



## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ КАК СОСТАВЛЯЮЩЕЙ ПЕРСИСТЕНЦИИ *VIBRIO CHOLERAЕ* В ВОДОЕМАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

© С.В. Титова, Е.В. Монахова, Л.П. Алексеева, Р.В. Писанов

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора,  
Ростов-на-Дону

Для цитирования: Титова С.В., Монахова Е.В., Алексеева Л.П., Писанов Р.В. Молекулярно-генетические основы биопленкообразования как составляющей персистенции *Vibrio cholerae* в водоемах Российской Федерации // Экологическая генетика. — 2018. — Т. 16. — № 4. — С. 23–32. doi: 10.17816/ecogen16423-32.

Поступила: 27.07.2018

Одобрена: 11.12.2018

Принята: 25.12.2018

☼ Широкое распространение *Vibrio cholerae* в эндемичных странах определяет риски их заноса на территорию Российской Федерации. Токсигенные (содержащие гены холерного токсина *ctxAB*) штаммы вызывают эпидемические вспышки холеры, нетоксигенные (*ctxAB*-) — единичные либо множественные случаи холероподобной диареи. Изучение их способности к выживанию в объектах окружающей среды в климатических условиях средних широт за счет формирования биопленок актуально для оценки потенциальных угроз здоровью населения. Нами проведено определение сроков образования биопленок на абиотических поверхностях в микрокосмах в сочетании с биоинформатическим анализом генов, ответственных за продукцию пилей MSHA (*msh*), полисахаридов (*ups*) и белков (*rbm*) матрикса, а также ряда регуляторов. Изученные 15 штаммов различались по срокам формирования биопленки, что коррелировало со структурой отдельных генов и их кластеров. Штаммы, не имеющие существенных отклонений от прототипа, формировали зрелую биопленку за 5–7 суток, тогда как содержащие усеченные гены *mshL*, *mshN*, *rbmC* — только за 13, а у штамма с усеченным геном положительного регулятора *upsR* созревание биопленки не завершалось. Сокращение сроков до 2–3 суток было связано с повреждением гена отрицательного регулятора *hapR* либо с наличием измененных кластеров *msh* и *ups-rbm*. Анализ генетических детерминант биопленкообразования может быть использован для оценки способности возбудителей к выживанию в водоемах России и потенциальной опасности последних как источников инфекции.

☼ **Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*; биопленка; персистенция; последовательности ДНК; биоинформатический анализ.

## MOLECULAR GENETIC BASIS OF BIOFILM FORMATION AS A COMPONENT OF *VIBRIO CHOLERAЕ* PERSISTENCE IN WATER RESERVOIRS OF RUSSIAN FEDERATION

© S.V. Titova, E.V. Monakhova, L.P. Alekseeva, R.V. Pisanov

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia

For citation: Titova SV, Monakhova EV, Alekseeva LP, Pisanov RV. Molecular genetic basis of biofilm formation as a component of *Vibrio cholerae* persistence in water reservoirs of Russian Federation. *Ecological genetics*. 2018;16(4):23-32. doi: 10.17816/ecogen16423-32.

Received: 27.07.2018

Revised: 11.12.2018

Accepted: 25.12.2018

☼ **Background.** The problem of cholera remains acute for world health service and risks of importation of *Vibrio cholerae* strains from endemic countries to Russia do exist. Toxigenic strains (carrying cholera toxin genes *ctxAB*) can cause epidemic outbreaks of cholera and non-toxigenic (*ctxAB*-) — single or multiple cases of cholera-like diarrhea. Investigation of their ability to survive in water reservoirs in climatic conditions of middle latitudes by means of forming biofilms is essential for potential threat evaluation. **Materials and methods.** Biofilm formation by 15 *V. cholerae* strains on abiotic surfaces was studied in microcosms with tap water and cover glasses. Identification of responsible genetic determinants in whole genome sequences and bioinformatics analysis were performed using BioEdit 7.2.5, BLASTN 2.2.29, Blastp and Vector NTI Advance 11 software. **Results.** The strains investigated differed in terms of biofilm formation which correlated with structural features of genes for MSHA pili (*msh*), matrix polysaccharides (*ups*) and proteins (*rbm*) as well as for certain regulatory factors. Strains with none or few genetic deviations from prototypes formed mature biofilms in 5-7 days while those containing truncated genes *mshL*, *mshN*, *rbmC* — only in 13 days. One strain with truncated gene for positive regulator *upsR* formed an immature biofilm. Acceleration of the process in some strains up to 2-3 days correlated with either truncated gene *hapR* (negative regulator) or altered structure of both *msh* and *ups-rbm* gene clusters. **Conclusion.** Analysis of genetic determinants responsible for biofilm formation may be used for prediction of *V. cholerae* ability to survive in environmental objects of Russia and thus the potential danger of the latter as sources of infection.

☼ **Keywords:** *Vibrio cholerae*; biofilm; persistence; DNA sequences; bioinformatics analysis.

## ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы вида *Vibrio cholerae* (Pacini 1854) — возбудители холеры, особо опасной кишечной инфекции, передающейся от человека к человеку водным либо пищевым путем. Проблема холеры остается достаточно острой для мирового здравоохранения, в особенности в связи с формированием и стремительным распространением новых генетически измененных штаммов, сочетающих в себе признаки двух различающихся по структуре геномов биоваров — Эль Тор и классического — и обладающих повышенным эпидемическим потенциалом [1, 2]. В первую очередь это касается эндемичных территорий с жарким климатом и слабым санитарно-гигиеническим обеспечением. Однако в связи с интенсивной миграцией населения (туризм, паломничество, бизнес, культурные связи и т. п.) и в таких странах, как Россия, имеющих умеренный климат и развитую систему здравоохранения, существуют риски заноса возбудителя и возникновения эпидосложнений. В комплексе факторов патогенности холерных вибрионов центральное место принадлежит холерному токсину, кодируемому генами *ctxAB* в составе профага CTX [2, 3]. С этим фактором связана эпидемическая опасность возбудителя. Штаммы, не содержащие *ctxAB*, считаются эпидемически безопасными. Вместе с тем многие нетоксигенные (*ctxAB*-) штаммы способны вызывать спорадические случаи и локальные вспышки заболеваний различной степени тяжести — от слабой и умеренной диареи до тяжелых форм, клинически неотличимых от типичной холеры, за счет экспрессии генетических детерминант целого ряда дополнительных факторов патогенности [3, 4]. Холерные вибрионы, периодически выделяемые от больных и из объектов окружающей среды (ООС) на территориях РФ [1, 2, 5], являются, как правило, заносными из эндемичных по холере стран. Несмотря на то что климатические условия большинства регионов нашей

страны неблагоприятны для длительной персистенции *V. cholerae*, они могут сохраняться в ООС в течение некоторого времени [5, 6]. Поэтому актуальной представляется оценка не только их эпидемического и патогенетического, но и персистентного потенциала, обеспечивающего им сохранение в ООС РФ и пограничных стран. Одну из ключевых ролей в персистенции играет способность к формированию биопленок. Этот сложный многоступенчатый процесс зависит от экспрессии множества генов, среди которых наибольшее значение придают кластерам *msh*, *vps* и *rbm* [7, 8]. Кластер *msh* включает 17 генов, организованных в два оперона — *mshHIJKLMNIJ*, кодирующий секреторные белки, и *mshBACDOPQ*, ответственный за синтез структурных компонентов (субъединиц) пилей MSHA [9], которым принадлежит ведущая роль в адгезии на первом этапе биопленкообразования. Формирование матрикса зависит от продуктов обеспечивающих синтез полисахаридов (VPS) и белков генов, организованных в три сцепленных кластера: *vps-I (vpsUABCDEFGYIJK)*, *vps-II (vpsLMNOPQ)* и находящийся между ними *rbm (rbmABCDEF)*. Кроме того, в процесс вовлечены продукты ряда структурных и регуляторных генов, расположенных за пределами указанных кластеров [10, 11]. Изучение их структуры и биоинформатический анализ продуктов трансляции в сочетании с фенотипическим определением способности к формированию биопленок позволяют судить о функциональном состоянии данных факторов и о потенциальной возможности более или менее длительного сохранения возбудителя в ООС, что и стало предметом настоящего исследования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили 15 штаммов *V. cholerae* (10 токсигенных и 5 нетоксигенных), выделенных от людей и из ООС на территориях РФ и некоторых бывших республик СССР (табл. 1).

Таблица 1

Table 1

### Характеристика исследуемых штаммов *V. cholerae*

#### Characteristics of *V. cholerae* strains under investigation

Штамм / Strain	Место выделения / Isolation territory	Источник / Source	Год / Year	<i>ctxAB</i>	Биовар / Biotype
569В	Индия / India	Неизвестен / Unknown	1948	+	class.
P-17917	Ростов-на-Дону / Rostov-on-Don	Речная вода / River water	1999	+	class.
P-5879	Таганрог / Taganrog	Труп больного / Defunct patient	1972	+	ET
P-18252	Ростов-на-Дону / Rostov-on-Don	Сточные воды / Sewage	2000	+	ET
P-18367	Ростов-на-Дону / Rostov-on-Don	Сточные воды / Sewage	2001	+	ET-alt

Окончание табл. 1 (Table 1 continued)

Штамм / Strain	Место выделения / Isolation territory	Источник / Source	Год / Year	<i>ctxAB</i>	Биовар / Biotype
P-18368	Ростов-на-Дону / Rostov-on-Don	Речная вода / River water	2001	+	ET-alt
18329	Казань / Kazan	Больной / Patient	2001	+	ET-alt
18336	Казань / Kazan	Больной / Patient	2001	+	ET-alt
P-18588	Ростов-на-Дону / Rostov-on-Don	Речная вода / River water	2003	+	ET-alt
P-19241/301	Ростовская область / Rostov region	Морская вода / Sea water	2011	+	ET-alt
P-19613/81	Ростов-на-Дону / Rostov-on-Don	Речная вода / River water	2014	+	ET-alt
14156	Азербайджан / Azerbaijan	Больной / Patient	1989	–	ET
14863	Одесская область / Odessa region	Больной / Patient	1991	–	ET
5392	Донецкая область / Donetsk region	Речная вода / River water	1972	–	ET
19308	Астраханская область / Astrakhan region	Речная вода / River water	2012	–	ET
P-19787/434	Сочи / Sochi	Речная вода / River water	2015	–	ET

Примечание: class. — классический биовар, ET — Эль Тор, alt — генетически измененный штамм.

Note: class. — classical biotype, ET — El Tor, alt — genetically altered strain.

Для сравнения в анализ был включен штамм 569В — типичный представитель классического биовара. Штаммы были получены из коллекции Музея живых культур с Центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора.

Способность к образованию биопленок на абиотических объектах (покровных стеклах) изучали в микрокосмах [12]. В 100 мл флаконы устанавливали спиралевидное устройство с покровными стеклами и вносили в них взвеси суточных агаровых культур холерных вибрионов в стерильной водопроводной воде в конечной концентрации  $10^2$  микробных клеток в 1 мл (рис. 1).

Флаконы инкубировали при 25 °С, что соответствовало температуре в водоемах средних широт в летнее время. Через определенные промежутки времени стекла извлекали стерильным пинцетом, трижды промывали их в физиологическом растворе, фиксировали в течение 30 мин в 96 % этаноле, затем окрашивали 1 % водным раствором Конго красного (ООО «ЭКОХИМ», Россия) в течение 15 мин для выявления VPS матрикса [13]. Для визуализации вибрионов мазки докрашивали карболовым фуксином (10 мл насыщенного спиртового раствора фуксина, 90 мл 5 % карболовой кислоты) в течение 5–6 мин, промывали водопроводной водой,

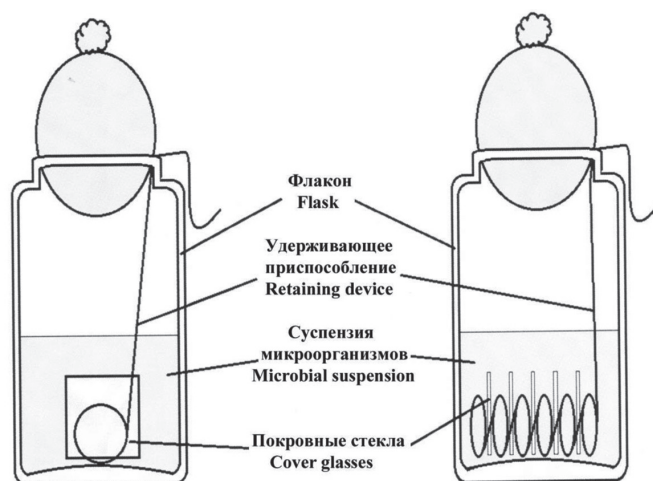


Рис. 1. Схема микрокосма для изучения образования биопленок *V. cholerae*

Fig. 1. Scheme of a microcosm for studies of biofilm formation by *V. cholerae*

высушивали, помещали на предметное стекло и просматривали в световом микроскопе в диапазоне увеличения  $7 \times 90$ ,  $9 \times 90$ . Стадии образования биопленки определяли по наличию адгезии вибрионов к стеклам (I стадия), скоплениям микробных клеток (II), монослоя

и VPS матрикса (III), конгломератов клеток, погруженных в интенсивно окрашенный матрикс (IV). Все опыты выполнены в трехкратной повторности.

Полногеномное секвенирование ДНК проводили на платформе MiSeq (Illumina) согласно прилагаемому протоколу. Библиотеки готовили с использованием набора Nextera DNA Library Prep Kit (Illumina), первичные данные секвенирования (парные риды размером 250 п. н., среднее покрытие N48), полученные с помощью набора MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina), оценивали при помощи программы FastQC ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc)). Для тримминга использовали алгоритм Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>) [14]. После проведения тримминга объем первичных данных был сокращен на 20 %. Средний размер контигов после сборки с применением программы ABySS (<http://www.bcgsc.ca/platform/bioinfo/software/abyss>) [15] составил 120 т. п. н.

Отдельные гены и их кластеры идентифицировали в полных геномах с помощью программ BLASTN2.2.29 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) и BioEdit 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit>). Трансляцию генов, сравнительный анализ их нуклеотидных последовательностей и аминокислотных последовательностей их продуктов осуществляли с использованием пакета программ Vector NTI Advance 11 (Invitrogen). Прототипами служили соответствующие последовательности референс-

штамма *V. cholerae* N16061 (AE003852, AE003853). Для определения наличия и локализации активных доменов в белках, а также выявления их гомологов у штаммов из других регионов мира выполняли Blast-анализ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Собранные сиквенсы генов кластеров, подвергнутых анализу, депонированы в базе данных NCBI GenBank под номерами: MG551931–MG551946 (*msh* clusters), MF498890, MF498891, MG521386–MG521402 (*vps-rbm*-clusters).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В приведенных выше условиях эксперимента испытываемые штаммы *V. cholerae* различались по скорости образования биопленки. У большинства первая стадия адгезии к стеклам происходила в течение суток, у одного — на третьи и у трех — на пятые сутки, тогда как сроки созревания биопленки отличались гораздо большим разнообразием (табл. 2). У одного штамма процесс останавливался на III стадии.

Таким образом, все штаммы были способны к адгезии на абиотических поверхностях и почти все — к формированию зрелой биопленки; межштаммовые различия касались сроков, от которых может зависеть конкурентоспособность микроорганизмов в ООС. Поэтому мы предприняли попытку найти коррелятивные связи между этими сроками и структурой соответствующих генетических детерминант (см. табл. 2).

Таблица 2

Сроки прохождения стадий образования биопленки штаммами *V. cholerae* (сут) и наличие у них отклонений в структуре ответственных за этот процесс генов

Table 2

Periods of stages of biofilm formation by *V. cholerae* strains (days) and presence of deviations in the structure of responsible genes

Штамм / Strain	Стадии биопленкообразования / Stages of biofilm formation				Гены, существенно отличные от прототипов / Genes significantly different from prototypes	
	I	II	III	IV	Измененные / Altered	Усеченные / Truncated
569B	5	5	11	12	<i>vpsP</i>	<i>vpsE</i> , <i>vpsQ</i>
P-17917	1	2	2	2	<i>vpsP</i>	<i>mshO</i> , <i>vpsE</i> , <i>vpsQ</i> , <i>hapR</i> , <i>cdgA</i>
P-5879	1	3	7	12	—	<i>rbmC</i>
P-18252	1	2	5	5	—	<i>cdgA</i>
P-18367	1	2	5	7	—	—
P-18368	1	2	5	5	—	—
18329	1	2	3	7	—	—
18336	3	3	7	—	—	<i>vpsR</i>
P-18588	1	2	5	5	<i>cdgL</i>	—
P-19241/301, P-19613/81	1	2	5	5	—	—
14156	5	5	12	13	—	<i>mshQ</i> , <i>rbmB</i> , <i>rbmC</i> , <i>cdgA</i>
14863	5	5	12	13	<i>vpsU</i> , <i>vpsD</i>	<i>mshL</i> , <i>mshN</i> , <i>vpsH</i> , <i>vpsI</i> , <i>vpsJ</i> , <i>rbmB</i>
19308, P-19787/434	1	2	3	3	<i>mshA</i> , <i>mshC</i> , <i>mshD</i> , <i>mshQ</i> , <i>vpsF</i> , <i>vpsU</i> , <i>vpsD</i>	<i>vpsH</i> , <i>vpsI</i> , <i>vpsJ</i> , <i>rbmB</i>
5392	1	2	4	5	<i>mshH</i>	—

У токсигенных штаммов кластеры *msh* существенно не отличались от прототипа, и адгезия большинства к стеклам происходила в течение суток. Однако обращает на себя внимание неожиданно быстрая адгезия классического штамма P-17917 (1 сут), в отличие от использованного для сравнения 569B (5 сут). Считается, что классические штаммы, хотя и синтезируют субъединицы MSHA, не собирают из них пилы на поверхности клеток, однако из этого правила встречаются исключения [16–18], и, возможно, этот штамм является одним из таких исключений. Поэтому мы дополнительно проверили промоторную область обоих *msh*-оперонов, используя в качестве эталонных таковые референс-штамма [9]. У штамма P-17917 промоторы обоих *msh*-оперонов имели 100 % гомологии с прототипом, тогда как у штамма 569B в промоторе оперона, ответственного за секрецию субъединиц и сборку пилей, выявлена однонуклеотидная замена (SNP) C/T в позиции –3 относительно последовательности –10. Учитывая, что аналогичная SNP в промоторной области гена *tdh V. parahaemolyticus* приводит к резкому снижению экспрессии гена [19], можно предположить, что у *V. cholerae* она способна вызвать такой же эффект. Не исключено, что описанный в [17] спонтанный мутант классического штамма, образующий MSHA, как раз и является мутантом именно по этой SNP, как и штамм P-17917. У последнего с 771 до 579 п. н. был укорочен ген *mshO* как следствие делеции G-465, приведшей к сдвигу рамки считывания (FS — frame shift) и образованию преждевременного стоп-кодона (PSC — premature stop codon), но его продукт сохранил домен пилина. Белок MshO представляет собой минорную субъединицу пилей. Тем не менее его укороченный и отличный по аминокислотному составу C-конец мог повлиять на конфигурацию белка, повысив адгезивную активность пилей. Такая же большая разница между этими двумя классическими штаммами наблюдалась и в сроках формирования зрелой биопленки (2 и 12 сут), хотя оба характеризовались одинаковыми изменениями в кластерах *ups* и *rbm*, скорее всего, не слишком существенными для образования матрикса. Однако у штамма P-17917 имелось одно значительное отличие, состоящее в повреждении гена отрицательного регулятора NapR, в отсутствие которого биопленка образуется значительно лучше [20]. Мы полагаем, что это и послужило основной причиной ускоренного формирования биопленки этим штаммом, даже несмотря на присутствие интактных генов двух других отрицательных регуляторов (*cytR*, *hns*) и инактивацию гена одной из шести дигуанилатциклаз (*cdgA*), продукты которых обеспечивают необходимый уровень циклического дигуанидина — мессенджера, контролирующего переход свободноживущих бактерий в биопленочное состояние за счет стимуляции белка VpsT — активатора транскрипции оперона *ups-II* [21].

Из токсигенных штаммов биовара Эль Тор два (P-5879 и 18336) характеризовались нарушениями в формировании биопленки: у первого процесс завершался через 12 сут, у второго зрелая биопленка не образовалась даже на 21-й день. Наиболее вероятные причины заключались в следующем. Штамм 18336, образовавший «недозревшую» биопленку, при отсутствии каких-либо отклонений в структуре *ups-rbm*-кластеров и большинства регуляторных генов содержал резко усеченный, до 72 п. н. ген положительного регулятора *upsR* (SNP G/A-72, PSC). Из литературных данных известно, что выключение этого гена влияет именно на конечные стадии формирования трехмерной структуры биопленки [22]. Замедленное образование биопленки штаммом P-5879 (с интактными регуляторными генами) могло быть связано с повреждением гена *rbmC* (вставка C-336, FS, PSC) и неспособностью к продукции полноценного белка, хотя он вполне заменим функциональным двойником Var1, ген которого у данного штамма остался неповрежденным. Вместе с тем описавшие это явление авторы [23] определяли наличие самой биопленки, а не сроки ее созревания. Поэтому мы полагаем, что выключение одного из двух необходимых генов привело к замедлению процесса. У остальных токсигенных штаммов, не имеющих существенных отклонений в структуре всех генов (кроме P-18588 с усеченным *cdgL*), процесс укладывался в «обычные» сроки (5–7 дней), в том числе у штамма P-18252 с усеченным *cdgL* и необратимо поврежденным *cdgA*. Это согласуется с данными литературы о том, что биопленка не образуется только при условии выключения сразу всех генов *cdg* [21].

Что касается нетоксигенных штаммов, то среди них также отмечена значительная разница в сроках адгезии и созревания биопленки. Только у одного из них (5392), образовавшего биопленку за 5 сут, не выявлено существенных отличий от прототипа в структуре генов биопленкообразования, кроме усеченного *mshH* (с 2022 до 1734 п. н. за счет вставки G-1653, FS и PSC), продукт которого сохранил консервативные домены, а сам ген — промотор *msh*-оперона.

У двух быстро образующих биопленку и практически идентичных штаммов (P-19787/434, 19308) выявлены существенные отклонения в структуре кластера *msh* (рис. 2). Прежде всего это касалось измененных генов *mshA* и *mshC*. Так, вместо канонического *mshA* (537 п. н.) у них присутствовал ген, обозначенный нами как *mshA-like* (486 п. н.). Гомологичные ему гены были найдены в базах NCBI, и их продукты зачастую были обозначены как MshA (WP\_000828591, BAB58970, BAD06382 и др.). Значительным изменениям подверглись и *mshC*, которые мы также обозначили как *mshC-like*. Их длина составляла 513 п. н. (у прототипа — 489 п. н.). В NCBI также найдены гомологичные им гены, продукты которых обозначены как MshC (KQA28936, CSE26627, OLZ28182 и др.). Кроме того,

эти штаммы имели измененные *mshD* (делеция 3 п. н. без FS) и *mshQ* (ряд делеций, вставок и FS внутри гена). Однако эти перестройки никак не повлияли на скорость адгезии. Действительно, как показал Blastp-анализ продуктов измененных генов, все они сохранили активные домены, характерные для пилинов.

Существенными отклонениями от прототипа обладали и идентичные друг другу *vps-rbm*-кластеры этих штаммов (рис. 3). В частности, в кластере *vps-I* обнаружена новая открытая рамка считывания (ORF — open reading frame) длиной 1149 п. н., локализованная между усеченным вследствие образования PSC *vpsH* и значительно измененным *vpsI*. Вероятно, эта *orfU-1149* может транслироваться, поскольку перед ней имеется предполагаемый сайт связывания с рибосомой. Продукт ее трансляции имеет 100 % гомологии с гипотетическими белками шести штаммов холерных вибрионов, найденных в NCBI (WP\_069730871, OEJ10796, OFI89280, OFI93704, OFJ06220, OFJ10326) и, согласно данным Blastp-анализа, содержит два предполагаемых домена, один из которых (ATPgrasp\_ST), вероятно, участвует в синтезе поверхностных полисахаридов; функция второго не установлена. У обоих штаммов отсутствовали гены *vpsC* и *vpsG*, продукты которых (ацетилтрансферазы), по-видимому, модифицируют полисахариды, придавая им большую вязкость, но биопленка в их отсутствие все равно образуется [10]. Ген *vpsI* обладал всего 50 % идентичности прототипному гену и изменил длину с 1098 до 1062 п. н., а его продукт имел измененную архитектуру доменов гликозилтрансфераз,

из которых три совпадали с таковыми прототипа, а вместо трех остальных появились два относящихся к другим семействам. Полные гомологи этого гена принадлежали найденным в NCBI шести штаммам (WP\_069730871, OEJ10796, OFI89280, OFI93704, OFJ06220, OFJ10326). PSC в *vpsH* образовался вследствие SNP A/T-1327, и ген укоротился без FS всего на 12 п. н., а его продукт сохранил активный домен лигазы PaaK. Такие же укороченные на четыре аминокислотных остатка (aa) белки были свойственны множеству штаммов из NCBI (WP\_069730870, OEJ10795, OFI89279, OFI93703, OFJ06219, OFJ10325 и др.). Кроме того, были существенно изменены гены *vpsU*, *vpsD*, *vpsP*, *rbmF* и усечены отличные от прототипов *vpsJ* и *rbmB*. Ген *vpsU*, кодирующий тирозинфосфатазу, вовлеченную в продукцию VPS, был удлинен на 63 п. н. (5'-концевых), но его продукт сохранил активный домен. В NCBI найден его 99 % гомолог (EEN99244), содержащий несколько 1-6-нуклеотидных вставок/делеций и удлиненный на 9 п. н., *vpsD* имел всего 58,5 % гомологии с прототипом, и тем не менее в продукте выявлены те же домены гликозилтрансфераз, что и у прототипа. Продукт гена *vpsP* содержал один «лишний» остаток треонина в позиции 136 и характеризовался таким же отсутствием консервативных доменов, как и прототип. Он также имел гомологи в NCBI (WP\_000990931, OEJ10808, OFI89292, OFI93716 и др.). Ген *rbmB* укоротился с 1227 до 1194 п. н. из-за образования PSC (SNP C/T-1225, без FS). В его продукте, лишенном 11 C-концевых aa, программой Blastp консервативные домены не выявлены,

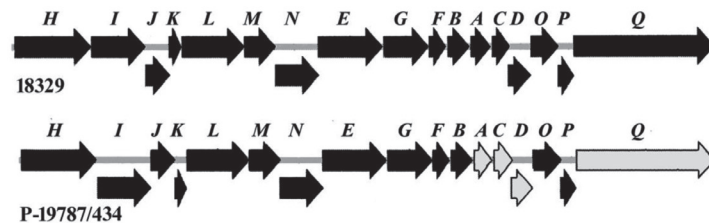


Рис. 2. Сравнение *msh*-кластеров двух штаммов *V. cholerae*. Гены, идентичные либо близкие прототипным, обозначены черным цветом, существенно отличные — серым

Fig. 2. Comparison of *msh*-clusters of 2 *V. cholerae* strains. Genes, identical or similar to prototypes are shown in black and significantly different — in grey

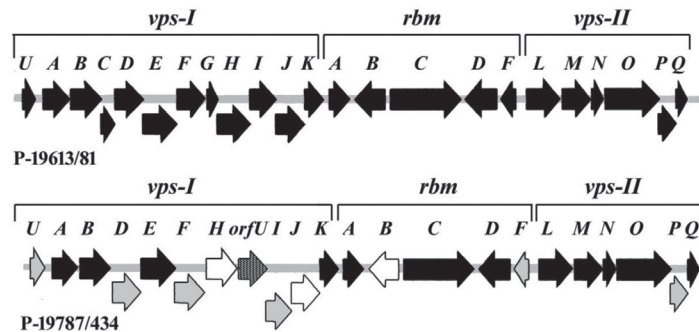


Рис. 3. Сравнение кластеров *vps-I* — *rbm* — *vps-II* двух штаммов *V. cholerae*. Гены, идентичные либо близкие прототипным, обозначены черным цветом, существенно отличные — серым, усеченные — белым, новый ген заштрихован

Fig. 3. Comparison of *vps-I* — *rbm* — *vps-II* clusters of two *V. cholerae* strains. Genes, identical or similar to prototypes are shown in black, significantly different — in grey, truncated — in white, the new gene is hatched

впрочем, как и в прототипном RbmB. Это не позволяет судить о вероятности сохранения функциональности усеченным белком. Fong et al. [10] установили, что элиминация *rbmB* не влияла на саму способность к образованию биопленки, но меняла ее структуру: пленки становились более толстыми и гетерогенными. При этом у делеционного мутанта не изменялся уровень синтеза VPS, но увеличивалось их накопление в биопленке. И наоборот, гиперэкспрессия этого гена с индуцибельного промотора приводила к снижению толщины и плотности зрелой биопленки. Авторы полагают, что RbmB действует как полисахарид-лиаза, разрушающая компоненты матрикса. Ген *rbmF* имел существенные отличия за счет FS, вызванного делецией 6 п. н. в позиции 20–25, однако продукт его трансляции полностью гомологичен гипотетическим белкам 18 штаммов *V. cholerae*, найденных в NCBI (WP\_001247411, EKM05021, KNA51715 и др.), но также не содержит консервативных доменов. Этот белок участвует в агрегации клеток и образовании структуры биопленки [10].

Следует отметить, что при Blastn-поиске гомологов полной последовательности *ups-rbm*-кластера наших штаммов P-19786/434 и 19308 в базах NCBI был найден единственный штамм *V. cholerae* 1154–74, содержащий не идентичную, но очень близкую (98–99 %) последовательность. Когда мы «вырезали» ее из генома (CP010811) и проанализировали, в ней были выявлены такие же измененные гены.

Из двух медленно образующих биопленку штаммов у 14156 таких резких изменений не обнаружено. Все гены кластера *msh* были близки прототипу, кроме укороченного *mshQ* (с 3717 до 1197 п. н. за счет вставки G-1167, FS и PSC). Его укороченный продукт (398 вместо 1252 aa) фактически утратил единственный свойственный ему лектиновый домен. Вполне вероятно, что это и послужило причиной замедленной адгезии, поскольку MshQ необходим для сборки пилей и в его отсутствие их число значительно снижается [9]. Замедленное формирование биопленки этим штаммом, по всей видимости, было связано с укорочением гена *rbmC* (делеция G1090, PSC), как в случае со штаммом P-5879, хотя, в отличие от последнего, его продукт имел большую длину и сохранил один из шести доменов. Интересно, что у штамма 14156 был также сильно усечен ген *rbmB* (SNP C/G-834, PSC), как у двух быстро образующих биопленку штаммов.

У штамма 14863 резко усечен ген *mshL* (с 1680 до 216 п. н. за счет SNP C/T-214 и образования PSC) и менее значительно — *mshN* (с 1170 до 1155 п. н. за счет SNP C/A-13 и утраты прототипного старт-кодона). Продукты обоих участвуют в биогенезе пилей [8]. Однако промоторные области *msh*-оперонов не отличались от прототипа, а его укороченный MshN сохранил активный домен, хотя белок вполне мог иметь другую конфигурацию и пониженную активность. Возможно, на адгезив-

ные свойства пилей влияют многочисленные SNP во всех генах кластера, в том числе миссенс-мутации, но это предположение требует экспериментального подтверждения. С другой стороны, его *ups*- и *rbm*-кластеры были очень близки (но далеко не идентичны) таковым штаммов P-19787/434 и 19308, образующих биопленку в пределах 3 сут. VpsD штамма 14863 отличался от двух других по шести единичным заменам aa. По-видимому, эти белки не утратили своей активности, в отсутствие которой прекращается синтез VPS, формирование пелликулы и способность к биопленкообразованию резко подавляется [10]. Ген *upsJ* был укорочен на 9 п. н. (5'-концевых), и его соответственно укороченный на три N-концевых aa продукт сохранил активный домен. Идентичные ему белки выявлены у девяти штаммов из NCBI (WP\_000154423, KNA51709, OEC29014 и др.) и обозначены как аспаратдегидрогеназы. Отмеченные в табл. 2 измененные гены 14863 имели такую же длину, но отличались от генов P-19787/434 и 19308 рядом SNP. Не исключено, что различные SNP привели к увеличению сроков образования биопленки у первого и к их сокращению у двух последних. Также длительное созревание биопленки могло быть следствием медленной адгезии.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные позволили установить некоторые корреляции между скоростью биопленкообразования и структурой ответственных на это белков. В частности, изменения и повреждения ряда генов коррелируют с замедлением или, наоборот, с ускорением созревания биопленки, в связи с чем, вероятно, могут служить критериями при определении потенциальной способности штаммов к переживанию в водных ООС. Однако при этом следует иметь в виду, что холерные вибрионы обладают огромным количеством генетических детерминант, продукты которых различными способами влияют на формирование биопленки. По-видимому, сохранение их всех в неизменном виде в относительно небольшом геноме и поддержание в активном состоянии энергетически невыгодно. Поэтому в процессе адаптации к разным экологическим нишам многие штаммы, предположительно, снижают эти затраты путем утраты или «вывода из строя» части генов, влияние которых не столь значительно либо может быть дублировано другими (например, *upsP*, *upsQ*, *upsC*, *upsG*, отдельные гены *cdg*) [10, 21]. Еще один предполагаемый путь — это укорочение и изменение нуклеотидного состава ряда генов с вероятным сохранением, а возможно, и с улучшением функциональной активности их продуктов (*mshH*, *mshA*, *mshC*, *upsU*, *upsD*, *upsE*, *upsH*, *upsI*, *upsJ*). Мы также наблюдали присутствие нового гена (*orfU-1149*), по-видимому, кодирующего фактор образования матрикса биопленки. Такая изменчивость в большей степени свойственна нетоксигенным штаммам, которые чаще персистируют

в ООС и вынуждены приспосабливаться к их условиям, сохраняя под давлением отбора самые жизнеспособные варианты. На неслучайный характер консервации в геноме ряда существенно измененных детерминант указывает обнаружение в базах NCBI полных гомологов их продуктов, принадлежащих штаммам из разных регионов мира. Мы полагаем, что многие факторы биоуплотнения так же «взаимозаменяемы», как и факторы патогенности, а также некоторые другие факторы персистенции, описанные ранее [3, 4]. С другой стороны, результатом повреждения некоторых генов (*mshQ*, *rbmC*, *upsR*) является замедление процесса, а генов отрицательных регуляторов (*hapR*, *hns*), напротив, его ускорение. То и другое оказывает влияние на конкурентоспособность и выживаемость штаммов в ООС. Вместе с тем следует отметить, что укорочение исследованных нами генов произошло в основном в результате точковых мутаций, приведших к образованию PSC. Поэтому не исключена возможность их восстановления вследствие обратных мутаций и реверсии штаммов в исходное состояние.

Токсигенные штаммы биовара Эль Тор за редким исключением содержат интактные гены, близкие прототипам, что свидетельствует в пользу их потенциальной способности к сохранению в ООС в составе биоуплотнений. Геномы двух штаммов (P-19241/301 и P-19613/81) — геновариантов с повышенным эпидемическим потенциалом, выделенных в Ростовской области с разницей в 3 года, различаются незначительно [24], что наводит на мысль о вероятности длительного выживания первого в ООС. Сохранение классических штаммов в настоящее время менее актуально, поскольку на сегодняшний день они практически вытеснены вибрионами Эль Тор, и изученный нами штамм P-17917 с ускоренным биоуплотнением является последним обнаруженным в России; ранее два таких штамма были выделены из воды в Ростове (1981) и в Сочи (1996) [25]. Скорее всего, они были занесены из стран Юго-Восточной Азии, где в 1980–1990-е гг. снова «возродились» классические штаммы, а в Бангладеш на некоторое время даже заняли доминирующую позицию в этиологии холеры [26–28], хотя с 1983 по 1997 г. они периодически встречались и в Мексике [29, 30]. Появление классических штаммов в водоемах России не сопровождалось эпидемическими осложнениями. Тем не менее мы не можем полностью исключить возможности их циркуляции в эндемичных странах и новых заносов в будущем. Известно, например, что в 2008 г. 11 штаммов были выделены из сточных вод в Непале [31], а в 2012 г. в Иране 1 из 11 клинических «вспышечных» штаммов оказался классическим [32].

Представляет интерес и тот факт, что один из двух быстро образующих биоуплотнение нетоксигенных штаммов (P-19786/434) является представителем клонального комплекса, получившего необычно широкое распро-

странение в водоемах Сочи и окрестностей в 2015 г., где в течение двух месяцев было выделено 83 одинаковых штамма. Второй, практически идентичный ему штамм 19308, вероятно, был его предшественником, занесенным с другой территории [1]. Возможно, длительное существование указанного клона в ООС и трехлетнее сохранение штамма 19308 было отчасти или полностью обусловлено способностью к ускоренному формированию биоуплотнений. В этот период заболеваний людей, вызванных такими штаммами, зарегистрировано не было, однако они обладают патогенетическим потенциалом, поскольку содержат интактные детерминанты дополнительных факторов патогенности (сериновой протеазы, гемагглютинин/протеазы, цитотонического токсина Cef, гемолизина, системы секреции 6-го типа) и в определенных условиях могут стать этиологическими агентами холероподобной диареи [3, 4]. Все это подчеркивает значимость постоянного мониторинга за холерными вибрионами на территории РФ независимо от их токсигенности.

Наконец, холерные вибрионы могут еще более интенсивно формировать биоуплотнения на биотических поверхностях, таких как водная растительность и хитин ракообразных [11]. Проявление этой способности в экологических условиях РФ и ее связи с состоянием ответственных генетических детерминант служат предметом наших дальнейших исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., и др. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006–2015 гг. Прогноз на 2016 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2016. — № 1. — С. 20–27. [Titova SV, Moskvitina EA, Kruglikov VD, et al. Cholera: analysis of epidemiological situation across the world and in Russia within a period of 2006-2015. Prognosis for 2016. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(1):20-27 (In Russ.). doi: 10.21055/0370-1069-2016-1-20-27.]
2. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Вариабельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара эль-тор, изолированных на территории России в современный период // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2011. — № 3. — С. 11–18. [Smirnova NI, Zadnova SP, Shashkova AV, Kutyrev VV. Genome variability in the altered variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor isolated in Russia. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*. 2011;(3):11-18. (In Russ.)]
3. Монахова Е.В. Стратегия вирулентности холерных вибрионов и пути ее реализации (обзор) // Проблемы особо опасных инфекций. — 2013. — № 4. — С. 60–68. [Monakhova EV. Cholera vibrio virulence strategy and ways of its realization (scientific review). *Problems of Particularly Dangerous Infections*.



- 2013;(4):60-68. (In Russ.). doi: 10.21055/0370-1069-2013-4-60-68.
4. Монахова Е.В. Факторы патогенности нехолерогенных штаммов *Vibrio cholerae*: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Ростов н/Д, 2012. [Monakhova EV. Factory patogennosti nekholerogennykh shtammov *Vibrio cholerae*. [dissertation] Rostov-on-Don, 2012. 46 p. (in Russ.)]
  5. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Ежова М.И. Анализ динамики выделения штаммов холерных вибрионов из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации с 1989 по 2016 г. с помощью авторской ГИС // Вестник Пермского университета, серия: Биология. — 2017. — № 1. — С. 112–117. [Levchenko DA, Kruglikov VD, Arkhangel'skaya IV, Ezhova MI. Analysis of the dynamics of *Vibrio cholerae* strains isolation from environmental objects on the territory of the Russian Federation from 1989 to 2016 using the author's GIS. *Vestn Permsk Univ Ser Biol.* 2017;(1):112-117. (In Russ.)]
  6. Миронова Л.В. Научное обоснование совершенствования подходов к идентификации и молекулярному типированию *Vibrio cholerae* в системе микробиологического мониторинга: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Иркутск, 2017. [Mironova LV. Nauchnoe obosnovanie sovershenstvovaniya podkhodov k identifikatsii i molekularnomu tipirovaniyu v sisteme mikrobiologicheskogo monitoringa. [dissertation] Irkutsk; 2017. (In Russ.)]
  7. Moorthy S, Watnick PI. Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development. *Mol Microbiol.* 2004;52(2):573-587. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04000.x.
  8. Silva AJ, Benitez JA. *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(2):e0004330. doi: 10.1371/journal.pntd.0004330.
  9. Marsh JW, Taylor RK. Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus. *J Bacteriol.* 1999;181(4):1110-1117.
  10. Fong JC, Syed KA, Klose KE, Yildiz FH. Role of *Vibrio polysaccharide* (vps) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology.* 2010;156(Pt 9):2757-2769. doi: 10.1099/mic.0.040196-0.
  11. Teschler JK, Zamorano-Sanchez D, Utada AS, et al. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(5):255-68. doi: 10.1038/nrmicro3433.
  12. Титова С.В., Кушнарева Е.В. Оценка способности холерных вибрионов к образованию биопленок *in vitro* с помощью нового методического подхода // Фундаментальные исследования. — 2014. — № 10. — С. 375–379. [Titova SV, Kusnaryova EV. Evaluation of *Vibrio cholerae* ability to form biofilms *in vitro* with the use of the new experimental procedure. *Fundamental research.* 2014;(10):375-379. (In Russ.)]
  13. Горбунов В.А., Титов Л.П., Ермакова Т.С. Многоцентровое исследование антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в Республике Беларусь // Здоровоохранение (Минск). — 2007. — № 1. — С. 28–31. [Gorbunov VA, Titov LP, Ermakova TC. Mnogotsentrovoye issledovanie antibiotikorezistentnosti nozokomial'nykh shtammov *Pseudomonas aeruginosa* v Respublike Belarus'. *Zdravookhranenie (Minsk).* 2007;(1):28-31. (In Russ.)]
  14. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
  15. Simpson JT, Wong K, Jackman SD, et al. ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome Res.* 2009;19(6):1117-1123. doi: 10.1101/gr.089532.108.
  16. Jonson G, Holmgren J, Svennerholm AM. Identification of a mannose-binding pilus on *Vibrio cholerae* El Tor. *Microb Pathog.* 1991;11(6):433-441. doi: 10.1016/0882-4010(91)90039-D.
  17. Jouravleva EA, McDonald GA, Marsh JW, et al. The *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin is the receptor for a filamentous bacteriophage from *V. cholerae* O139. *Infect Immun.* 1998;66(6):2535-2539.
  18. Marsh JW, Sun D, Taylor RK. Physical linkage of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin secretory and structural subunit gene loci: identification of the mshG coding sequence. *Infect Immun.* 1996;64(2):460-465.
  19. Шалу О.А., Писанов Р.В., Монахова Е.В. Эффективность экспрессии гена *tdh* *Vibrio parahaemolyticus* зависит от двух точковых мутаций в его промоторной области // Генетика. — 2012. — Т. 48. — № 12. — С. 1364. [Shalu OA, Pisanov RV, Monakhova EV. Efficiency of *Vibrio parahaemolyticus* *tdh* gene expression depends upon two point mutations in its promoter region. *Russian journal of genetics.* 2012;48(12):1364. (In Russ.)]
  20. Sultan SZ, Silva AJ, Benitez JA. The PhoB regulatory system modulates biofilm formation and stress response in El Tor biotype *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett.* 2010;302(1):22-31. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01837.x.
  21. Shikuma NJ, Fong JC, Yildiz FH. Cellular levels and binding of c-di-GMP control subcellular localization and activity of the *Vibrio cholerae* transcriptional regulator VpsT. *PLoS Pathog.* 2012;8(5):e1002719. doi: 10.1371/journal.ppat.1002719.
  22. Yildiz FH, Dolganov NA, Schoolnik GK. VpsR, a Member of the Response Regulators of the Two-Component Regulatory Systems, Is Required for Expression of vps Biosynthesis Genes and EPS(ETr)-Associated Phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor.

- J Bacteriol.* 2001;183(5):1716-1726. doi: 10.1128/JB.183.5.1716-1726.2001.
23. Fong JC, Yildiz FH. The *rbmBCDEF* gene cluster modulates development of rugose colony morphology and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 2007;189(6):2319-2330. doi: 10.1128/JB.01569-06.
24. Писанов Р.В., Ежова М.И., Монахова Е.В., и др. Особенности структуры генома токсигенного штамма *Vibrio cholerae* El Tor Инаба, выделенного в 2014 г. из открытого водоема в Ростове-на-Дону // Проблемы особо опасных инфекций. — 2015. — № 2. — С. 63–67. [Pisanov RV, Ezhova MI, Monakhova EV, et al. Peculiarities of genome structure of toxigenic *Vibrio cholerae* El Tor Inaba strain, isolated from a surface water body in the territory of Rostov-on-Don in 2014. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2015;(2):63-67. (In Russ.)]
25. Ramamurthy T, Monakhova EV, Mukhopadhyay AK, et al. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* and other enteric vibrios from Russia and India. In: Proceedings of the International conference “Shared threats – collaborative actions. Response of BRICS countries to the challenges of infectious diseases”; Moscow, 23-24 Jun 2015. Moscow; 2015. P. 15-18.
26. Samadi AR, Huq MI, Shahid N, et al. Classical *Vibrio cholerae* biotype displaces EL tor in Bangladesh. *Lancet.* 1983;1(8328):805-807. doi: 10.1016/S0140-6736(83)91860-3.
27. Siddique AK, Baqui AH, Eusof A, et al. Survival of classic cholera in Bangladesh. *Lancet.* 1991;337(8750):1125-1127. doi: 10.1016/0140-6736(91)92789-5.
28. Nair GB, Faruque SM, Bhuiyan NA, et al. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 2002;40(9):3296-99. doi: 10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002.
29. Alam M, Nusrin S, Islam A, et al. Cholera between 1991 and 1997 in Mexico was associated with infection by classical, El Tor, and El Tor variants of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3666-3674. doi: 10.1128/JCM.00866-10.
30. Choi SY, Rashed SM, Hasan NA, et al. Phylogenetic Diversity of *Vibrio cholerae* Associated with Endemic Cholera in Mexico from 1991 to 2008. *MBio.* 2016;7(2): e02160. doi: 10.1128/mBio.02160-15.
31. Rai KR, Rai SK, Bhatt DR, et al. Study of medically important *Vibrios* in the sewage of Katmandu Valley, Nepal. *Nepal Med Coll J.* 2012;14(3):212-215.
32. Bakhshi B, Boustanshenas M, Mahmoudi-aznaveh A. Emergence of *Vibrio cholerae* O1 classical biotype in 2012 in Iran. *Lett Appl Microbiol.* 2014;58(2):145-9. doi: 10.1111/lam.12167.

✿ Информация об авторах

**Светлана Викторовна Титова** — канд. мед. наук, директор. ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону. E-mail: titova\_sv@antiplague.ru.

**Елена Владимировна Монахова** — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы молекулярной биологии патогенных для человека вибрионов. ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону. E-mail: monakhova\_ev@antiplague.ru.

**Людмила Павловна Алексеева** — д-р биол. наук, профессор, заведующая лабораторией гибридом. ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону. E-mail: alekseeva\_lp@antiplague.ru.

**Руслан Вячеславович Писанов** — канд. биол. наук, заведующий лабораторией диагностики особо опасных инфекций. ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону. E-mail: pisanov\_rv@antiplague.ru.

✿ Information about the authors

**Svetlana V. Titova** — PhD, Director. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia. E-mail: titova\_sv@antiplague.ru.

**Elena V. Monakhova** — DPhil, Leading Researcher, Head of Group of Molecular Biology of *Vibrio* Human Pathogens. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia. E-mail: monakhova\_ev@antiplague.ru.

**Ludmila P. Alekseeva** — DPhil, Professor, Head of Laboratory of Hybridomes. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia. E-mail: alekseeva\_lp@antiplague.ru.

**Ruslan V. Pisanov** — Phd, Head of Laboratory of Diagnostics of Especially Dangerous Infections. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia. E-mail: pisanov\_rv@antiplague.ru.