

Е.Ю.Щелканова, Е.Ю.Агафонова, Л.Ф.Ливанова, Д.А.Агафонов, Ю.В.Лозовский, Н.И.Смирнова

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ ПРОФАГА СТХφ НА ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР, СВЯЗАННЫХ С ВИРУЛЕНТНОСТЬЮ И ПЕРСИСТЕНТНОСТЬЮ

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

Цель работы. Изучить влияние делеции профага СТХφ, несущего гены *ctxAB*, на изменение фенотипических свойств, связанных с патогенностью или формированием биопленки, у нетоксигенных мутантов. **Материалы и методы.** В работе использовали клинические штаммы *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор и их спонтанные нетоксигенные мутанты, утратившие профаг СТХφ. Применены микробиологические и биохимические методы, а также заражение модельных животных (крольчат) клетками исследуемых штаммов. **Результаты и выводы.** Представлены результаты сравнительного анализа фенотипических свойств изогенных токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, утративших профаг СТХφ, кодирующий холерный токсин. Установлено, что делеция профага СТХφ приводит к одновременному изменению у спонтанных нетоксигенных мутантов нескольких фенотипических свойств, связанных с вирулентностью (колонизирующей способности, продукции растворимой гемагглютинин/протеазы, термолабильного гемолизина/цитоллизина) и формированием биопленки (подвижности, биосинтеза экзополисахарида). Высказано предположение, что причиной указанных фенотипических изменений мутантов могли быть изменения активности связанных между собой регуляторных генов, контролирующих вирулентность и процесс образования биопленки у возбудителя холеры.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, профаг СТХφ, делеция, фенотипические свойства.

Корреспондирующий автор: Смирнова Нина Ивановна, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

E.Yu.Shchelkanova, E.Yu.Agafonova, L.F.Livanova, D.A.Agafonov, Yu.V.Lofovsky, N.I.Smirnova

Effect of the Prophage CTXφ Deletion upon Phenotypic Properties in Strains of *Vibrio cholerae* Biovar El Tor, Associated with Virulence and Persistence

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Objective of the study is to evaluate the influence of CTXφ prophage deletion, which carries *ctxAB* genes, on phenotypical properties associated with pathogenicity or biofilm formation in non-toxigenic mutants. **Materials and methods.** Utilized have been the clinical strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor and their spontaneous non-toxigenic mutants that lost CTXφ prophage. Applied have been microbiological and biochemical methods, inoculation of model animals with cells of the strains under study. **Results and conclusions.** The results of comparative analysis of phenotypic properties in isogenic toxigenic and non-toxigenic strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor, which lost CTXφ prophage encoding the cholera toxin, are represented. It is established that the deletion of CTXφ prophage leads to the simultaneous change of several phenotypic properties associated with virulence (colonizing ability, production of soluble hemagglutinin/peptidase and heat labile hemolysin/cytolysin) and biofilm formation (motility, exopolysaccharide biosynthesis) in spontaneous non-toxigenic mutants. It is suggested that the reason for these phenotypic changes in the mutants might be the changes in activity of the related to each other regulatory genes controlling virulence and biofilm formation process in cholera agent.

Key words: *Vibrio cholerae*, CTXφ prophage, deletion, phenotypic properties.

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

Corresponding author: Nina I. Smirnova, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

Citation: Shchelkanova E.Yu., Agafonova E.Yu., Livanova L.F., Agafonov D.A., Lofovsky Yu.V., Smirnova N.I. Effect of the Prophage CTXφ Deletion upon Phenotypic Properties in Strains of *Vibrio cholerae* Biovar El Tor, Associated with Virulence and Persistence. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 2:54–57. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-54-57

Холера остается одной из важнейших проблем для стран Азии, Африки и Южной Америки, на территории которых сформированы эндемичные очаги. Регистрируемые на территории России локальные вспышки и спорадические случаи холеры обусловлены завозом этой инфекции из эндемичных регионов [1, 7]. На протяжении последней седьмой пандемии возбудитель холеры претерпевал различные изменения фено- и генотипа. Современный период текущей пандемии (с 1991 г. по настоящее время) характеризуется широким распространением на эндемичных по холере территориях генетически измененных штаммов (геновариантов) *V. cholerae*

биовара Эль Тор, содержащих в геноме ряд генов возбудителя холеры классического биовара. Так, во входящих в состав генома профага СТХφ генах *ctxAB*, кодирующих холерный токсин или СТ (от cholera toxin), присутствует ген *ctxB* классического биовара (*ctxB1*). Кроме того имеется ряд мутаций и в других генах, участвующих в продукции факторов патогенности. Вследствие приобретения части генетического материала от холерных вибрионов классического биовара эти геноварианты являются более вирулентными по сравнению с типичными штаммами [2, 10, 14]. Известно также, что условия окружающей среды влияют на структуру генома возбудителя

холеры, приводя нередко к делеции профага СТХф, кодирующего ключевой фактор вирулентности возбудителя [3]. Однако сведения о роли делеции профага СТХф в изменении экспрессии генов, определяющих биосинтез других факторов патогенности, до сих пор весьма немногочисленны.

Цель работы – изучить влияние делеции профага СТХф, несущего гены *ctxAB*, на изменение фенотипических свойств, связанных с патогенностью или формированием биопленки у нетоксигенных мутантных штаммов.

Материалы и методы

В работе использовали клинические штаммы *V. cholerae* M888 и P18899 биовара Эль Тор, а также их производные, обозначенные как M888ΔСТХф и P18899ΔСТХф, у которых был делетирован геном профага СТХф. В качестве контрольных взяты штаммы классического биовара *V. cholerae*, Дакка 35Тох⁺ и Дакка 35Тох⁻. Изученные штаммы хранились в Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» в лиофилизированном состоянии. Бактерии культивировали в бульоне и агаре Luria-Bertani (LB) при 37 °С.

Производство растворимой гемагглютинин/протеазы или НА/Р (от hemagglutinin/protease) оценивали на плотной питательной среде, содержащей 10 % обезжиренного молока [5]. Размер зоны протеолиза вокруг макроколонии через 48 ч свидетельствовал о степени выраженности протеолитической активности штаммов.

Для оценки подвижности изолированные колонии исследуемых штаммов *V. cholerae* с помощью реплики наносили на 0,4 % LB-агар (рН 7,2). Через 18–24 ч учитывали зону распространения колонии (в мм) у изучаемых штаммов.

Для оценки продукции термолабильного гемолизина/цитоллизина или VCC (от *Vibrio cholerae* cytotoxin) изолированные колонии исследуемых штаммов с помощью реплики наносили на чашки с LB-агаром (рН 7,2) с добавлением 1 % взвеси эритроцитов барана. В течение 18–24 ч при температуре 37 °С учитывали зону лизиса эритроцитов (в мм) вокруг макроколонии исследуемых штаммов [15].

Для выявления экзополисахаридов или VPS (от *Vibrio polysaccharide*) гелевую пластину, после проведения электрофореза по методу U.Laemmli [9], окрашивали раствором, содержащим 20 % азотно-кислого серебра, и проявляли в растворе с 0,05 % формалином [6].

Оценка способности формировать биопленку проводилась по методу J.Nesper. *et al.* [11] путем выращивания штаммов в LB-бульоне в лунках 96-луночной полистероловой панели. Через 24 ч осторожно удаляли бульон, сформированную биопленку фиксировали 2,5 % раствором глутарового альдегида и окрашивали 0,4 % раствором кристалл виолета. После 3-кратного промывания лунок дистиллирован-

ной водой добавляли в них 300 мкл раствора, содержащего в равных объемах этанол и ацетон, для растворения окрашенной биопленки. Количественным выражением степени образования биопленок в лунках служили значения оптической плотности (ОП), измеряемые на спектрофотометре.

Определение колонизирующей способности штаммов проводили по методу N.Pierce *et al.* [12]. Для заражения животных использовали агаровую культуру. Крольчатам массой 130–160 г внутрикишечно вводили взвесь вибрионов в концентрации 10⁷ и 10⁵ КОЕ в 0,2 мл 0,14 М раствора NaCl. Затем через 48 ч у погибших или усыпленных хлороформом животных брали отрезки толстого и тонкого кишечника длиной 3 см, которые, после трехкратного промывания в растворе NaCl, растирали в фарфоровой ступке со стерильным кварцевым песком и 3 мл NaCl. Из соответствующих разведений полученного гомогената по 0,1 мл взвеси высевали на LB-агар и через 18 ч подсчитывали число выросших колоний из взятых образцов кишечника. Колонизирующую способность изучаемых штаммов определяли по числу клеток, находившихся на поверхности 1 см² стенки тонкого и толстого кишечника крольчат-сосунков. Работа с животными проводилась в соответствии с законодательством РФ, этическими нормами и нормативными документами учреждения.

Все эксперименты проводили трехкратно.

Результаты и обсуждения

Ранее нами в модельных экспериментах было показано возникновение спонтанных нетоксигенных мутантных штаммов из токсигенных штаммов при обитании последних в водной среде. Полногеномное секвенирование двух произвольно выбранных мутантов из 10 полученных, один из которых был производным типичного штамма (M888), а второй – генетически измененного (P18899), показало, что их нетоксигенность обусловлена утратой профага СТХф, несущего гены *ctxAB* [3]. Для выяснения влияния делеции профага на изменение экспрессии других генов, связанных с биосинтезом дополнительных факторов патогенности или выживанием в окружающей среде, проведен сравнительный анализ фенотипов двух пар изогенных штаммов – M888 и M888ΔСТХф, P18899 и P18899ΔСТХф. Обнаружено, что потеря профага СТХф сопровождалась изменением морфологии колоний у нетоксигенных мутантов. Так, если исходные штаммы M888 и P18899 на плотной среде формировали мутные или О-колонии (от opaque), то для Тох⁻ мутантов характерны прозрачные или Т-колонии (от translucent) (рис. 1, а). Поскольку изменение морфологии колоний мутантов могло быть связано с отсутствием или понижением продукции внеклеточного VPS, мы сравнили продукцию у исследуемых штаммов. Оказалось, что уровень биосинтеза VPS у мутантов с измененной морфологией был действительно несколько ниже

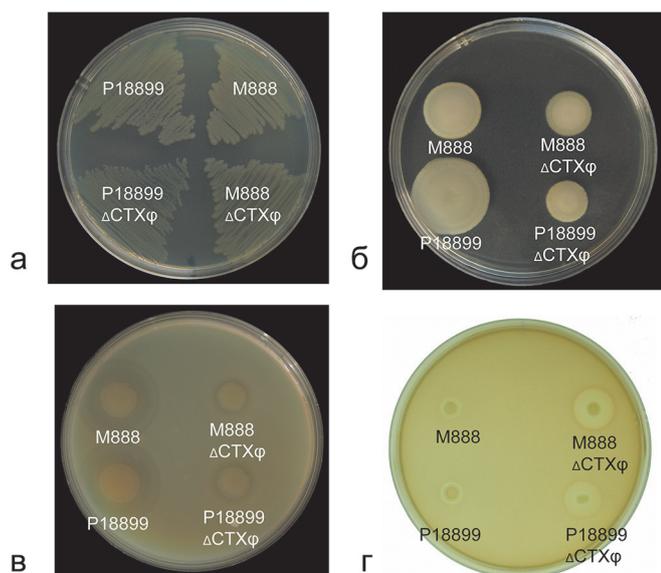


Рис. 1 Фенотипические свойства изогенных токсигенных штаммов M888 и P18899 и их нетоксигенных делеционных мутантов M888ΔСТХф и P18899ΔСТХф:

а – морфология колоний; *б* – подвижность; *в* – продукция растворимой геагглютини/протеазы; *г* – продукция термолabileного гемолизина/цитоллизина

по сравнению с таковым у исходных штаммов. На рис. 2, а представлены результаты определения VPS у изогенной пары P18899 и P18899ΔСТХф. Так как VPS относится к основным компонентам биопленки, далее мы оценили способность мутантов формировать ее на абиотической поверхности в сравнении с исходными штаммами [16]. Оказалось, что мутанты формировали биопленки, однако активность этого процесса у них снижена более чем в два раза по сравнению с токсигенными штаммами (рис. 2, б).

Поскольку сниженная способность к формированию биопленки у нетоксигенных штаммов могла быть связана не только с изменением продукции VPS,

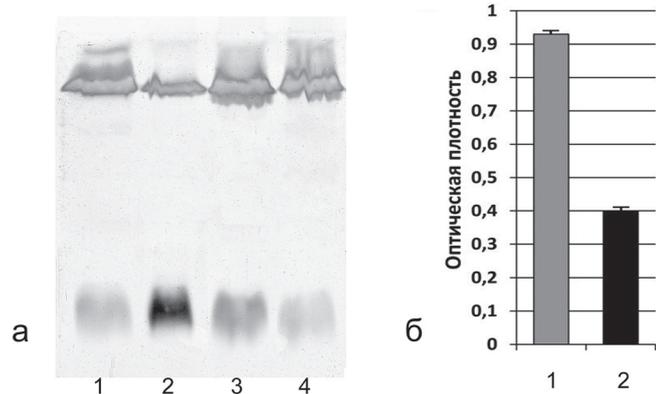


Рис. 2 Продукция экзополисахарида (а) и активность формирования биопленки (б) у исходного токсигенного (P18899) и нетоксигенного мутантного штамма (P18899ΔСТХф) утратившего профаг СТХф:

а) 1, 2 – *V. cholerae* Дакка 35Тох⁺ и Дакка 35Тох⁻ классического биовара, взятые соответственно в качестве отрицательного и положительного контролей; 3 – *V. cholerae* P18899 – токсигенный штамм биовара Эль Тор; 4 – нетоксигенный мутантный штамм *V. cholerae* P18899ΔСТХф биовара Эль Тор. *б*) 1 – исходный токсигенный штамм P18899; 2 – нетоксигенный мутантный штамм P18899ΔСТХф, утративший профаг СТХф

но и их подвижности [3], мы сравнивали изогенные штаммы по этому свойству. В результате установлено, что делеция профага СТХф действительно приводит к изменению подвижности. Нетоксигенные мутанты были заметно менее подвижны по сравнению с исходными токсигенными штаммами (рис. 1, б). Таким образом обнаружено, что делеция профага с генами *ctxAB* приводит не только к утрате токсигенности, но и к изменению фенотипических свойств, связанных с образованием биопленки (VPS и подвижности), способствующей сохранению холерных вибрионов в окружающей среде.

Особый интерес представлял вопрос о влиянии делеции профага на продукцию других факторов патогенности. В этой связи в первую очередь мы определили продукцию нетоксигенными штаммами токсин-корректируемых пилей адгезии или TCP (от toxin-coregulated pili) – одного из ключевых факторов вирулентности, за счет которого происходит колонизация вибрионами тонкого кишечника человека. Основанием для проведения таких экспериментов явилась выявленная ранее связь между экспрессией генов *ctxAB* и *tcpA*, кодирующего основную субъединицу пилей адгезии. Показано, что повреждение гена *tcpA* приводит к резкому снижению продукции СТ [4]. Проведенный нами эксперимент по оценке колонизирующей способности нетоксигенных мутантов на модельных животных подтвердил наличие такой связи. Оказалось, что способность нетоксигенных мутантов к колонизации кишечника крольчат была значительно ниже таковой исходных штаммов. Этот вывод основан на результатах внутрикишечного заражения животных клетками изогенных штаммов P18899 и P18899ΔСТХф. Так, количество клеток исходного штамма P18899, прикрепившихся за счет TCP к 1 см² эпителия стенки тонкого кишечника крольчат ($6,1 \cdot 10^5$ м.к./см²), значительно превышало таковые показатели ($1,3 \cdot 10^4$ м.к./см²) для мутантного штамма. Выраженное понижение (более чем в 40 раз) колонизирующей способности нетоксигенных мутантов указывает на роль делеции профага СТХф в экспрессии второго ключевого фактора вирулентности.

Кроме продукции TCP у нетоксигенных мутантов определен уровень биосинтеза двух дополнительных факторов патогенности: НА/Р и VСС [4, 13]. В результате установлено, что у мутантных штаммов уровень продукции НА/Р был значительно ниже, чем у исходных штаммов (рис. 1, в). Другая картина наблюдалась при сравнительной оценке уровня продукции VСС. Обнаружено, что у нетоксигенных мутантов продукция VСС резко повысилась. Уровень биосинтеза этого порообразующего токсина у мутантов стал существенно выше по сравнению с исходными штаммами (рис. 1, г).

Таким образом, при фенотипическом анализе изогенных штаммов впервые установлено, что делеция профага СТХф из хромосомы природных типичных и генетически измененных штаммов возбудителя холеры Эль Тор приводит не только к утрате их

токсигенных свойств. Важным следствием этого события является одновременное изменение нескольких других фенотипических свойств, связанных как с вирулентностью (биосинтез TCP, HA/P, VCC), так и с образованием биопленки (VPS и подвижность). Проведенный ранее анализ полных геномов сравниваемых штаммов показал отсутствие различий между ними относительно структуры их генов, определяющих изученные свойства [3]. Именно этот факт позволяет говорить о том, что обнаруженные у мутантов фенотипические особенности, возможно, связаны с изменением активности регуляторных генов, прямо или опосредованно контролируемых как патогенность, так и процесс формирования биопленки у холерных вибрионов. Для полного понимания роли профага CTXφ в контроле активности регуляторных генов необходимы дополнительные исследования.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Фёдоров Ю.М., Подосинникова Л.С., Горобец А.В. Холера в начале XXI века. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2005; 3:44–8.
2. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Варибельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор, изолированных на территории России в современный период. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2011; 3:11–8.
3. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Баранихина Е.Ю., Краснов Я.М., Агафонов Д.А., Кутырев В.В. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор с различной эпидемиологической значимостью. *Генетика.* 2016; 52(9):1029–41. DOI: 10.7868/S0016675816060126.
4. Almagro-Moreno S., Pruss K., Taylor R.K. Intestinal colonization dynamics of *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* 2015; 11(5):e1004787. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004787.
5. Finkelstein R.A., Boesman-Finkelstein M., Chang Y., Häse C.C. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/tease, colonial variation, virulence, and detachment. *Infect. Immun.* 1992; 60(2):472–8.
6. Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* 1983; 154(1):269–77.
7. Kaper J.B., Morris J.G., Levin M.M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8:48–89.
8. Krukoniš E.S., DiRita V.J. From motility to virulence: sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003; 6:186–90. DOI: 10.1016/S1369-5274(03)00032-8.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
10. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Faruque A.S., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:4211–3. DOI: 10.1128/JCM.01304-06.
11. Nesper J., Lauriano C.M., Klose K.E., Kapfhammer D., Kraiβ A., Reidl J. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor *galU* and *galE* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect. Immun.* 2001; 69(1):435–45. DOI: 10.1128/IAI.69.1.435-445.2001.
12. Pierce N.F., Cray W.C., Kaper J.B., Mekalanos J.J. Determinants of immunogenicity and mechanisms of protection by virulent and mutant *Vibrio cholerae* O1 in rabbits. *Infect. Immun.* 1988; 56(1):142–8.
13. Saka H.A., Bidinost C., Sola C., Carranza P., Collino C., Ortiz S., Echenique J.R., Bocco J.L. *Vibrio cholerae* cytotoxin is essential for high enterotoxicity and apoptosis induction produced by a cholera toxin gene-negative *V. cholerae* non-O1, non-O139 strain. *Microb. Pathog.* 2008; 44:118–28. DOI: 10.1016/j.micpath.2007.08.013.
14. Satchella K.J.F., Jones C.J., Wonga J., Queena J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun.* 2016; 84(9):2473–81. DOI: 10.1128/IAI.00189-16.
15. Singh D.V., Matte M.H., Matte G.R., Jiang S., Sabeena F., Shukla B.N., Sanyal S.C., Huq A., Colwell R.R. Molecular analyses of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1 and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(2):910–21. DOI: 10.1128/AEM.67.2.910-921.2001.
16. Teschler J.K., Zamorano-Sánchez D., Utada A.S., Warner C.J.A., Wong G.C.L., Linington R.G., Yildiz F.H. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(5):255–68. DOI: 10.1038/nrmicro3433.

References

1. Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., Fedorov Yu.M., Podosinnikova L.S., Gorobets A.V. [Cholera at the beginning of the XXI century]. *Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2005; 3:44–8.
2. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., Kutyrev V.V. [Variability of the genome of the altered *Vibrio cholerae* variants biovar El Tor, isolated in the territory of Russia in the modern period]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2011; 3:11–8.
3. Smirnova N.I., Kul'shan' T.A., Baranikhina E.Yu., Krasnov Ya.M., Agafonov D.A., Kutyrev V.V. [Genome structure and origin of non-toxicogenic strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor of different epidemiological significance]. *Genetika.* 2016; 52(9):1029–41. DOI: 10.7868/S0016675816060126.
4. Almagro-Moreno S., Pruss K., Taylor R.K. Intestinal colonization dynamics of *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* 2015; 11(5):e1004787. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004787.
5. Finkelstein R.A., Boesman-Finkelstein M., Chang Y., Häse C.C. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/tease, colonial variation, virulence, and detachment. *Infect. Immun.* 1992; 60(2):472–8.
6. Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* 1983; 154(1):269–77.
7. Kaper J.B., Morris J.G., Levin M.M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8:48–89.
8. Krukoniš E.S., DiRita V.J. From motility to virulence: sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003; 6:186–90. DOI: 10.1016/S1369-5274(03)00032-8.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
10. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Faruque A.S., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:4211–3. DOI: 10.1128/JCM.01304-06.
11. Nesper J., Lauriano C.M., Klose K.E., Kapfhammer D., Kraiβ A., Reidl J. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor *galU* and *galE* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect. Immun.* 2001; 69(1):435–45. DOI: 10.1128/IAI.69.1.435-445.2001.
12. Pierce N.F., Cray W.C., Kaper J.B., Mekalanos J.J. Determinants of immunogenicity and mechanisms of protection by virulent and mutant *Vibrio cholerae* O1 in rabbits. *Infect. Immun.* 1988; 56(1):142–8.
13. Saka H.A., Bidinost C., Sola C., Carranza P., Collino C., Ortiz S., Echenique J.R., Bocco J.L. *Vibrio cholerae* cytotoxin is essential for high enterotoxicity and apoptosis induction produced by a cholera toxin gene-negative *V. cholerae* non-O1, non-O139 strain. *Microb. Pathog.* 2008; 44:118–28. DOI: 10.1016/j.micpath.2007.08.013.
14. Satchella K.J.F., Jones C.J., Wonga J., Queena J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun.* 2016; 84(9):2473–81. DOI: 10.1128/IAI.00189-16.
15. Singh D.V., Matte M.H., Matte G.R., Jiang S., Sabeena F., Shukla B.N., Sanyal S.C., Huq A., Colwell R.R. Molecular analyses of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1 and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(2):910–21. DOI: 10.1128/AEM.67.2.910-921.2001.
16. Teschler J.K., Zamorano-Sánchez D., Utada A.S., Warner C.J.A., Wong G.C.L., Linington R.G., Yildiz F.H. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(5):255–68. DOI: 10.1038/nrmicro3433.

Authors:

Shchelkanova E.Yu., Agafonova E.Yu., Livanova L.F., Agafonov D.A., Lozovsky Yu.V., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Щелканова Е.Ю., Агафонова Е.Ю., Ливанова Л.Ф., Агафонов Д.А., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 01.12.16.