D. Gene Amplification and Adaptive Evolution in Bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 2009; 43:167–95. DOI: 10.1146/annurev-genet-102108-134805.
11. Barua H., Lindblom I.L., Bisgaard M., Christensen J.P., Olsen R.H., Christensen H. *In vitro* and *in vivo* investigation on genomic stability of *Salmonella enterica* Typhimurium DT41 obtained from broiler breeders in Denmark. *Vet. Microbiol.* 2013; 166:607–16. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.06.035.
12. Jubair M., Morris J.G. Jr., Ali A. Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient-poor environments is associated with a novel «persister» phenotype. *PLoS One*. 2012; 7(9). DOI: 10.1371/journal.pone.0045187.
13. Kendall E.A., Chowdhury F., Begum Y., Khan A.I., Li S., Thierer J.H., Bailey J., Kreisel K., Tacket C.O., LaRocque R.C., Harris J.B., Ryan E.T., Qadri F., Calderwood S.B., Stine O.C. Relatedness of *Vibrio cholerae* O1/O139 isolates from patients and their household contacts, determined by multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *J. Bacteriol.* 2010; 192(17):4367–76. DOI: 10.1128/JB.00698-10.
14. O'Sullivan M.V.N., Sintchenko V., Gilbert G.L. Quantitative Estimation of the Stability of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain-Typing Systems by Use of Kaplan-Meier Survival Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(1):112–16. DOI: 10.1128/JCM.01406-12.
15. Talkington D., Bopp C., Tarr C., Parsons M.B., Dahourou G., Freeman M., Joyce K., Turnsek M., Garrett N., Humphrys M., Gomez G., Stroika S., Boncy J., Ochieng B., Oundo J., Klena J., Smith A., Keddy K., Gerner-Smidt P. Characterization of toxigenic

Vibrio cholerae from Haiti, 2010–2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(11):2122–9. DOI: 10.3201/eid1711.110805.

References

1. Bel'sky V.A., Kalutsky P.V., Kiseleva V.V., Shatalova E.V., Zakaryan L.M. [Heterogeneity of Bacterial Populations]. M.: Medical News-Agency; 2008. 160 p.
2. Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Mishan'kin M.B., Suchkov I.Yu., Mishan'kin B.N. [Variable tandem repeats, identified via computerized analysis of *Vibrio cholerae* genome]. *Biotechnologiya*. 2001; 6:85–8.
3. Krasil'nikov A.P., Romanovskaya T.R. [Microbiological Glossary]. Minsk: Asar; 1999. 397 p.
4. Kul'shan' T.V., Toporkov A.V., Smirnova N.I. [Genetic Changes of Virulent *Vibrio cholerae* El Tor Biovar Strains Living in Water Environment]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2006; 1:41–4.
5. Kul'shan' T.V., Zаднова S.P., Cheldyshova N.B., Smirnova N.I. [Evaluation of functional peculiarities and stress-resistance in isogenic toxigenic and non-toxicogenic strains of *Vibrio cholerae*, biovar El Tor]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2015; 3:11–7.
6. Mironova L.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Ya., Kozhevnikova A.S., Polovinkina V.S., Kulikalova E.S., Afanas'ev M.V. [Molecular-genetic analysis of imported epidemically hazardous *Vibrio cholerae* eltor strains, isolated in Siberian and Far East regions of Russia]. *Mol. Genet. Microbiol. Virusol.* 2012; 2:13–20.
7. Mironova L.V., Afanas'ev M.V., Basov E.A., Urbanovich L.Ya., Balakhonov S.V. [Retrospective macro-restriction analysis of *Vibrio cholerae* eltor strains, isolated in the period epidemic complications in the Far East region of Russia]. *Mol. Genet. Microbiol. Virusol.* 2014; 2:29–36.
8. Ravin N.V., Shestakov S.V. [Genome of prokaryotic microorganisms]. *Vavilovskiy Zh. Genet. Selektii*. 2013; 17(4/2):972–84.
9. Smirnov G.B. [Mechanisms of acquisition and loss of genetic information by bacterial genomes]. *Uspekhi Sovrem. Biol.* 2008; 128(1):52–76.
10. Andersson D.I., Hughes D. Gene Amplification and Adaptive Evolution in Bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 2009; 43:167–95. DOI: 10.1146/annurev-genet-102108-134805.
11. Barua H., Lindblom I.L., Bisgaard M., Christensen J.P., Olsen R.H., Christensen H. *In vitro* and *in vivo* investigation on genomic stability of *Salmonella enterica* Typhimurium DT41 obtained from broiler breeders in Denmark. *Vet. Microbiol.* 2013; 166:607–16. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.06.035.
12. Jubair M., Morris J.G. Jr., Ali A. Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient-poor environments is associated with a novel «persister» phenotype. *PLoS One*. 2012; 7(9). DOI: 10.1371/journal.pone.0045187.
13. Kendall E.A., Chowdhury F., Begum Y., Khan A.I., Li S., Thierer J.H., Bailey J., Kreisel K., Tacket C.O., LaRocque R.C., Harris J.B., Ryan E.T., Qadri F., Calderwood S.B., Stine O.C. Relatedness of *Vibrio cholerae* O1/O139 isolates from patients and their household contacts, determined by multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *J. Bacteriol.* 2010; 192(17):4367–76. DOI: 10.1128/JB.00698-10.
14. O'Sullivan M.V.N., Sintchenko V., Gilbert G.L. Quantitative Estimation of the Stability of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain-Typing Systems by Use of Kaplan-Meier Survival Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(1):112–16. DOI: 10.1128/JCM.01406-12.
15. Talkington D., Bopp C., Tarr C., Parsons M.B., Dahourou G., Freeman M., Joyce K., Turnsek M., Garrett N., Humphrys M., Gomez G., Stroika S., Boncy J., Ochieng B., Oundo J., Klena J., Smith A., Keddy K., Gerner-Smidt P. Characterization of toxigenic *Vibrio cholerae* from Haiti, 2010–2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(11):2122–9. DOI: 10.3201/eid1711.110805.

Authors:

Mironova L.V., Khunkheeva Zh.Yu., Basov E.A., Ponomareva A.S., Mitkeeva S.K., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Об авторах:

Миронова Л.В., Хункеева Ж.Ю., Басов Е.А., Пономарева А.С., Миткеева С.К., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 13.01.16.