

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ
АНАЛИЗ VIBRIO CHOLERAЕ НЕО1/НЕО139 СЕРОГРУПП,
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В Р. ВОЛГА САРАТОВСКОЙ
ОБЛАСТИ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 3 курса 331 группы
направления (специальности) _____
направления подготовки магистратуры 06.04.01 биология
код и наименование направления (специальности) _____
биологического факультета

наименование факультета, института, колледжа

Кусмарцевой Дарьи Леонидовны

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель
д-р биол. наук, доц.

УМ 26.11.25 Д.В. Уткин
подпись, дата

Консультант
ст. науч. сотр. лаб. патогенных вибрионов
отдела микробиологии
ФКУН Российский противочумный
институт «Микроб» Роспотребнадзора,
канд. мед. наук

НБ 26.11.25 Н.Б. Челдышова
подпись, дата

Заведующий кафедрой
д-р биол. наук, доц.

УМ 26.11.25 Д.В. Уткин
подпись, дата

Саратов 2025 год

Введение. Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп широко распространены в разных странах мира, являясь естественными обитателями водных экосистем. При попадании в организм человека данные штаммы могут быть причиной спорадических случаев и вспышек острых кишечных инфекций (ОКИ), а также отитов, раневых инфекций и септицемии [1,2]. В последнее время *Vibrio cholerae* неO1/неO139 серогрупп привлекают все большее и большее внимание ученых, в первую очередь, из-за их способности обуславливать именно септицемию у людей с ослабленным иммунитетом и хроническими заболеваниями. Поскольку заболевания, вызванные *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп, не подлежат обязательной регистрации, количество незарегистрированных случаев инфекции, вызванных данными возбудителями, точно неизвестно [3]. Стоит отметить, что указанные вибрионы широко распространены на территории Российской Федерации. Они ежегодно выделяются из открытых водоемов при проведении мониторинговых исследований на холеру, изредка от больных людей [4,5,6].

При изучении генетической организации штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп, выявляемых в РФ, установлено, что большинство изолятов не содержат профаг CTXφ с генами *ctxAB*, кодирующими биосинтез холерного токсина, присутствующий у токсигенных штаммов *V. cholerae*, вызывающих холеру. Отсутствует также остров патогенности VPI-1, включающий локус *tcpA-F*, кодирующий основной фактор колонизации – токсин-корегулируемые пили адгезии (ТКПА), и острова пандемичности VSP-I, VSP-II. В то же время данные вибрионы обладают достаточным количеством других детерминант патогенности, необходимых для развития инфекционного процесса. В том числе могут включать гены кластера токсина RTX, cholix-токсина, контакт-зависимых систем секреции 6 и 3 типов, гемолизина, протеаз, цитотонического токсина Cef, а также гены термостабильного прямого и родственного гемолизина (*tdh*, *trh*) *V.*

parahaemolyticus [7]. Необходимо отметить, что по составу генов, кодирующих указанные токсические вещества, штаммы, циркулирующие в РФ, соответствуют штаммам, выделяемых в других странах [8]. Изредка на территории РФ выделяются токсигенные штаммы *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп, имеющие ICE SXT элемент без генов антибиотикорезистентности [9]. Несмотря на активное выделение в различных регионах нашей страны штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп и их изучение, сведения о генетической организации данных штаммов, циркулирующих в открытых водоемах г. Саратова и области, отсутствуют.

Вид *Vibrio paracholerae* был официально зарегистрирован в 2022 году, хотя первые парахолерные вибрионы были выделены еще в 1916 году в Египте от британского солдата с холероподобной диареей. Термин парахолера был предложен в 1935 A.D. Gardner и K.V. Venkatraman, но относился ко всем представителям *V. cholerae*, которые не вызывали холеру, то есть к тем штаммам, которые мы в настоящее время называем *V. cholerae* неO1/неO139 или НАГ-вибрионами. Современные парахолерные штаммы не относятся к НАГ-вибрионам, а представляют отдельный вид *V. paracholerae*. Показано, что данные вибрионы циркулируют совместно с возбудителем холеры в таких эндемичных по холере странах как Бангладеш, Мозамбик, Гаити, а также выделяются и на неэндемичных территориях (Сербия, США, Бразилия) [10, 11]. Несмотря на активное изучение штаммов *V. paracholerae*, выделяемых в разных странах, сведения об обнаружении данных вибрионов на территории Российской Федерации в литературе отсутствуют.

Цель исследования – проведение комплексного исследования штаммов *Vibrio cholerae* неO1/неO139 серогрупп, выделенных из р. Волги Саратовской области.

Задачами являются:

1. Проведение сравнительного филогенетического анализа для определения родственных связей изучаемых изолятов *V. cholerae* неO1/неO139

серогрупп и идентификация штаммов *V. paracholerae*.

2. Исследование генетической организации штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп и *V. paracholerae* с целью выявления и оценки степени сохранности маркерных генов вирулентности и адаптации.
3. Оценка способности штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп и *V. paracholerae*, выделенных в 2024 году из водных объектов Саратовской области, к формированию биоплёнки, изучение их подвижности и ферментативной активности (гемолизин, протеаза, фосфолипаза).
4. Анализ фенотипических и генетических различий *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп и *V. paracholerae*.

Материалы и методы. В ходе исследования культивирование штаммов осуществляли на бульоне и агаре Luria – Bertani (LB), щелочной агар, агар Хоттингера (рН 7,6) при 30 - 37 °С в течении 6-24 ч. Были определены следующие фенотипические свойства: образование биопленки [12], гемолитическая активность [13], фосфолипазная активность [14], протеазная активность [15]. Выделение и очистку геномной ДНК производили с использованием коммерческого набора Axy Prep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit в соответствии с протоколами производителей и МУ 1.3. 2569-09. Филогенетический анализ осуществляли с помощью сервера REALPHY, полученные результаты визуализировали на платформе iTOL. Секвенирование проводили на платформе GI DNBSEQ-G50. Для биоинформационного анализа применяли находящиеся в свободном доступе программы BLAST и BioEdit.

Магистерская работа построена по традиционному плану, изложена на 76 страницах, состоит из введения, главы обзора литературы, материалов и методов, семи глав собственных исследований, заключения и выводов. Иллюстрирована 7 таблицами и 12 рисунками. Список использованной литературы содержит 125 источников.

Основное содержание работы. В ходе мониторинговых исследований в 2024 году был выделен 21 штамм. На щелочном агаре и агаре Хоттингера (рН 7,4) штаммы образовывали круглые, гладкие, прозрачные с ровным краем колонии, в бульоне – помутнение и нежную голубоватую пленку на поверхности. По результатам биохимических тестов (продукция индофенолоксидазы, ферментация сахарозы, лактозы, глюкозы в среде Хью-Лейфсона, декарбоксилирование лизина, образование индола) выделенные штаммы были отнесены к *V. cholerae*. Штаммы не агглютинировались O1 и O139 диагностическими сыворотками и не содержали генов *ctxA* и *tcpA*. В итоге при комплексном анализе изолированные штаммы были идентифицированы как нетоксигенные *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп.

Филогенетический анализ. С целью установления родственных связей изучаемых штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп, а также выявления среди исследуемых изолятов *V. cholerae* неO1/неO139 серогруппы представителей вида *V. paracholerae* был проведён филогенетический анализ 60 штаммов. В таблице 7 представлены данные по 34 штаммам *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп, выделенным в различных странах, включая Россию, 3 нетоксигенным штаммам *V. cholerae* O1 Эль Тор, а также 23 изолятам *V. paracholerae*.

Филогенетический анализ показал, что НП 5 из 21 штамма, выделенного из р. Волги в 2024 г. (№5-2 0207, №3 1808, №6 2207, №5 2207, №5 3007), а также НП штаммов *V. paracholerae*, взятые из базы данных NCBI GenBank, сформировали на филогенетическом дереве отдельный кластер. Оставшиеся штаммы *V. cholerae* неO1/неO139 2024 года выделения, образовали единый кластер с НАГ-вибрионами, НП которых были взяты из базы данных NCBI GenBank. Полученные данные могут указывать на принадлежность указанных 5 штаммов, выделенных в р. Волге в 2024 г. к виду *V. paracholerae*. Наиболее близкими по генетической структуре к указанным изолятам оказались штаммы *V. paracholerae*, выделенные в

Бангладеш (2016), США (2017), Гаити (2010), Мозамбике (2008) и Таиланде (1992).

Установлено филогенетическое родство выявленных изолятов со штаммами *V. paracholerae*, ранее изолированными в Бангладеш (2016), США (2017), Гаити (2010), Мозамбике (2008) и Таиланде (1992), может свидетельствовать об их завозном происхождении. В качестве потенциальных путей попадания в Саратовскую область могут рассматриваться международные и межрегиональные транспортные потоки, включая судоходство по реке Волге, где возможна трансмиссия вибрионов через балластные воды. Немаловажным фактором может выступать сброс неочищенных или недостаточно очищенных сточных вод в акваторию, особенно вблизи мест массового отдыха. Также нельзя исключать миграцию населения и ввоз продукции из регионов с эндемичных территорий. С учётом географического положения и открытости региона к внешним водным и логистическим каналам, полученные данные подчёркивают необходимость постоянного микробиологического мониторинга водоемов Саратовской области с учётом возможных заносов патогенов.

Молекулярно-генетическая характеристика природных изолятов *V. cholerae* неO1/неO139, выделенных из водоёмов Саратовской области.

При изучении генетической организации штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп, выявляемых в РФ, установлено, что изоляты не содержат профага СТХф с генами *ctxA-B*, кодирующими биосинтез холерного токсина, присутствующий у токсигенных штаммов *V. cholerae*, вызывающих холеру. Отсутствует также остров патогенности VPI-1, включающий локус *tcpA-F*, кодирующий основной фактор колонизации – токсин-корегулируемые пили адгезии (ТКПА), и острова пандемичности VSP-I, VSP-II. В то же время ряд вибрионов обладает достаточным количеством других детерминант патогенности, необходимых для развития инфекционного процесса. В том числе они могут включать гены кластера токсина RTX, контакт-зависимых систем секреции 6 и 3 типов, гемолизина, гены *toxR* и *toxS* играющих

ключевую роль в контроле экспрессии генов вирулентности у *V. cholerae*, а также гены нейраминидазы (*nanH*), гемолизина *hlyA* и локуса, кодирующего биосинтез маннозочувствительных пилей адгезии (MSHA). Кроме того, у штаммов было обнаружено наличие гена *cas3*, входящего в состав CRISPR-cas системы. Необходимо отметить, что по составу генов, кодирующих указанные токсические вещества, штаммы, циркулирующие в РФ, соответствуют штаммам, выделяемых в других странах.

Оценка фенотипических признаков, определяющих экологическую устойчивость и вирулентный потенциал *V. cholerae* неO1/неO139 в природных водоёмах. Одним из ключевых аспектов экологической устойчивости *V. cholerae* является способность к формированию биоплёнок — мультиклеточных структур, обеспечивающих выживание бактерий в неблагоприятных условиях внешней среды. Полученные в ходе работы данные свидетельствуют о способности исследованных природных штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп, циркулирующих в реке Волге, формировать биопленку. Согласно результатам, значения оптической плотности при 570 нм варьировали в пределах от 0,61 до 3,2, что отражает выраженную вариабельность образования биоплёнки у исследованных штаммов. Такие различия между штаммами по биопленкообразованию могут быть связаны с различиями в структуре или экспрессии генов, продукты которых участвуют в формировании биопленки.

При проведении исследований было установлено, что все штаммы были подвижными. При этом диаметр зоны роения бактерий на 0,3% агаре варьировал от 6 до 36 мм, что свидетельствует о широком диапазоне значений подвижности между штаммами. Большинство изолятов демонстрировали высокую степень подвижности (диаметр зоны >25 мм), что соответствует известным физиологическим свойствам *V. cholerae*, обладающих одним полярным жгутиком, обеспечивающим эффективную подвижность в водной среде и при колонизации слизистых оболочек.

Далее была изучена способность изучаемых штаммов к продукции

дополнительных факторов патогенности. Наибольшее внимание было уделено биосинтезу гемолизина, фосфолипазы и протеазы, как ключевых факторов патогенности штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп. В качестве контрольного использовали штамм *V. cholerae* 569B O1 серогруппы классического биовара биосинтез данных факторов у которого изучен достаточно детально.

Зоны гемолитической активности варьировали от 1 до 8 мм, что свидетельствует о разной степени экспрессии или эффективности *hlyA* среди штаммов. Наибольшая гемолитическая активность (8 мм) наблюдалась у штамма N5 0608 и штамма N3 1808, что может указывать на высокую экспрессию либо гена *hlyA*, кодирующего биосинтез гемолизина HlyA, либо регуляторных генов, контролирующих его продукцию, например *hlyU* [16]. У ряда штаммов зарегистрирована низкая продукция гемолизина (1 мм), что, возможно, связано с изменением структуры *hlyA* или дефектами секреции.

Продукция протеазы составляла от 0 до 5 мм, наибольший биосинтез данного фермента отмечен у штамма N3 1808.

Биосинтез фосфолипазы был обнаружен у всех исследованных штаммов, но при этом активность данного фермента была незначительная, зоны лизиса составляли 1 мм.

Анализируя полученные данные, можно высказать предположение, что наиболее вирулентными являются штаммы N5 0608 и N4 1808, обладающие максимальной гемолитической и протеазной активностью. Такие изоляты в случае попадания в организм человека со слабым иммунитетом или хроническими заболеваниями могут вызвать инфекционный процесс, как это наблюдалось в описанных эпидемиологических случаях.

Сравнительный анализ фенотипических и генетических свойств штаммов *V. paracholerae* и *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп. Одной из проблем, выявленной в ходе исследования, являлась трудность дифференциации *V. paracholerae* от штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп при проведении микробиологического изучения. Оба вида

демонстрируют схожие морфологические, культуральные и биохимические характеристики, включая рост на твердых питательных средах (щелочном и агаре Хоттингера, pH 7,6), продукцию индофенолоксидазы, ферментацию сахарозы, лактозы, глюкозы в среде Хью-Лейфсона, декарбоксилирование лизина, образование индола. Холерные и парачолерные вибрионы так же были подвижными, синтезировали ферменты патогенности и способны формировать биопленку на абиотической поверхности. Представленные данные указывают на то, что данные вибрионы являются трудноотличимыми в стандартных лабораторных условиях.

Дополнительную сложность создаёт наличие у обоих видов одинаковой генетической характеристики и присутствие генов факторов вирулентности, обычно проверяемых у выделяемых при мониторинговых исследованиях штаммов, включая присутствие *hlyA*, *toxR*, *toxS*, *rtxC*. Кроме того, ген *ompW* считается молекулярным маркером для идентификации вида *V. cholerae* и широко используется для его дифференциации от других видов рода *Vibrio* [17]. Однако в ходе исследования было выявлено наличие *ompW* и у штаммов *V. paracholerae*, что ставит под сомнение его специфичность и ограничивает применение данного гена в качестве диагностического критерия. Все перечисленные гены играют важную роль в патогенезе, устойчивости к внешним условиям и адаптации к среде обитания. Их присутствие в геномах обоих видов может привести к ошибочной классификации *V. paracholerae* как *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп.

Однако *V. paracholerae* отличается от *V. cholerae* рядом уникальных метаболических способностей и физиолого-биохимических признаков. В частности, штаммы *V. paracholerae* способны продуцировать амилазу и пектиназу, ферменты, расщепляющие соответственно α -циклодекстрин и пектин. При этом данный признак отсутствует у *V. cholerae* [10]. Кроме того, лишь около 25 % изученных штаммов *V. paracholerae* способны использовать D-маннозу в качестве единственного источника углерода, в то время как большинство штаммов *V. cholerae* способны её ферментировать. Эти

различия могут служить потенциальными биохимическими критериями для видовой дифференциации при наличии специализированных условий культивирования. Помимо фенотипических различий, между двумя видами выявлен ряд генетических отличий, включая вариации метаболических путей, которые также могут быть использованы в диагностических целях. В частности, *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп характеризуется присутствием генов, кодирующих глутатион-регулируемый калиевый насос (кластеры *vc2606–vc2607*), обеспечивающий адаптацию к условиям ионного и окислительного стресса в окружающей среде. Эти гены полностью отсутствуют у проанализированных штаммов *V. paracholerae*, что позволяет рассматривать данный признак как видоспецифичный.

Кроме того, ключевым отличием служит наличие у *V. cholerae* *Tor*-оперона – генного кластера, участвующего в восстановительном метаболизме триметиламина N-оксида в условиях ограниченного кислорода [18]. У *V. paracholerae* данный оперон отсутствует, что указывает на различия в энергетическом метаболизме и может рассматриваться как диагностически значимое различие между видами.

Сравнительный анализ подтвердил видовую обособленность *V. paracholerae* от *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп, несмотря на их фенотипическое и генетическое сходство. Выявленные отличия в метаболических путях и составе генетических детерминант обеспечивают основу для их надёжной дифференциации. С учётом эпидемиологической значимости *V. paracholerae* и его способности персистировать в водной среде, данное направление требует дальнейшего изучения.

Заключение. В условиях глобальных климатических изменений и возрастающей антропогенной нагрузки увеличивается ареал распространения и случаи выделения потенциально патогенных микроорганизмов из природных водоёмов, включая *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп.

Результаты проведённого исследования демонстрируют, что акватория

реки Волги представляет собой важный природный резервуар разнообразных по генетическому и фенотипическому признаку форм *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп. Изоляты, полученные в ходе мониторинга 2024 года, продемонстрировали значительную гетерогенность по уровню экспрессии факторов патогенности. Установлено наличие высоковариабельных признаков, определяющих экологическую устойчивость и потенциальную патогенность, таких как подвижность, секреция ферментов, способность формировать биопленку.

Особое значение имеет факт выявления в исследуемом материале пяти изолятов *V. paracholerae*. До настоящего времени данные о циркуляции парахолерных вибрионов на территории Российской Федерации отсутствовали. Обнаружение штаммов *V. paracholerae* в зонах сброса сточных вод и рекреационного водопользования реки Волги указывает на возможное завозное происхождение и адаптацию к локальной водной среде. Полученные результаты указывают на необходимость включения *V. paracholerae* в спектр объектов молекулярно-эпидемиологического надзора.

Таким образом, проведённая работа расширяет представление о биоразнообразии вибрионов в водных экосистемах и подчёркивает важность комплексного исследования нетоксигенных форм *V. cholerae*.

ВЫВОДЫ

1. При проведении филогенетического анализа выявлено, что 5 из 21 исследованного штамма (N5-2 0207, N3 1808, N6 2207, N5 2207, N5 3007) относятся к новому виду *V. paracholerae*, которые ранее относились к *V. cholerae* неO1/неO139. Данные штаммы были впервые выделены и изучены на территории РФ. Последующее изучение генетической организации изолятов подтвердило их принадлежность к данному виду. Установлено, что все штаммы *V. paracholerae* и ряд штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогруппы демонстрирует высокое генетическое сходство с изолятами, циркулирующими в эндемичных по холере регионах, что может свидетельствовать о вероятном завозном происхождении этих

штаммов.

2. При исследовании генетической организации штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп и *V. paracholerae* доказано отсутствие мобильных генетических элементов, связанных с вирулентностью, пандемичностью и антибиотикорезистентностью. В тоже время у всех изолятов обнаружены гены *toxR/toxS*, *hlyA*, системы секреции 6 типа, что может свидетельствовать о сохранении активности дополнительных генов вирулентности и их регуляции.
3. Проведено комплексное изучение штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогруппы и *V. paracholerae*, выделенных в 2024 году из реки Волги в районе г. Саратова. При фенотипическом анализе установлено, что штаммы являются подвижными, продуцируют гемолизин, ферменты патогенности – протеазу и фосфолипазу, а также обладают способностью формировать биопленку на абиотической поверхности.
4. Обнаружено, что у штаммов *V. paracholerae*, в отличие от *V. cholerae* отсутствуют два локуса (*vc1692-1694* и *vc1719-1720*) «оперона *Tor*», ответственных за регуляцию генов вирулентности, и два гена (*vc2606*, *vc2607*), входящих в локус, кодирующий формирование глутатион регулируемой калиевой помпы, имеющиеся у всех штаммов *V. cholerae*. Среди фенотипических свойств различий не выявлено.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteraemia: case report and literature review / S. Deshayes [et al.] // *SpringerPlus*. – 2015. – V.4. – P.575.
- 2 Zhang, Q Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholera* — An Underestimated Foodborne Pathogen An Overview of Its Virulence Genes and Regulatory Systems Involved in Pathogenesis / Q. Zhang, T. Alter, S. Fleischmann // *Microorganisms*. – 2024. – V.4, №12. – P.818.
- 3 Global emergence of environmental non-O1/O139 *Vibrio cholerae* infections linked with climate change: a neglected research field / L. Vezzulli [et al.] // *Environmental microbiology*. – 2020. – V. 22, №. 10. – P. 4342-4355.
- 4 Монахова, Е.В. Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире /Е.В. Монахова, И.В. Архангельская // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016, № 2. С. 14–23.
- 5 Клинические штаммы холерных вибрионов неО 1/неО 139 серогрупп в России: динамика выделения, серологическая принадлежность, генетические особенности / И.В. Архангельская [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2021. - Т.11, №1. – С.52-56.
- 6 Молекулярно-генетическая характеристика штамма *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 — возбудителя нового случая острой кишечной инфекции в Ростове-на-Дону / Е.В. Монахова [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т.12, №6. – С. 1156–1162.
- 7 Генетическая неоднородность популяции *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, циркулирующих в Ростовской области. / И.В. Архангельская [и др.] // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. № 3. – С. 264.
- 8 Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. / M. Dziejman [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – V. 102, №9. – P. 3465-3470.

9 Фадеева А. В. и др. Анализ SXT констина
антибиотикочувствительного штамма *Vibrio cholerae* неO1/неO139
серогруппы //Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – №. 3. – С. 102-
103.

10 Population analysis of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs reveals a
novel sister species (*Vibrio paracholerae* sp. nov.) with a history of association
with humans. / M.T. Islam [et al.] // *Applied and environmental microbiology*. –
2021. – V. 87, №. 17. – P. e00422-21.

11 Morgado, S.M. *Vibrio cholerae* and *Vibrio paracholerae* bacteraemia
strains encompass lineages that share resistome and virulome profiles / S.M.
Morgado, E.L. Fonseca, A.C.P. Vicente // *Memorias de Instituto Oswaldo Cruz*. –
2025. – V. 120. – P. e240159.

12 Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El tor galU and galE mutants:
influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation / J.
Nesper [et al.] // *Infection and immunity*. – 2001. – V. 69, №. 1. – P. 435-445.

13 Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-
O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates / D.
V. Singh [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – V. 67, №.
2. – P. 910-921.

14 Tan, N.H. Acidimetric assay for phospholipase A using egg yolk
suspension as substrate / N.H. Tan, C.S. Tan // *Analytical biochemistry*. – 1988. –
V. 170, №2. – P. 282-288.

15 *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence,
and detachment / R. A. Finkelstein [et al.] // *Infection and immunity*. – 1992. – V.
60, №. 2. – P. 472-478.

16 Expression of hemolysin is regulated under the collective actions of
HapR, Fur, and *HlyU* in *Vibrio cholerae* El Tor serogroup O1 / H. Gao [et al.] //
Frontiers in Microbiology. – 2018. – V. 9. – P. 1310.

17 Molecular characterization of a new variant of toxin-coregulated pilus
protein (TcpA) in a toxigenic non-O1/non-O139 strain of *Vibrio cholera* / B. Nandi

[et al.]// Infect Immun. – 2000. – V. 68. – P. 948–952.

18 Activation of cholera toxin production by anaerobic respiration of trimethylamine N-oxide in *Vibrio cholerae* / K. M. Lee [et al] //Journal of Biological Chemistry. – 2012. – V. 287, №. 47. – P. 39742-39752.

Handwritten signature