

А.В.Шашкова, А.А.Горяев, С.П.Заднова, Я.М.Краснов, Н.И.Смирнова, В.В.Кутырев

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERA* O1, ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ БИОВАРА И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ ЭЛЬТОР ВИБРИОНОВ НА ТИПИЧНЫЕ И ИЗМЕНЕННЫЕ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Разработана мультилокусная ПЦР тест система, позволяющая идентифицировать штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы при выделении чистой культуры на основе выявления гена *rfbO*, определять их биовар – классический или эльтор при тестировании соответственно генов *cas3* и *rtxC* и одновременно проводить дифференциацию эльтор вибрионов на типичные токсигенные штаммы, содержащие в геноме ген *ctxB^{Eltor}*, и генетически измененные варианты, имеющие *ctxB^{Class}*. Эффективность и специфичность тест-системы экспериментально доказана при анализе 64 природных штаммов *V.cholerae* разных серогрупп и биоваров и 13 штаммов энтеробактерий и других видов рода *Vibrio*. Принадлежность изученных штаммов *V. cholerae* биовара эльтор к типичным или измененным вариантам подтверждена секвенированием гена *ctxB*.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, мультилокусная ПЦР тест-система, идентификация и дифференциация, генетически измененные варианты.

A.V.Shashkova, A.A.Goryaev, S.P.Zadnova, Ya.M.Krasnov, N.I.Smirnova, V.V.Kutyrev

Construction of the PCR Test-System for the Detection of *Vibrio cholerae* O1 Toxigenic Strains, for Indication of Their Biovar and for Differentiation between Typical and Altered El Tor-*Vibrio* Strains

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Worked out is the multilocus PCR test-system which makes it possible to identify *Vibrio cholerae* O1 strains on the basis of *rfb* gene detection, to determine their biovar – either Classical or El Tor by testing *cas3* or *rtxC* genes respectively, and at the same time to differentiate them into typical (which carry *ctxB^{Eltor}* gene) and genetically altered (which carry *ctxB^{Class}* gene) variants. Efficacy and specificity of the test-system is demonstrated by the analysis of 64 natural *V. cholerae* strains of various serogroups and biovars, and 13 strains of enterobacteria and other species of *Vibrio* genus. Relation of the studied *V. cholerae* El Tor isolates to the typical or altered vibrio variants is proved out by *ctxB* gene sequencing.

Key words: *Vibrio cholerae*, multilocus PCR test-system, identification and differentiation, genetically altered vibrio variants.

Холера – особо опасное инфекционное заболевание с диарейным синдромом, возбудителем которого являются токсигенные штаммы *Vibrio cholerae*. Несмотря на то, что существуют более 200 различных серогрупп холерных вибрионов, эпидемии и пандемии холеры способны вызывать только токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы классического и эльтор биоваров, а также *V.cholerae* O139 серогруппы. Холерные вибрионы классического биовара считаются возбудителями первых шести пандемий азиатской холеры (1817–1923 гг.). Возбудителем 7-й пандемии холеры, начавшейся в 1961 г. и продолжающейся до сих пор, являются штаммы *V. cholerae* биовара эльтор. Токсигенные штаммы *V.cholerae* O139 серогруппы вызывают спорадические случаи холеры. Холерные вибрионы классического и эльтор биоваров отличаются по ряду фенотипических и генетических свойств [1, 4, 11]. Одним из основных генетических отличий холерных классических и эльтор вибрионов является различие нуклеотидных последовательностей гена *ctxB* из оперона *ctxAB*, кодирующего биосинтез холерного токсина (ХТ). Разная нуклеотидная последовательность генов *ctxB* классического и эльтор вибрионов определяет неодинаковую аминокислотную последовательность В-субъединиц их токсинов, вследствие чего различают ХТ классического (или 1-го) типа, продуцируемый класси-

ческими вибрионами, и ХТ эльтор (или 2-го) типа, характерный для вибрионов эльтор [15].

Несмотря на широкое распространение типичного возбудителя 7-й пандемии холеры на ее первом этапе (1960–1990 гг.), в последние годы в процессе эволюции возникли и заняли доминирующее положение новые варианты *V. cholerae* биовара эльтор с повышенной вирулентностью, получившие обозначение генетически измененных вариантов. Геном типичных токсигенных штаммов эльтор вибрионов содержит ген *ctxB^{Eltor}*, тогда как у измененных вариантов присутствует ген *ctxB^{Class}* [5, 8, 13]. Продукция измененными вариантами *V. cholerae* O1 биовара эльтор ХТ классического типа приводит к повышению их вирулентности по сравнению с типичными штаммами. Именно с холерными вибрионами, относящимися по всем фенотипическим признакам к биовару эльтор, но несущими классический аллель гена *ctxB*, связана в настоящее время эпидемия холеры на Гаити [9].

Для генной диагностики холеры разработано значительное количество ПЦР тест-систем, позволяющих не только выявлять токсигенные штаммы холерного вибриона, но и определять их серогруппу, биовар и эпидемическую значимость. Для детекции ДНК вирулентных штаммов *V. cholerae* на основе амплификации фрагмента *ctxA* гена, кодирующего биосинтез А-субъединицы холерного токсина,

используется сертифицированная «ГенХол – тест-система» (ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов). Ростовским НИПЧИ совместно с НИИ микробиологии Минобороны России разработана тест-система для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (*ctxA*⁺ *tcpA*⁺) методом полимеразной цепной реакции. Для выявления холерного вибриона O1 серогруппы, определения биовара и эпидемической значимости используются мультиплексные тест-системы «Ген *V. cholerae* Мульти-ЭФ» (ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов), «АмплиСенс *V. cholerae*-FRT» (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, Москва) и т.д. [2, 3, 6, 7]. Однако все известные ПЦР тест-системы предназначены для выявления типичных штаммов холерного вибриона и не позволяют идентифицировать измененные варианты с повышенной вирулентностью.

Таким образом, в связи с возникновением высоковирулентных измененных вариантов *V. cholerae* биовара эльтор, продуцирующих ХТ классического типа, и опасностью их завоза на территорию Российской Федерации и граничащих с ней стран, актуальна разработка мультилокусной ПЦР тест-системы для быстрой и достоверной идентификации штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы, определения их биовара и дифференциации токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара эльтор на типичные изоляты и измененные варианты.

Материалы и методы

В работе использованы 49 клинических штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, 15 штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп, 4 вида энтеробактерий и 9 штаммов бактерий близкородственных видов, полученных из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб». Для культивирования бактерий применяли бульон и агар LB (pH 7,2), а также бульон АК1 (pH 8,4).

Подготовку проб осуществляли согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Выделение ДНК проводили методом нуклеосорбции на силикагеле с использованием гуанидинизотиоцианата.

Амплификацию ДНК проводили с использованием программируемого термостата «Терцик» (ДНК-технология, Россия).

Анализ и оценку результатов осуществляли путем сравнения полученных в ПЦР ампликонов с аналогичными фрагментами типичных токсигенных штаммов *V. cholerae* классического и эльтор биоваров методом электрофореза в агарозном геле.

Секвенирование гена *ctxB* проводили на приборе «CEQ8000» (Beckman Coulter, США). Для сравнения использовали нуклеотидные последовательности генов штаммов *V. cholerae* N16961 биовара эльтор и *V. cholerae* O395 классического биовара, представленных в GenBank. Анализ последовательностей ДНК

осуществляли с использованием программ «Genetic Analysis System Software Version 9.0» и «Mega4».

Результаты и обсуждение

При конструировании мультилокусной ПЦР тест-системы были использованы как применяемые ранее праймеры, так и разработанные впервые. С целью определения принадлежности выявленного штамма *V. cholerae* к O1 серогруппе были выбраны праймеры на локус *rfbO*, кодирующий синтез O1 антигена [12]. Для дифференциации типичных изолятов и генетически измененных вариантов *V. cholerae* биовара эльтор использовали аллельспецифичные праймеры на ген *ctxB* [14]. Как известно, ген *ctxB* входит в состав оперона *ctxAB*, кодирующего продукцию холерного токсина, и выявление гена *ctxB* также указывает на токсигенность изучаемого штамма. Дифференциацию биоваров проводили с помощью праймеров на ген *rtxC*, который определяется только в штаммах *V. cholerae* эльтор биовара [10], и на ген *cas3*, кодирующий хеликазу и присутствующий у холерных вибрионов классического биовара.

В ходе работы было экспериментально установлено соотношение всех компонентов реакционной смеси, а также подобрано сочетание праймеров, позволяющее получать четкие и легко интерпретируемые результаты ПЦР анализа. Для проведения анализа использовали ПЦР параллельно в двух реакционных смесях. Первая смесь содержала праймеры к генам классических вибрионов, вторая – эльтор. В качестве контрольных штаммов использовали типичные токсигенные штаммы классического и эльтор биоваров соответственно – *V. cholerae* 569B (*rfbO*⁺, *cas3*⁺, *ctxB*^{Class+} и *rtxC*⁺, *ctxB*^{Elor+}) и *V. cholerae* M818 (*rfbO*⁺, *rtxC*⁺, *ctxB*^{Elor+} и *cas3*⁺, *ctxB*^{Class+}).

Специфичность разработанной тест-системы была подтверждена на основе использования штаммов близкородственных видов – *V. mimicus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginoliticus*, *V. albensis*, а также энтеробактерий – *E. coli*, *S. enteritidis*, *Sh. flexneri*, *A. hydrophila*. При проведении ПЦР тестирования указанных штаммов был получен отрицательный результат (отсутствие ампликонов). При анализе штаммов *V. cholerae* O139 и неO1/неO139 серогрупп отсутствовали фрагменты, соответствующие локусу *rfbO* (638 п.н.). Полученные данные подтверждают специфичность разработанной тест-системы в отношении штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы.

Для определения эффективности сконструированной тест-системы исследовали 47 клинических штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы, выделенных в разные годы на территории России и сопредельных государств. Данные по определению специфичности и эффективности сконструированной тест-системы с использованием некоторых штаммов энтеробактерий и видов рода *Vibrio* приведены в таблице и на рис. 1. У всех исследованных штаммов присутствовал ампликон размером 638 п.н., соответствующий локусу

Специфичность и эффективность сконструированной мультилокусной ПЦР-тест-системы

Вид	Серогруппа и биовар	Штамм	Место выделения	Год выделения	Реакционная смесь № 1			Реакционная смесь № 2		
					<i>rfbO1</i>	<i>cas3</i>	<i>ctxB^{Class}</i>	<i>rfbO1</i>	<i>rtxC</i>	<i>ctxB^{Eltor}</i>
<i>E. coli</i>	-	M17	н/и	н/и	-	-	-	-	-	-
<i>S. enteritidis</i>	-	BO3	н/и	н/и	-	-	-	-	-	-
<i>V. mimicus</i>	-	ATCC 33653	Институт Пастера	н/и	-	-	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i>	-	ATCC27562	Калифорнийский унив.	н/и	-	-	-	-	+	-
<i>V. parahaemoliticus</i>	-	745	Новороссийск	н/и	-	-	-	-	-	-
<i>V. albensis</i>	-	37263	Ставрополь	н/и	-	-	-	-	+	-
<i>V. cholerae</i>	O37	1322-69	Коллекция Саказаки	н/и	-	-	+	-	-	-
<i>V. cholerae</i>	O20	10332-62	Коллекция Саказаки	н/и	-	-	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i>	O62	KM3	Узбекистан	1971	-	-	+	-	+	-
<i>V. cholerae</i>	O41	14520	Астрахань	1976	-	+	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i>	O42	13030	Астрахань	1976	-	-	-	-	+	-
<i>V. cholerae</i>	O9	P-16140	Узбекистан	1990	-	-	+	-	+	-
<i>V. cholerae</i>	O139	M028	Индия	1993	-	-	-	-	+	+
<i>V. cholerae</i>	O139	55	Франция	1994	-	-	-	-	+	+
<i>V. cholerae</i>	O1 классический	M8	Волгоград	1942	+	+	+	+	-	-
<i>V. cholerae</i>	O1 классический	569B	Индия	1950	+	+	+	+	-	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M295	Туркменистан	1965	+	-	-	+	+	+
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M818	Саратов	1970	+	-	-	+	+	+
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M1013	Башкирия	1972	+	-	-	+	+	+
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	P13762	Узбекистан	1988	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M 1259	Пермь	1990	+	-	-	+	+	+
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	P15384	Украина	1991	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M1264	Краснодар	1993	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M1293	Дагестан	1994	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	P17644	Ачинск	1997	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M1344	Казань	2001	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M1429	Башкирия	2004	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M1430	Тверь	2005	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	P18899	Мурманск	2006	+	-	+	+	+	-

rfbO1 и свидетельствующий о принадлежности этих штаммов к O1 серогруппе. При этом было показано, что 5 из этих 47 изолятов относятся к токсигенным штаммам классического биовара, так как у них происходила амплификация фрагментов ДНК размером 415 и 189 п.н. в первой реакционной смеси, что указывает на присутствие в их геноме соответственно биовароспецифического гена *cas3*, а также гена *ctxB^{Class}*, связанного с продукцией ХТ классического типа (рис. 1, дорожки 11–14).

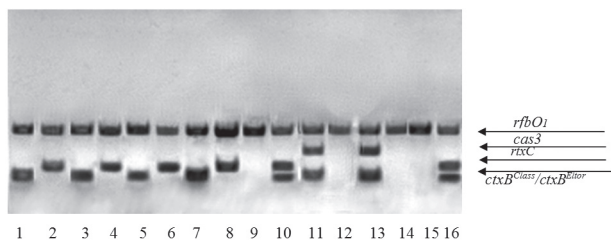


Рис. 1. Электрофореграмма типичных изолятов и измененных вариантов *V. cholerae*, полученная с использованием разработанной мультилокусной ПЦР тест-системы:

Измененные варианты эльтор вибрионов: 1, 2 – *V. cholerae* M1266, 3, 4 – M1293, 5, 6 – *V. cholerae* M1349, 7, 8 – *V. cholerae* M1430; типичные штаммы эльтор вибрионов: 9, 10 – *V. cholerae* M1013, 15, 16 – *V. cholerae* M818; типичные штаммы классических вибрионов: 11, 12 – *V. cholerae* J89, 13, 14 – *V. cholerae* 569B. Нечетные числа – ампликоны, полученные в первой реакционной смеси, содержащей праймеры к генам классических вибрионов; четные – ампликоны, полученные во второй реакционной смеси, содержащей праймеры к генам эльтор вибрионов

У 42 штаммов *V. cholerae* при ПЦР-анализе наблюдалась иная картина. В их геноме присутствовал биовароспецифический ген *rtxC*, выявляемый с помощью второй реакционной смеси, поскольку во всех случаях формировался ампликон размером 265 п.н. (*rtxC*), что указывает на их принадлежность к холерным вибрионам биовара эльтор. При этом 20 штаммов относились к типичным токсигенным штаммам *V. cholerae* O1 биовара эльтор, так как для них было характерно наличие ампликона размером 189 п.н. во второй реакционной смеси, что указывает на наличие в их геноме гена *ctxB^{Eltor}* (рис. 1, дорожки 9–10, 15–16). В то же время у 22 изолятов обнаружено присутствие в геноме гена *ctxB^{Class}* классического типа (*ctxB^{Class}*), о чем свидетельствует образование ампликона к гену *ctxB^{Class}* в первой реакционной смеси (рис. 1, дорожки 1–8).

Для подтверждения полученных с помощью сконструированной мультилокусной ПЦР тест-системы результатов был секвенирован ген *ctxB* некоторых штаммов. В результате проведенного анализа в последовательности гена *ctxB* у 13 взятых для анализа изолятов обнаружены две нуклеотидные замены тимина (Т) на цитозин (С) в положениях 115 и 203, что указывает на присутствие в их геноме гена *ctxB^{Class}* классического типа (*ctxB^{Class}*), рис. 2. Данные секвенирования полностью подтвердили результаты, полученные с использованием разработанной муль-

	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
H818	AAATATATCG	CTAATGATA	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTTAGCTG	GAAGAAAGAA	GATGCTATC	ATTACTTTTA	AGAATGCTGC	AATTTTTCAA	GTAGAGTAC
569BC.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
H8C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
H14C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
J89C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
Dakka 3C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
H295C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
H1013C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
P13762C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
H1259C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
H1261C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
P15384C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
H1264C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
H1266C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
P17647C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
P17644C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
H1293C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
H1344C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
H1345C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
H1349C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
H1429C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
H1430C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
P18899C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....

Рис. 2. Фрагменты секвенированной последовательности гена *ctxB*. Точками отмечены одинаковые нуклеотиды

тилокусной ПЦР тест-системы, указав на принадлежность выявленных 13 штаммов холерного вибриона биовара эльтор к измененным вариантам.

Таким образом, полученные данные свидетельствует о том, что исследование природных штаммов холерных вибрионов с помощью сконструированной мультилокусной ПЦР тест-системы позволяет не только идентифицировать штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы, определять их биовар и токсигенность, но и дифференцировать штаммы *V. cholerae* биовара эльтор на типичные изоляты и измененные варианты, несущие в геноме ген *ctxB* классического типа.

На созданную мультилокусную ПЦР тест-систему подана заявка на получение патента на изобретение (№ 2011109469 от 14.03.2011 г.).

Работа выполнена по государственному контракту № 70-Д от 25.07.2011 г. в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бароян О.В. Холера Эль-Тор. М.: Медицина; 1971. 254 с.
2. Заднова С.П., Ливанова Л.Ф., Крепостнова И.М., Захарова Т.Л., Осина А.В., Смирнова Н.И. Комплексная гено- и иммунодиагностическая тест-система для идентификации холерных вибрионов O1 и O139 серогруппы и оценки их вирулентности. Патент РФ № 2404257.
3. Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Коннова С.С., Куклев В.Е., Кутырев В.В. Способ детекции и определения биотипа, серогруппы и токсигенности возбудителя холеры и набор для его осуществления. Патент РФ 2360972.
4. Смирнова Н.И., Кириллина О.А., Чельдышова Н.Б., Кутырев В.В. Дифференциация штаммов *Vibrio cholerae* eltor по их эпидемиологической значимости с помощью новых диагностических холерных бактериофагов эльтор ctx- и ctx+ и полимеразной цепной реакции. Журн. эпидемиол., микробиол. и иммунобиол. 2001; 6:11–6.
5. Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2004; 4:3–13.
6. Смирнова Н.И., Чельдышова Н.Б., Горяев А.А., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Эволюция генома *Vibrio cholerae*: пути формирования атипичных штаммов. Пробл. особо опасных инф. 2008; 3(97):3–12.
7. Яцышина С.Б., Осина Н.А., Астахова Т.С., Ильичев Ю.А., Куличенко А.Н., Хайтович А.Б., Шипулин Г.А. Разработка тест-систем на основе мультиплексной ПЦР для обнаружения эпидемически значимых холерных вибрионов. URL: <http://www.interlabservice.ru/consulting/index.php?id=1961> (дата обращения 15.03.2011 г.).
8. Bhattacharya T., Chatterjee S., Maiti D. et al. Molecular analysis of the *rstR* and *orfU* genes of the CTX prophages integrated in the small chromosomes of environmental *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains. Environ. Microbiol. 2006; 8:526–34.

9. Chin C.-S., Sorenson J., Harris J.B. et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. N. Engl. J. Med. 2010; 364:33–42.

10. Chow K.H., Ng T.K., Yuen K.Y., Yam W.C. Detection of RTX toxin gene in *Vibrio cholerae* by PCR. J. Clin. Microbiol. 2001; 39:2594–7.

11. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998; 62:1301–14.

12. Goel A.K., Ponnariappan S., Kamboj D.V., Singh L. Single multiplex polymerase chain reaction for environmental surveillance of toxigenic-pathogenic O1 and non-O1 *Vibrio cholerae*. Folia Microbiol. (Praha). 2007; 52:81–5.

13. Kumar P., Jain M., Goel A. K., Bhadauria S., Sharma S. K., Kamboj D. V. et al. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India. J. Med. Microbiol. 2009; 58:234–8.

14. Morita M., Ohnishi M., Arakawa E., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Alam M. et al. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCR assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. Microbiol. Immunol. 2008; 52:314–7.

15. Olsvik Q., Wahlberg J., Petterson B., Uhlen M., Popovic T., Wachsmuth I.K. et al. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:22–35.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Baroyan O.V. [El Tor Cholera]. M.: Meditsina; 1971. 254 p.
2. Zаднова С.П., Ливанова Л.Ф., Крепостнова И.М., Захарова Т.Л., Осина А.В., Смирнова Н.И. [Complex geno- and immunodiagnostic test-system for *Vibrio cholerae* O1 and O139 serotypes identification and evaluation of their virulence]. RF Patent 2404257.
3. Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Коннова С.С., Куклев В.Е., Кутырев В.В. [Method of detection and identification of the cholera agent biotype, serogroup and toxigenicity, and the kit for its application]. RF Patent 2360972.
4. Смирнова Н.И., Кириллина О.А., Чельдышова Н.Б., Кутырев В.В. [Differentiation of *Vibrio cholerae* El Tor Strains on the basis of their epidemic value using the new diagnostic ctx- and ctx+ El Tor cholera bacteriophages and polymerase chain reaction]. Zh. Epidemiol. Mikrobiol. Immunobiol. 2001; 6:11–6.
5. Смирнова Н.И., Кутырев В.В. [Evolution of the cholera agent genome]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2004; 4:3–13.
6. Смирнова Н.И., Чельдышова Н.Б., Горяев А.А., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. [*Vibrio cholerae* genome evolution: ways of atypical strains formation]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 97:3–12.
7. Yatsyshina S.B., Osina N.A., Astakhova T.S., Il'ichev Yu. A., Kulichenko A.N., Khaitovich A.B., Shipulin G.A. [Development of the test-systems on the basis of multiplex PCR for the detection of *Vibrio cholerae* with epidemic potential]. Available from: <http://www.interlabservice.ru/consulting/index.php?id=1961> [cited 15 Mar 2011].

Authors:

Shashkova A.V., Goryaev A.A., Zаднова С.П., Krasnov Ya.M., Sмирнова Н.И., Кутырев В.В. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Шашкова А.В., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 05.04.11.