

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

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕННЫХ ВАРИАНТОВ  
*VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬТОР**

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

В работе определена продукция холерного токсина у измененных вариантов эльтор вибрионов, содержащих ген *ctxB* классического типа, выделенных на территории России с 1993 по 2010 год, и изучены их генетические свойства, связанные с продукцией этого фактора патогенности. Установлено, что измененные варианты синтезируют в 10–20 раз больше холерного токсина по сравнению с типичными эльтор вибрионами. При этом не обнаружено изменений в промоторной области оперона *ctxAB*, но установлено, что в отличие от типичных штаммов, содержащих одну копию профага СТХφ, 90 % изученных измененных вариантов имели в геноме две копии профага СТХφ. Несмотря на повышенное количество копий профага СТХφ, выявленные различия в синтезе холерного токсина в большей степени могут быть обусловлены изменением транскрипционной активности регуляторных генов, что приводит к активной продукции холерного токсина измененными вариантами в нетипичных для эльтор вибрионов условиях.

*Ключевые слова:* измененные варианты *V. cholerae* биовара эльтор, продукция холерного токсина, копияность генов *ctxAB*, секвенирование промоторной области.

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

**Phenotypic and Genetic Analysis of Altered Variants of *Vibrio cholerae* Biovar El Tor**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Determined is cholera toxin production by altered *Vibrio cholerae* O1 eltor strains, isolated on the territory of Russia in 1993–2010, which contain classical type *ctxB* gene. Studied are their genetic characteristics related to the production of this virulence factor. Determined is that altered eltor variants yield 10 to 20 times more cholera toxin than typical eltor strains. Changes in promoter region of *ctxAB* operon are not detected but elucidated is that 90 % of studied altered strains contain two copies of CTXφ prophage in their genome whereas typical strains carry one copy of CTXφ prophage. Despite the higher copy number of CTXφ prophage, the identified differences in production of cholera toxin can be associated mostly with a change of transcriptional activity of regulatory genes. That causes the active production of cholera toxin by the altered variants of *Vibrio cholerae* eltor in non typical environment.

*Key word:* altered variants of *V. cholerae* biovar eltor, production of cholera toxin, copy number of *ctxAB* genes, sequencing of promoter region.

Эпидемически опасные штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы по ряду фенотипических и генетических свойств подразделяются на два биовара – классический и эльтор. Штаммы холерного вибриона классического биовара были, видимо, возбудителем первых шести пандемий холеры. Возбудителем текущей, 7-й, пандемии холеры являются токсигенные штаммы *V. cholerae* биовара эльтор [1, 9]. В ходе развития 7-й пандемии в эндемичных по холере районах начиная с 1991 г. появились генетически измененные токсигенные штаммы холерного вибриона биовара эльтор, получившие обозначение измененные варианты [14]. К настоящему времени измененные варианты *V. cholerae* биовара эльтор вытеснили типичные штаммы этого возбудителя во многих эндемичных по холере районах и начиная с 1993 г. стали причиной локальных вспышек или спорадических случаев холеры на территории Российской Федерации [5, 15].

Одним из основных факторов патогенности *V. cholerae* является холерный токсин (ХТ), кодируемый генами *ctxAB*, расположенными в профаге СТХφ, интегрированным в хромосому. Холерные вибрионы классического биовара продуцируют ХТ

классического типа (ХТ1), в то время как типичные штаммы эльтор вибрионов синтезируют ХТ эльтор типа (ХТ2). Эти два типа токсинов различаются по аминокислотной последовательности их иммуногенных В субъединиц и соответственно по нуклеотидной последовательности генов *ctxB*, кодирующих их биосинтез. В отличие от типичных штаммов измененные варианты продуцируют ХТ классического типа, что обусловлено присутствием в геноме их профага СТХφ гена *ctxB* классического типа [14].

Согласно литературным данным измененные варианты холерного вибриона являются более вирулентными по сравнению с типичными изолятами [7, 15]. Причины повышенной вирулентности измененных вариантов пока не совсем ясны. В этой связи представлялось, в частности, интересным оценить продукцию ХТ измененными вариантами в условиях *in vitro*, а также определить копияность генов *ctxAB*, входящих в состав профага СТХφ, и изучить структуру их оперона.

Цель данной работы состояла в проведении сравнительного анализа продукции ХТ типичными и измененными вариантами *V. cholerae* эльтор биовара, выделенными на территории России, и изучении их

генетических свойств, связанных с продукцией этого фактора вирулентности.

### Материалы и методы

В работе было использовано 23 штамма измененных вариантов и 11 типичных штаммов *V. cholerae* эльтор биовара, хранящихся в Государственной коллекции патогенных бактерий. Для культивирования бактерий использовали агар LB (рН 7,6). Определение биовароспецифических свойств осуществляли согласно МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» [3].

Синтез холерного токсина изучали с помощью иммуноферментного анализа GM<sub>1</sub> ELISA [16]. Для детекции ХТ штаммы выращивали в двух разных условиях: оптимальных для продукции ХТ классическими вибрионами – бульон LB (рН 6,8) с 66 моль NaCl при температуре 30 °С с аэрацией [13] и эльтор вибрионами – бульон АК1 (1,5 % Бакто пептона, 0,4 % дрожжевого экстракта, 0,5 % NaCl, 0,3% NaHCO<sub>3</sub>), рН 7,6, при температуре 37 °С [8].

Для изучения генетической организации сравниваемых штаммов использовали блот-гибридизацию по Саузерну, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и секвенирование. Выделение ДНК, ДНК-ДНК гибридизацию осуществляли по методам, описанным в пособии по молекулярному клонированию [4]. Для определения количества гептапептидных последовательностей (TTTTGAT) в промоторной области *ctxA* проводили секвенирование на приборе «ABI RPISM® 3100 Genetic Analyzer» (США), получая предварительно ампликоны на приборе «Терцик» (Россия) с использованием рассчитанного в данной работе прямого р1-5'-TGCCTAACAAATCCCGTCTGAGTTC-3' и обратного р2-5'-ATGGGCGACAGGTCATCACATTTAC-3' праймеров. Температура отжига праймеров составляла 60 °С, размер получаемого ампликона – 578 п.н. Выравнивание и сравнение секвенированных нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе «Mega4».

### Результаты и обсуждение

На первом этапе работы был проведен фенотипический анализ изучаемых штаммов для определения их биовара. В результате установлено, что измененные варианты обладают всеми признаками, характерными для *V. cholerae* биовара эльтор – лизируются до ДРТ диагностическим холерным бактериофагом эльтор, но не лизируются классическим, растут на агаре с добавлением 50 мкг/мл полимиксина В и образуют ацетилметилкарбинол в реакции Фогес-Проскауэра.

Повышенная вирулентность измененных вариантов *V. cholerae* биовара эльтор, содержащих ген *ctxB* классических вибрионов, может быть обусловлена более высоким уровнем биосинтеза ими ХТ по сравнению с типичными штаммами этого возбудителя. В этой связи нами впервые был проведен срав-

нительный анализ продукции ХТ генетически измененными и типичными штаммами холерных эльтор вибрионов, выделенными на территории России с 1970 по 2010 год. Известно, что оптимальные условия для продукции ХТ токсигенными штаммами двух биоваров неодинаковы, что определяется различиями в регуляторных системах, контролирующей экспрессию структурных генов холерного токсина классических или эльтор вибрионов. Как известно, у холерных вибрионов двух биоваров основными регуляторными белками являются белки ToxR и ToxT. Разница в регуляции синтеза этих белков заключается в том, что хотя холерные вибрионы обоих биоваров при культивировании их в стандартных лабораторных условиях (LB-бульон, 30 °С) образуют одинаковое количество регуляторного белка ToxR, непосредственно участвующего в активации транскрипции генов *ctxAB*, но только у классических вибрионов в этих условиях происходит синтез второго регуляторного белка ToxT, являющегося транскрипционным регулятором многих генов, в том числе и генов холерного токсина [6]. Однако до сих пор нет полных сведений об уровне экспрессии гена *ctxB* классического типа в новом генетическом окружении, а именно, в клетках *V. cholerae* биовара эльтор. На этом основании мы определили уровень продукции ХТ изучаемыми штаммами (23 измененных вариантов и 11 типичных изолятов) при выращивании их в двух разных условиях: оптимальных для биосинтеза этого белка *V. cholerae* классического биовара (LB-бульон, рН 6,8, 30 °С, 18 ч с аэрацией) и оптимальных для продукции ХТ *V. cholerae* биовара эльтор (АК1 бульон, рН 7,6, 37 °С, 4 ч без аэрации, 16 ч с аэрацией).

Оказалось, что штаммы измененных вариантов, выделенные в разные годы и в разных регионах, продуцировали значительно больше ХТ (0,1–1,2 мкг/мл) по сравнению с типичными штаммами (0,01–0,03 мкг/мл). При этом установлено, что 13 изолятов из 23 изученных, или 57 % синтезировали больше ХТ в LB бульоне при 30 °С, т.е. в условиях оптимальных для продукции этого белка классическими штаммами (таблица). Можно предположить, что с приобретением нового гена *ctxB* классического типа у эльтор вибрионов появилась способность образовывать в стандартных лабораторных условиях белок ToxT, независимо от экспрессии белка ToxR. Вместе с тем было обнаружено 6 штаммов – М1272 (Краснодар, 1993), М1270 (Татарстан, 1993), М1269 (Магнитогорск, 1994), М1295 (Дагестан, 1994), М1328 (Дагестан, 1998), Л4150 (Москва, 2010), продукция ХТ у которых не зависела от среды выращивания, а также 4 штамма – М1299 (Краснодар, 1993), М1275 (Дагестан, 1993), М1268 (Магнитогорск, 1994), Л3226 (Москва, 2010), которые в 4–10 раз более активно синтезировали ХТ при культивировании в среде АК1 по сравнению с LB бульоном (таблица). Причина таких различий в экспрессии генов *ctxAB* между изученными штаммами пока не известна.

Продукция холерного токсина и генетические свойства измененных и типичных штаммов *V. cholerae* биовара эльтор

Штамм <i>V. cholerae</i>	Место и год выделения	Продукция ХТ, мкг/мл		Генетические свойства	
		АКІ	LB	Кол-во копий профага СТХφ	Число повторов ТТТГАТ*
569В классического биовара	Индия, 1950	2,0	9,0	2	8
<i>Измененные варианты эльтор биовара</i>					
M1264	Краснодар, 1993	0,03	0,6	н/о	4
M1272**	Краснодар, 1993	0,2	0,3	2	н/о
M1297	Дагестан, 1993	0,01	0,4	н/о	н/о
M1266	Пермь, 1994	0,03	0,5	н/о	4
M1293	Дагестан, 1994	0,02	0,1	2	4
M1268**	Магнитогорск, 1994	0,04	0,01	2	н/о
P17644	Ачинск, 1997	0,03	0,4	н/о	3
P17647	Ачинск, 1997	0,01	0,1	н/о	3
M1326	Дагестан, 1998	0,04	0,8	н/о	н/о
M1344	Казань, 2001	0,1	0,8	н/о	4
M1345	Казань, 2001	0,04	1,2	2	4
M1349	Казань, 2001	<0,01	0,9	н/о	4
M1429	Башкирия, 2004	0,01	0,5	2	4
M1430	Тверь, 2005	0,1	1,3	2	4
P18899	Мурманск, 2006	0,01	0,8	1	4
Л3226	Москва, 2010	0,4	0,1	2	5
Л4150	Москва, 2010	0,4	0,3	2	5
<i>Типичные штаммы эльтор биовара</i>					
M818	Саратов, 1970	0,03	0,02	1	4
M736	Пермь, 1970	0,03	0,02	н/о	4
M738	Пермь, 1970	0,03	0,03	н/о	4
M887	Астрахань, 1970	<0,01	<0,01	1	н/о
M888	Астрахань, 1970	<0,01	<0,01	1	н/о
M890	Астрахань, 1970	0,1	0,01	1	н/о
M1011	Башкирия, 1972	0,03	0,02	н/о	4
M1013	Башкирия, 1972	0,02	0,02	н/о	4
M641	Астрахань, 1975	0,1	0,02	1	н/о
C402	Ставрополь, 1990	0,03	0,01	н/о	4
C447	Ставрополь, 1990	<0,01	<0,01	н/о	4

\* Число тандемных повторов ТТТГАТ в промоторной области оперона *ctxAB*, участвующих в регуляции синтеза холерного токсина.

\*\* Другие штаммы с аналогичными свойствами не приведены; н/о – не определяли.

Можно лишь предположить, что более эффективный синтез ХТ рядом штаммов измененных вариантов в среде АКІ может быть следствием дополнительных изменений в нуклеотидной последовательности гена *ctxB*. Так, известно, что в нуклеотидной последовательности гена *ctxB* штаммов (Л3226, Л4150), изолированных в 2010 г. в Москве, помимо 2 известных однонуклеотидных замен в положении 115 (Т/С) и 203 (Т/С), характерных для классических вибрионов, присутствует новая мутация, а именно, в положении 58 цитозин заменен на аденины (С/А) [5]. В целом полученные нами результаты о повышенном синтезе ХТ измененными вариантами, по сравнению с типичными штаммами, согласуются с данными зарубежных исследователей [7].

Итак, анализируя полученные эксперименталь-

ные данные можно предположить, что различия в продукции ХТ между типичными и генетически измененными штаммами могут быть обусловлены разной регуляцией синтеза этого фактора вирулентности, которая, как известно, осуществляется за счет нескольких механизмов. Во-первых, количество вырабатываемого ХТ зависит от копийности оперона *ctxAB*, локализованного в геноме профага СТХφ. Известно, что холерные вибрионы эльтор характеризуются большим разнообразием относительно числа копий оперона *ctxAB*. По данным литературы, более 70 % изученных типичных штаммов содержали в хромосоме одну копию этого оперона, а при увеличении числа копий оперона *ctxAB* продукция ХТ возрастала [11]. Референс-штамм *V. cholerae* N16961 эльтор биовара также содержит одну копию профага СТХφ. Во-вторых, большая роль

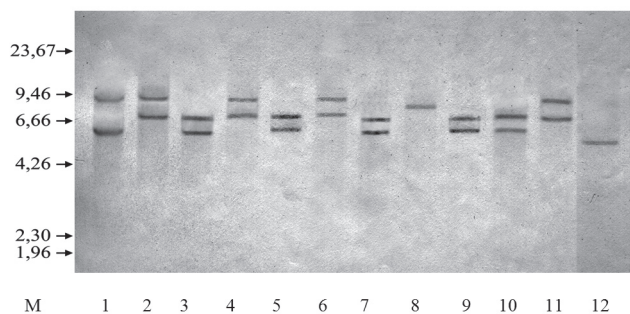


Рис. 1. Блот-гибридизация хромосомной ДНК генетически измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара эльтор с СТ-зондом:

*M* – HindIII – рестрикты ДНК фага  $\lambda$ , взятые в качестве маркеров. Измененные варианты *V. cholerae*: 2 – M1272; 3 – J4150; 4 – M1270; 5 – M1429; 6 – M1268; 7 – J3226; 9 – M1345; 10 – M1430; 11 – M1293; 12 – P18899. Контроли: 1 – *V. cholerae* 569В классического биовара; 8 – *V. cholerae* M818 эльтор биовара

в регуляции синтеза ХТ принадлежит tandemно повторяющимся последовательностям TTTTGAT, расположенным на расстоянии 76 п.н. от начала транскрипции гена *ctxA*. В разных штаммах количество этих повторов изменяется от 3 до 8. При этом 8 раз эта последовательность повторена перед обеими копиями *ctxAB* оперона в хромосоме только высокотоксигенного штамма классического биовара *V. cholerae* 569В [11]. В-третьих, имеются дополнительные регуляторные гены, продукты которых также влияют на уровень биосинтеза ХТ.

В этой связи, на первом этапе работы с помощью блот-гибридизации по Саузерну впервые было определено количество копий оперона *ctxAB* в хромосоме 10 штаммов измененных вариантов. В качестве зонда использовали полученный с помощью ПЦР ампликон гена *ctxA* размером 564 п.н. Этот зонд, меченный дигоксигенином, был обозначен как СТ. Хромосома изучаемых штаммов фрагментировалась с помощью эндонуклеазы рестрикции PstI. В результате установлено, что в хромосоме 9 штаммов присутствовало две копии оперона *ctxAB*. Поскольку каждая копия оперона *ctxAB* локализована в геноме одного профага СТХф, то полученные данные свидетельствуют о том, что указанные штаммы содержат по две копии этого профага. При этом было обнаружено две группы штаммов, различающиеся величиной PstI-фрагментов, гибридирующихся с СТ-зондом. Первая группа состояла из 4 штаммов (M1272, M1270, M1268, M1293), выделенных до 2001 г., обе копии профага СТХф у которых входили в состав двух фрагментов размером 9,0 т.п.н. и 7,0 т.п.н. (рис. 1, дорожки 2, 4, 6, 11). Это означает, что одна из копий профага этих штаммов расположена в том же хромосомном фрагменте размером 9,0 т.п.н., что и одна из двух копий профага СТХф у штамма 569В классического биовара (рис. 1, дорожка 1). Возможно, у названных штаммов измененных вариантов данная копия профага СТХф локализована также на малой хромосоме, как и у холерных вибрионов классического биовара. Хотя это предположение нуждается в дальнейшем экспериментальном подтверждении, местоположение двух

копий профага СТХф на 2 разных хромосомах у ряда штаммов измененных вариантов уже доказано рядом зарубежных исследователей [10]. Что касается второй группы, то она состояла из 5 штаммов (M1345, M1429, M1430, J3226, J4150), у которых две копии профага СТХф локализованы на PstI-хромосомных фрагментах размером 7,0 т.п.н. и 5,4 т.п.н. (рис. 1, дорожки 3, 5, 7, 9, 10). Такое местоположение СТХф характерно для ряда типичных холерных вибрионов эльтор, у которых обе копии профага расположены на большой хромосоме в непосредственной близости друг от друга [2, 11]. В то же время штамм *V. cholerae* P18899, выделенный в 2006 г. в Мурманске, имел одну копию оперона *ctxAB* с молекулярной массой 5,4 т.п.н. (рис. 1, дорожка 12).

Таким образом, на основе анализа данных блот-гибридизации с СТ зондом установлено, что в отличие от типичных штаммов холерных вибрионов эльтор, штаммы измененных вариантов в 90 % случаев содержали в геноме две копии профага СТХф, что, возможно, способствует повышению биосинтеза ХТ. Однако, учитывая обнаружение штаммов, продуцирующих повышенное количество ХТ, но содержащих одну копию СТХф (*V. cholerae* P18899), вполне вероятно, что существуют иные механизмы, участвующие в данном процессе.

Второе возможное объяснение повышенной продукции ХТ у измененных вариантов могло состоять в том, что внедрение в их хромосому гена *ctxB* классического типа сопровождалось увеличением числа копий tandemных повторов TTTTGAT в промоторной области оперона *ctxAB*. Для проверки этого предположения нами была секвенирована промоторная область оперона *ctxAB*, находящаяся между генами *zot* и *ctxA*, у 13 измененных и 7 типичных штаммов. Как известно, холерные вибрионы классического биовара содержат в промоторной области от шести до восьми копий гептаповторов (TTTTGAT), которые расположены в tandemном порядке и являются сайтами связывания с регуляторным белком ToxR, увеличивающим сродство промотора с РНК-полимеразой. В то же время эльтор вибрионы имеют от трех до четырех данных копий. Повышенное содержание гептаповторов в геноме классических вибрионов является одной из причин более эффективного синтеза ХТ по сравнению с вибрионами эльтор [12]. В результате было установлено, что у большинства штаммов (9 из 13 изученных) в промоторной области оперона *ctxAB* содержится четыре копии гептаповторов (рис. 2, таблица). Это означает, что исследованные штаммы измененных вариантов не отличались по этому свойству от типичных штаммов, включая референс-штамм *V. cholerae* N16961. Лишь два штамма, выделенные в Ачинске в 1997 г., содержали три таких повтора. В то же время следует особо отметить тот факт, что в отличие от всех других изученных нами и описанных другими исследователями штаммов *V. cholerae* биовара эльтор, два штамма измененных вариантов, выделенные в 2010 г., несли 5

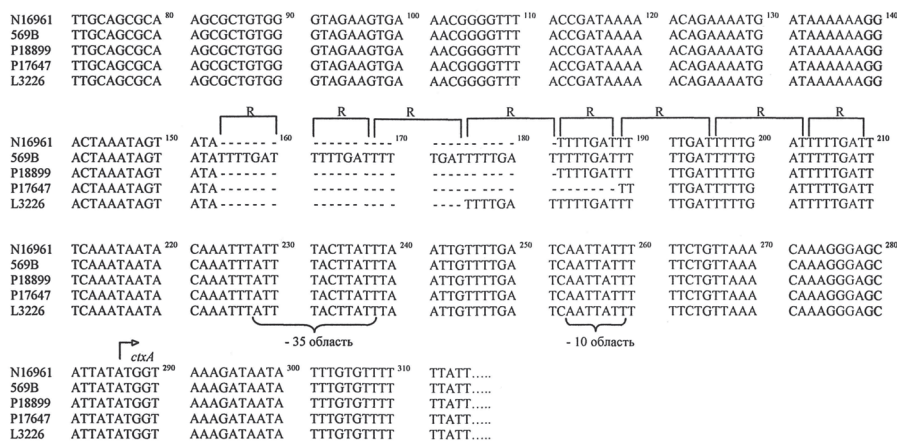


Рис. 2. Нуклеотидные последовательности промоторной области штаммов *V. cholerae*:

На рисунке обозначены TTTTGAT повторы (R), являющиеся сайтами связывания с регуляторным белком ToxR, а также -10 и -35 области. N16961 – референс-штамм эльтор биовара (последовательность взята из GenBank); 569B – штамм *V. cholerae* классического биовара; P18899 и L3226 – измененные варианты эльтор биовара

копий нуклеотидной последовательности TTTTGAT. Однако такая структурная организация промоторной области оперона *ctxAB* не влияла на уровень синтеза ХТ этими изолятами, у которых продукция этого белка не отличалась от других измененных вариантов (рис. 2, таблица). Следовательно, маловероятно, что повышенная продукция ХТ измененными вариантами *V. cholerae* биовара эльтор связана с копийностью изучаемых регуляторных элементов.

Таким образом, нами впервые получены данные о продукции ХТ измененными вариантами *V. cholerae* биовара эльтор, выделенными на территории России, количестве копий профага СТХФ, а также о нуклеотидной последовательности промоторной области их *ctxAB*-оперонов. Обнаружено, что измененные варианты действительно продуцируют заметно больше ХТ, чем типичные штаммы возбудителя холеры эльтор. При этом внедрение нового гена *ctxB* в геном профага СТХФ у большинства клонов сопровождается, видимо, изменением транскрипционной активности регуляторных генов, что приводит к активной продукции ХТ в нетипичных для холерных вибрионов эльтор условиях культивирования.

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 гг.)» и гранту РФФИ № 09-04-00217-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бароян О.В. Холера Эль-Тор. М.: Медицина; 1971. 256 с.
2. Гинцбург А.Л., Янишевский Н.В., Мотин В.Л., Шагинян И.А., Вертеев Ю.В., Смирнов Г.Б. Организация и клонирование структурных генов энтеротоксина *Vibrio cholerae* eltor RV79. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 1984; 9:12–8.
3. Лабораторная диагностика холеры. Методические указания МУК 4.2.2218-07. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007. 87 с.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984. 480 с.
5. 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. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2011; 3:11–8.
6. DiRita V.J., Neely M., Taylor R.K., Bruss P.M. Differential expression of the ToxR regulon in classical and El Tor biotypes of

*Vibrio cholerae* is due to biotype-specific control over *toxT* expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93(15):7991–5.

7. Ghosh-Banerjee J., Senoh M., Takahashi T., Hamabata T., Barman S., Koley H. et al. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor and classical biotypes. J. Clin. Microbiol. 2010; 48(11):4283–6.
8. Iwanaga M., Yamamoto K., Higa N., Ichinose Y., Nakasone N., Tanabe M. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. Microbiol. Immunol. 1986; 30(11):1075–83.
9. Kaper J.B., Morris J., Levin M. Cholera. Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8(1):48–89.
10. Lee J.H., Choi S.Y., Jeon Y-S., Lee H.R., Kim E.J., Nguyen B.M. et al. Classification of hybrid and altered *Vibrio cholerae* strains by CTX prophage and RS1 element structure. J. Microbiology. 2009; 47(6):783–8.
11. Mekalanos J.J. Duplication and amplification of toxin genes in *Vibrio cholerae*. Cell. 1983; 35(1):253–63.
12. Mekalanos, J.J., Swartz D.J., Pearson G.D.N., Harford N., Groyne F., de Wilde M. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. Nature. 1983; 306:551–7.
13. Miller V.L., Mekalanos J.J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. J. Bacteriol. 1988; 170(6):2575–83.
14. Nair G. B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.M., Safa A., Bhuiyan N.A. et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2006; 44:4211–3.
15. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. Trends Microbiol. 2010; 18(1):46–54.
16. Svennerholm A.M., Wiklund G. Rapid GM-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 1983; 17(4):596–600.

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

1. Baroyan O.V. [Cholera El Tor]. M.: Meditsina; 1971. P. 256.
2. Gintsburg A.L., Yanishevsky, N.V., Motin V.L., Shaginyan I.A., Vertiev Yu.V., Smirnov G.B. [Arrangement and cloning of *Vibrio cholerae* El Tor RV79 structure genes of enterotoxin]. Mol. Genet. Microbiol. Virusol. 1984; 9:12–8.
3. Laboratory diagnostics of cholera. MUK 4.2.2218-07. M.; 2007. 87 p.
4. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. [Molecular Cloning: A Laboratory Manual]. M.: Mir; 1984. 480 p.
5. Smirnova N.I., Goryaev A.A., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Lozovskiy Yu.V., Kutyrev V.V. [Genetic characterization of *Vibrio cholerae* strains emerging in Russian Federation during 7<sup>th</sup> cholera pandemic]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2011; 3:8–11.

Authors:

Zadnova S.P., Shashkova A.V., Krasnov Ya.M., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap1@microbe.ru

Об авторах:

Заднова С.П., Шашкова А.В., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap1@microbe.ru

Поступила 01.09.11.