

<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2024-23-1-5-41-50>

## Трансмиссионная электронная микроскопия биопленок *Vibrio cholerae* на хитин-содержащих субстратах

С. В. Титова\*, И. Р. Симонова, Е. А. Меньшикова, В. С. Осадчая

ФКУЗ Ростовский-на-Дону Ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

### Резюме

**Актуальность.** Эволюционно сложившаяся ассоциация *Vibrio cholerae* с хитином обеспечила устойчивость к стрессовым воздействиям и защиту от хищников. Образование биопленки служит важнейшим механизмом создания эффективной ассоциации холерного вибриона с хитином. Способность формировать биопленку у *V. cholerae* зависит от наличия токсин-корректируемых пилей адгезии (TCP), за синтез которых отвечают гены tcp A-F. Одним из ключевых методов исследования биопленок является микроскопия. Она позволяет визуализировать структурные элементы и изучать различные параметры биопленок и эффекты воздействия на них различных факторов. **Цель.** Определение эпидзначимости биопленкообразующей способности токсигенных штаммов по их морфологическим особенностям на хитин-содержащих субстратах. Изучение структурных различий биопленок холерных вибрионов tcpA<sup>+</sup> и tcpA<sup>-</sup> штаммов на хитин-содержащих субстратах. **Материалы и методы.** В исследовании использованы штаммы холерных вибрионов, разные по токсигенности и происхождению. В своей работе мы применили трансмиссионную электронную микроскопию для оценки эпидзначимости процесса биопленкообразования *V. cholerae* на хитин-содержащих субстратах. **Результаты.** Показано, что холерные вибрионы tcpA<sup>+</sup> и tcpA<sup>-</sup> штаммов способны образовывать биопленки на поверхности хитин-содержащих субстратов. Интенсивность образования биопленок более выражена у tcpA<sup>+</sup> штаммов, т.к. клетки *V. cholerae* ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> в составе биопленки располагаются преимущественно одиночно и поверхность хитинового экзоскелета, с которой они контактируют, интактна, клетки *V. cholerae* ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>-</sup> в составе биопленки образуют цепочки, что указывает на процессы деления, а разрозненный хитин эндоцитикулы свидетельствует об активности метаболических процессов. **Заключение.** Используемые в работе штаммы *V. cholerae*, независимо от наличия или отсутствия генов ctx и tcp, образуют биопленки на хитиновом субстрате. Показатель биопленкообразования по толщине матрикса биопленки выше у *V. cholerae* ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>, по степени деградации хитинового субстрата выше у *V. cholerae* ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>-</sup>. Холерные вибрионы, имеющие ген tcpA, обладают большей интенсивностью биопленкообразования, что, в свою очередь, указывает на эпидемическую значимость феномена биопленкообразования и свидетельствует о важной роли хитина для персистенции холерных вибрионов в условиях гидробиоценозов водоемов и возможности выживания и сохранения эпидемически значимых штаммов.

**Ключевые слова:** биопленка, *Vibrio cholerae*, хитин, трансмиссионная электронная микроскопия

Конфликт интересов не заявлен.

**Для цитирования:** Титова С. В., Симонова И. Р., Меньшикова Е. А. и др. Трансмиссионная электронная микроскопия биопленок *Vibrio cholerae* на хитин-содержащих субстратах. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2024;23(1):41-50. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2024-23-1-41-50>

### Благодарность

Авторы выражают искреннюю благодарность научному сотруднику Головину Сергею Николаевичу, за непосредственное участие в подготовке проб для трансмиссионной электронной микроскопии.

### Transmission Electronic Microscopy of *Vibrio cholerae* Biofilms on Chitin-Containing Substrates

SV Titova\*\*, IR Simonova, EA Menshikova, VS Osadchaya

FKUZ Rostov-on-Don of the Order of the Red Banner of Labor Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Russia

### Abstract

**Introduction.** The evolutionary association of *Vibrio cholerae* with chitin provided resistance to stress and protection from predators. The most important mechanism that provided *V. cholerae* with the effectiveness of association with chitin is biofilm formation.

\* Для переписки: Титова Светлана Викторовна, к. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций, ФКУЗ Ростовский-на-Дону Ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, д. 117/40. +7 (863) 240-91-08, [svetatitova@bk.ru](mailto:svetatitova@bk.ru). ©Титова С. В. и др.

\*\* For correspondence: Titova Svetlana V., Cand. Sci. (Med.), leading researcher, laboratories of natural focal and zoonotic infections, FKUZ Rostov-on-Don of the Order of the Red Banner of Labor Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, 117/40, st. M. Gorky, Rostov-on-Don, 344002, Russia. +7 (863) 240-91-08, [svetatitova@bk.ru](mailto:svetatitova@bk.ru). ©Titova SV, et al.

The ability to form a biofilm in *V. cholerae* depends on the presence of a factor, toxin-corrected adhesion pili (TCP), which are synthesized by the *tcp A-F* genes. One of the key methods for studying biofilms is microscopy. It allows one to visualize the structural elements and study various parameters of biofilms and the effects of various factors on them. **Aim.** To determine the epidemiological significance of the biofilm-forming ability of toxigenic strains by their morphological characteristics on chitin-containing substrates. Study of structural differences in biofilms of *Vibrio cholerae tcpA<sup>+</sup>* and *tcpA<sup>-</sup>* strains on chitin-containing substrates. **Results.** It has been shown that *Vibrio cholerae tcpA<sup>+</sup>* and *tcpA<sup>-</sup>* strains are able to form biofilms on the surface of chitin-containing substrates. The intensity of biofilm formation is more pronounced in *tcpA<sup>+</sup>* strains, because *V. cholerae ctxA<sup>+</sup> tcpA<sup>+</sup>* cells in the biofilm are predominantly singly located and the surface of the chitinous exoskeleton with which they are in contact is intact, *V. cholerae ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>-</sup>* cells form chains in the biofilm, which indicates division processes, and scattered chitin of the endocuticle indicates activity of metabolic processes. **Conclusion.** The strains of *V. cholerae* used in the work, regardless of the presence or absence of the *ctx* and *tcp* genes, form biofilms on a chitin substrate. The indicator of biofilm formation in terms of the thickness of the biofilm matrix is higher in *V. cholerae ctxA<sup>+</sup> tcpA<sup>+</sup>*, in terms of the degree of degradation of the chitin substrate it is higher in *V. cholerae ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>-</sup>*.

**Keywords:** biofilms, *Vibrio cholerae*, chitin, transmission electron microscopy

No conflict of interest to declare.

**For citation:** Titova SV, Simonova IR, Menshikova EA, et al. Transmission electron microscopy of *Vibrio cholerae* biofilms on chitin-containing substrates. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2024;23(1):41-50 (In Russ.). <https://doi:10.31631/2073-3046-2024-23-1-41-50>

#### Acknowledgement

The authors express their sincere gratitude to research fellow Sergei Nikolaevich Golovin for his direct participation in the preparation of samples for transmission electron microscopy.

#### Введение

Холерные вибрионы, являясь обитателями водной среды, неизменно сталкиваются с негативным воздействием многочисленных факторов: градиента питательных веществ, колебаний температуры, оксидативного стресса, вирулентных бактериофагов, хищных простейших и т.д. [1,2]. Однако эволюционно сложившаяся ассоциация *Vibrio cholerae* с хитином – самым распространенным биополимером в водной среде, обеспечила им доступный источник азота и углерода, устойчивость к стрессовым воздействиям и защиту от хищников [3–5]. Важнейшим механизмом, обеспечившим холерным вибрионам эффективность ассоциации с хитином, является биопленкообразование [6,7]. Образование биопленки *V. cholerae* широко варьирует в зависимости от характеристик того или иного штамма, и одним из главных факторов, влияющих на этот процесс, является наличие токсин-корректируемых пилей адгезии (TCP), за синтез которых отвечают гены *tcp A-F*. Наличие пилей адгезии опосредует способность холерных вибрионов колонизировать поверхности различных субстратов, в частности – хитин-содержащих. Помимо TCP, в колонизации хитиновых субстратов играют роль маннозо-чувствительный гемагглютинин, хитин-регулируемые пили [8,9] и два хитин-связывающих белка (36 и 53 кДа) [10]. TCP, помимо участия в адгезии, являются также рецепторами для умеренных фагов СТХф [11], опосредующих токсигенность холерных вибрионов, а связь с хитином, в свою очередь, индуцирует естественную компетентность клеток *V. cholerae*, способствуя горизонтальному переносу генов [12–14].

Значимым регулятором численности *V. cholerae* в водной среде являются простейшие [2,15]. При этом

холерные вибрионы в составе биопленок вырабатывали стратегию защиты от хищников, которая заключается в Quorum sensing-регулируемом синтезе антипротозойных факторов и протеолитических ферментов, негативно воздействующих на простейших [16]. Биопленкообразование способствует персистенции холерных вибрионов в поверхностных водоемах.

Одним из ключевых методов исследования биопленок является микроскопия. Она позволяет визуализировать структурные элементы и изучать различные параметры биопленок и эффекты воздействия на них различных факторов. Для визуализации биопленок холерных вибрионов на хитине широко используются сканирующая электронная микроскопия и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия [17–20].

**Цель работы** – определить эпидзначимость биопленкообразующей способности токсигенных штаммов по морфологическим особенностям биопленок *V. cholerae* на хитин-содержащих субстратах, с выявлением структурных различий между биопленками *ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>* и *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>* штаммов холерных вибрионов. Для достижения поставленной цели были поставлены задачи: методический подбор условий использования трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) для изучения биопленок холерных вибрионов на хитин-содержащих субстратах и подготовка биопленок на хитиновом субстрате для исследования с применением ТЭМ.

#### Материалы и методы

В исследовании использованы штаммы холерных вибрионов, разные по токсигенности и происхождению, полученные из лаборатории «Коллекция живых культур микроорганизмов»

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Токсигенные (ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>): *V. cholerae* O1 El Tor 18332, 19241, 19664, 19613, 5879. Нетоксигенные (ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>): *V. cholerae* El Tor 20000, 19754; *V. cholerae* non O1/non O139 P-9741, 19860, 18141.

Холерные вибрионы культивировали на агаре Мартена (рН 7,6–7,8). Для экспериментов использовали 18-часовую агаровую культуру холерных вибрионов, которую суспендировали в стерильном натрий-фосфатном буфере (рН 7,2–7,4; до показателя мутности 0,5 ед. по шкале McFarland на приборе Densi-La-Meter II («ErbaLachema», Чехия).

Биопленки холерных вибрионов получали запатентованным способом [21]. В качестве субстрата для образования биопленок использовали фрагменты хитинового панциря толстопалого речного рака (*Astacus pachypus*) массой 100–110 мг, которые промывали проточной водопроводной водой и помещали во флаконы с 30 мл речной воды (р. Дон). Флаконы с содержимым автоклавировали при 0,11 МПа, 120 °С, 30 мин. Затем во флаконы вносили суспензию *V. cholerae* до конечной концентрации 10<sup>4</sup> м.к./мл и инкубировали при комнатной температуре в течение всего срока наблюдения (максимальный срок – 28 суток).

Контроль жизнеспособности микробных клеток определяли путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) в 0,1 мл микробной взвеси или в отпечатках биопленок на агаре Мартена (рН 7,6–7,8) после 24 часов инкубации при 37 °С.

На стадии зрелой биопленки (14 суток) производили пробоподготовку образцов для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии в соответствии с МУ 1.3.3103-13 «Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I–IV групп патогенности», запатентованным способом [22]. Фиксацию фрагментов хитиновых экзоскелетов проводили в 2,5% растворе глутарового альдегида («AppliChem», Германия) в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2–7,4) в течение 2 часов при 4 °С и, после однократного отмыwania в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2–7,4), проводили постфиксацию и контрастирование 1% раствором тетраоксида осмия (OsO<sub>4</sub>) («AcresOrganics», Бельгия) в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2–7,4) в течение 2 часов. Затем фрагменты хитина измельчали до размеров 2 × 2 мм и обезвоживали в растворах этанола восходящей концентрации (50°, 60°, 70°, 80°, абсолютный этанол) по 20 минут при 4 °С. Готовили эпоксидную смолу следующего состава: 1,12 мл Epon™812 («Sigma-Aldrich», США), 0,6 мл DDSA («Sigma-Aldrich», США), 0,65 мл MNA («Sigma-Aldrich», США), 0,03 мл DPM-30 («Sigma-Aldrich», США). Данной смолой производили пропитывание образцов (смесь смолы и ацетона 1:3–2 часа, смесь смолы и ацетона 1:1 – 12 часов, смесь смолы и ацетона 3:1–2 часа, чистая смола – 2 часа)

и последующую заливку в капсулы BEEM 1001B («StructureProbe, Inc.», США). Полимеризацию смолы проводили в термостате при 37 °С в течение 24 часов, затем при 60 °С в течение 48 часов.

Из полученных блоков с образцами при помощи ультратома LKB-III 8800 («LKB Bromma», Швеция) изготавливали ультратонкие срезы толщиной 60–70 нм, которые монтировали на медные сеточки («StructureProbe, Inc. №, США) в 0,3% водном растворе цитрата свинца («Sigma-Aldrich», США) с добавлением 0,01 М раствора гидроксида натрия.

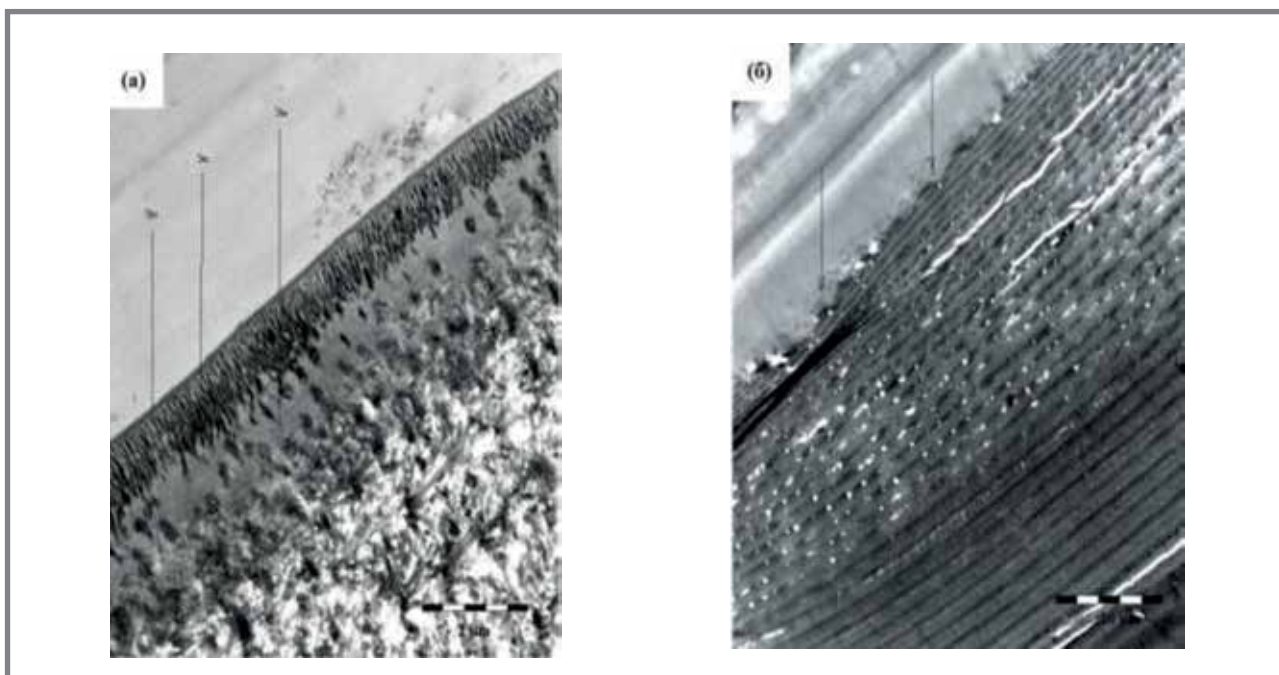
После высушивания образцы исследовали методом ТЭМ в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1011 («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ. Изображения получали при помощи CCD-камеры Olympus-SIS Veleta («Olympus Soft Imaging Solutions GmbH», Германия) с применением программного обеспечения Olympus ITEM TEM Imaging Platform («Olympus Soft Imaging Solutions GmbH», Германия). Все представленные ТЭМ-изображения являются репрезентативными для большого количества полученных изображений.

### Результаты

Результаты исследования представлены в виде электронограмм на рисунках 1–6. Хитиновый экзоскелет состоит из трех слоев. На рисунке 1 представлены срезы хитинового экзоскелета *Astacus pachypus*: 1а – срез нативного хитинового экзоскелета с отчетливо различимыми слоями: эпикутикулой, экзокутикулой и эндокутикулой. Адгезия холерных вибрионов с последующим формированием биопленки происходит к верхнему слою хитинового экзоскелета. На рисунке 1б представлен срез хитинового экзоскелета с образовавшейся на его поверхности биопленкой холерных вибрионов. На этом изображении обращает внимание отсутствие верхних слоев хитинового экзоскелета, что свидетельствует об их лизисе холерными вибрионами, синтезирующими набор гидролитических ферментов [23,24]. Отсутствующие поверхностные слои хитинового экзоскелета способствовали лучшему заполнению смолой эндокутикулы при осуществлении пробоподготовки и ее контрастированию.

На рисунке 2 представлены ультратонкие срезы биопленок *V. cholerae* ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> штаммов (рис. 2а) и *V. cholerae* ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup> штаммов (рис. 2б) на хитине. На изображении (рис. 2а) срез эндокутикулы имеет плотную однородную структуру темно серого цвета. Межклеточный матрикс расположен на поверхности хитина, в его толще распределены клетки холерных вибрионов. На рисунке 2б слой эндокутикулы тоже окрашен в темно-серый цвет и расположен выше слоя матрикса, но не имеет четкой границы, что хорошо видно при большем увеличении (×30000) на рисунке 3б, а клетки холерных вибрионов расположены цепочками, что указывает на процессы деления.

**Рисунок 1. Хитиновые экзоскелеты *Astacus pachypus***  
**Figure 1. Chitinous exoskeletons of *Astacus pachypus***

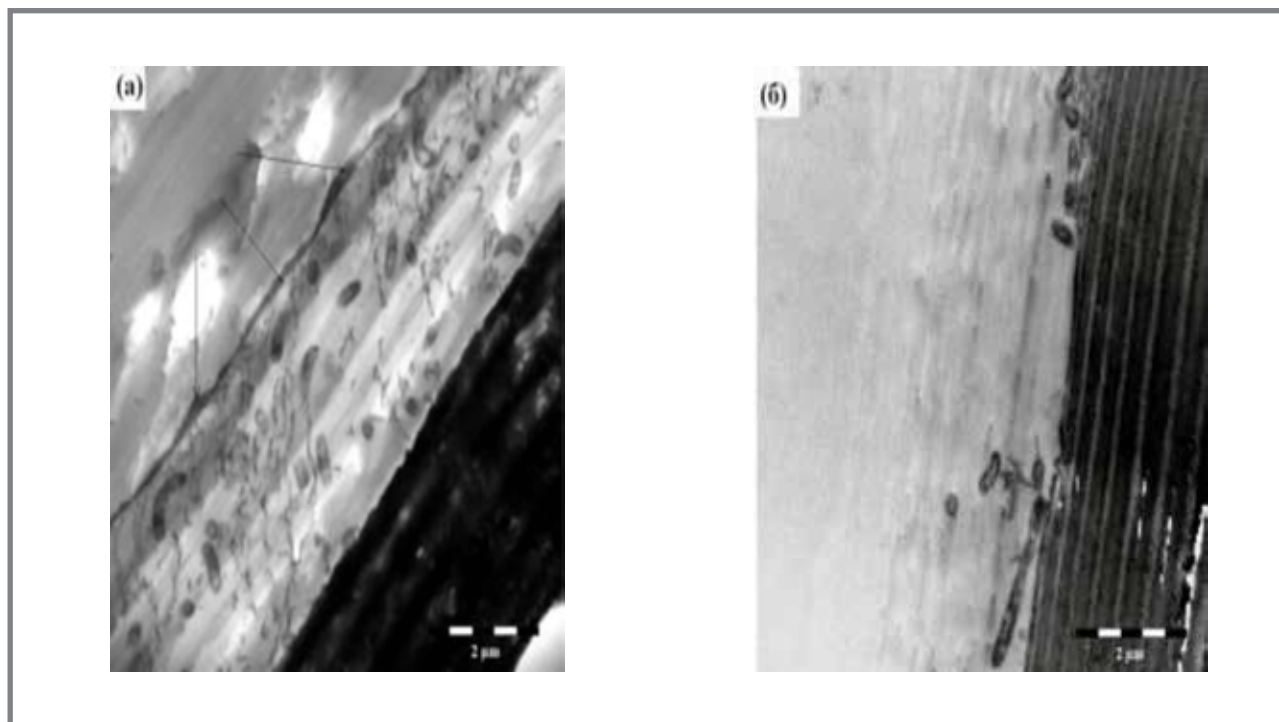


Примечание: а) ультратонкий срез нативного хитинового экзоскелета *Astacus pachypus*, увеличение  $\times 10000$ , маркер – 2 мкм; б) ультратонкий срез хитинового экзоскелета *Astacus pachypus* с биопленкой *V. cholerae* 19613 (показана стрелками), увеличение  $\times 4000$ , маркер – 10 мкм. ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII) и цитратом свинца.

Note: a) ultrathin section of the native chitinous exoskeleton of *Astacus pachypus*, magnification  $\times 10000$ , marker – 2  $\mu\text{m}$ ; b) ultrathin section of *Astacus pachypus* chitinous exoskeleton with *V. cholerae* 19613 biofilm (shown by arrows), magnification  $\times 4000$ , marker – 10  $\mu\text{m}$ . TEM, staining with tetraoxide osmium (VIII) and lead citrate.

**Рисунок 2. Ультратонкие срезы биопленок *V. cholerae* *ctxA*+*tcpA*+ и *V. cholerae* *ctxA*-*tcpA*- на хитиновом экзоскелете**

**Figure 2. Ultra-thin sections of biofilms of *V. cholerae* *ctxA*+*tcpA*+ and *V. cholerae* *ctxA*-*tcpA*- on the chitinous exoskeleton**

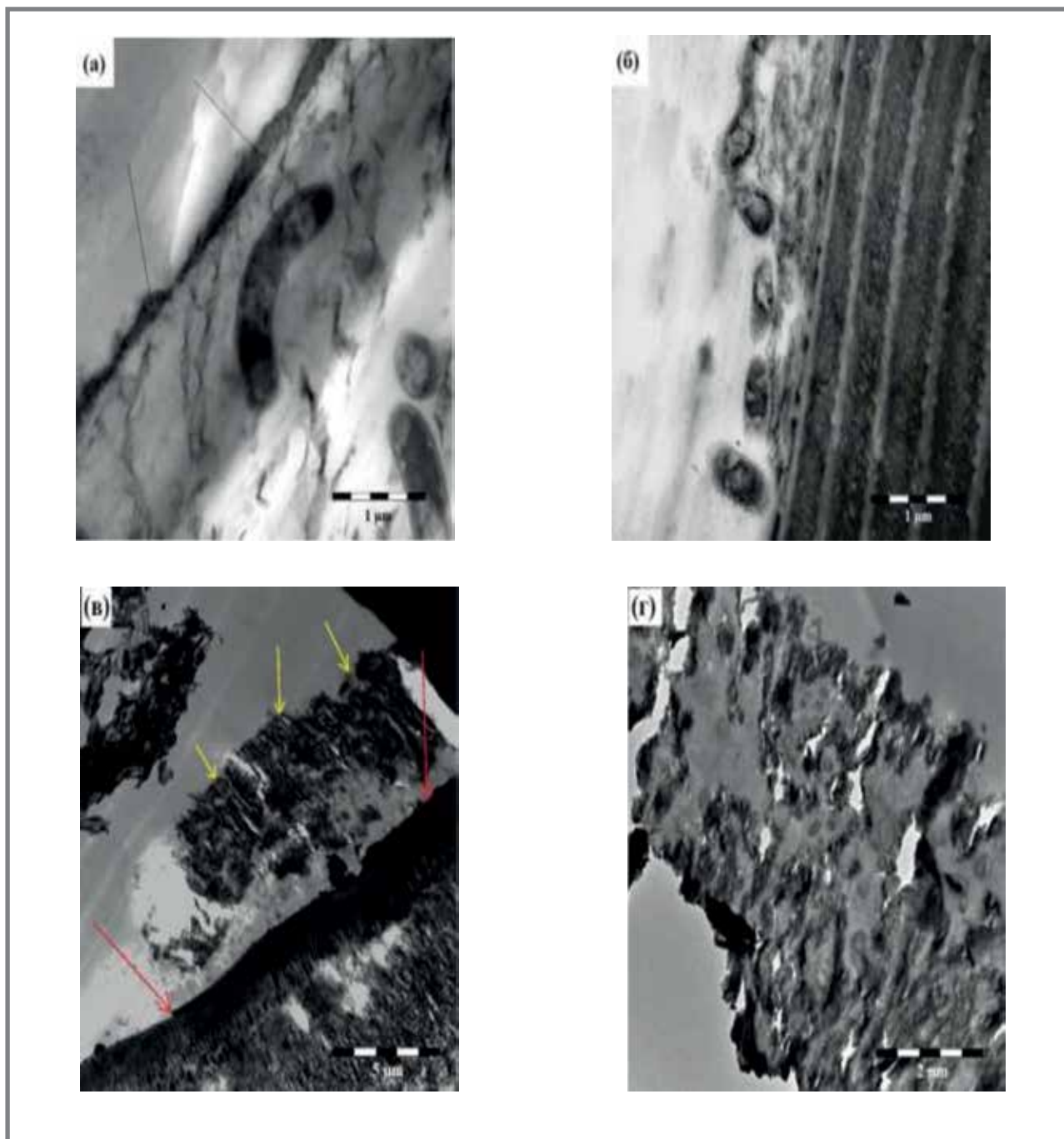


Примечание: а) биопленка *V. cholerae* P-19613 *ctxA*+*tcpA*+ на хитиновом экзоскелете (стрелками показана мембраноподобная структура на поверхности матрикса), увеличение  $\times 10000$ , маркер – 2 мкм; б) биопленка *V. cholerae* 20000 *ctxA*-*tcpA*- на хитине, увеличение  $\times 10000$ , маркер – 2 мкм. ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII) и цитратом свинца.

Note: a) biofilm of *V. cholerae* 19613 *ctxA*+*tcpA*+ on the chitinous exoskeleton (arrows show the membrane-like structure on the surface of the matrix, magnification – 10000, marker 2  $\mu\text{m}$ ); b) biofilm of *V. cholerae* 20000 *ctxA*-*tcpA*- on chitin, magnification  $\times 10000$ , marker – 2  $\mu\text{m}$ . TEM, staining with osmium (VIII) tetroxide and lead citrate.



**Рисунок 3. Биопленки *V. cholerae* ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> и *V. cholerae* ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup> на хитиновом экзоскелете**  
**Figure 3. Biofilms of *V. cholerae* ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> and *V. cholerae* ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup> on the chitinous exoskeleton**



Примечание: а) матрикс биопленки *V. cholerae* 19613 ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> (стрелками показана электроноплотная мембраноподобная структура на поверхности биопленки), увеличение 1×40000, маркер – 1 мкм; б) клетки в составе биопленки *V. cholerae* 20000 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>; (матрикс биопленки не имеет четкой границы) увеличение ×30000, маркер – 1 мкм; в) биопленка *V. cholerae* 19241 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup> (стрелками показана объемная электроноплотная структура, сформировавшаяся на поверхности биопленки при длительном культивировании), увеличение ×6000, маркер – 5 мкм; г) деградация хитинового экзоскелета клетками *V. cholerae* 19754 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup> (матрикс биопленки не имеет четкой границы), увеличение ×12000, маркер – 2 мкм. ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII) и цитратом свинца.

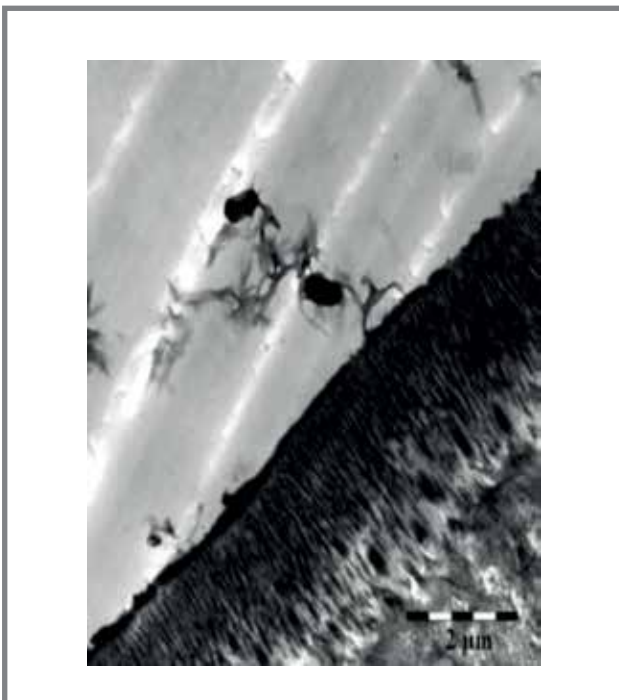
Note: a) matrix of the biofilm *V. cholerae* 19613 ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>, (arrows show an electron-dense membrane-like structure on the biofilm surface), marker – 1×40000; b) cells in the *V. cholerae* biofilm 20000 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>, (the biofilm matrix does not have a clear border) ×30000 magnification, marker – 1 μm; c) biofilm *V. cholerae* 19241 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup> (arrows show the bulk electron-dense structure formed on the surface of the biofilm during long-term cultivation), magnification ×6000, marker – 5 μm; d) degradation of the chitinous exoskeleton by *V. cholerae* cells 19754 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup> (the biofilm matrix has no clear border), magnification ×12000, marker – 2 μm. TEM, staining with osmium (VIII) tetroxide and lead citrate.

На основании этих данных нами определены следующие морфологические различия в структуре биопленок штаммов *V. cholerae* ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> и *V. cholerae* ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>:

- Матрикс зрелой биопленки *V. cholerae* ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> штаммов более выражен на срезе, имеет

большую толщину и содержит большое количество электроноплотных складчатых структур по сравнению с биопленками нетоксигенных, апилированных штаммов, матрикс которых также представлен складчатыми структурами, но менее выраженными по электронной плотности;

**Рисунок 4. Вторичные колонизаторы из состава биопленки *V. cholerae* 19241**  
**Figure: 4. Secondary colonizers from the biofilm of *V. cholerae* 19241**



Примечание: увеличение  $\times 15000$ , маркер - 2 мкм. ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII) и цитратом свинца.  
 Note: magnification  $\times 15000$ , marker - 2  $\mu\text{m}$ . TEM, staining with osmium (VIII) tetroxide and lead citrate.

- Холерные вибрионы в составе биопленки *V. cholerae*  $\text{ctxA}^- \text{tcpA}^-$  штаммов активно делятся, на что указывает характерное расположение клеток в виде цепочек [25], в отличие от клеток токсигенных штаммов, которые располагаются одиночно.
- Поверхность матрикса биопленки токсигенных штаммов (рис. 3а), сообщающаяся с внешней средой (среда культивирования), представляет собой сплошной электронноплотный слой, образующий мембраноподобную структуру. Матрикс биопленки нетоксигенных, апилированных штаммов (рис. 3б) менее выражен и в некоторых местах не имеет четкой границы с внешней средой.

При дальнейшем культивировании биопленок *V. cholerae* до стадии дисперсии в биопленочных структурах происходят морфологические изменения, так толщина электронноплотной мембраноподобной структуры, отделяющей биопленку *V. cholerae*  $\text{ctxA}^+ \text{tcpA}^+$  штаммов от внешней среды, значительно увеличивается (рис. 3в), в то время как препарат биопленки *V. cholerae*  $\text{ctxA}^- \text{tcpA}^-$  штаммов (рис. 3г) представлен отдельными фрагментами деградированного экзоскелета, между которыми располагаются бактериальные клетки, границы матрикса в образце не определяются. На поверхности хитинового экзоскелета, представленного на рисунке 4, наблюдаются клетки вторичных колонизаторов, отделившихся от первичной биопленки.

Эти клетки уже окружены электронноплотными фрагментами экстрацеллюлярного матрикса, образованного в составе первичной биопленки.

На рисунке 5 показано взаимодействие холерных вибрионов в составе биопленки с эндокутикулой хитинового экзоскелета. Клетки *V. cholerae*  $\text{ctxA}^- \text{tcpA}^-$  штаммов (рис. 5б), помимо типичной для делящихся форм морфологии, активно деградируют хитин эндокутикулы, в то время как одиночные клетки *V. cholerae*  $\text{ctxA}^+ \text{tcpA}^+$  штаммов адгезированы к поверхностным слоям хитина (рис. 5а, в, г).

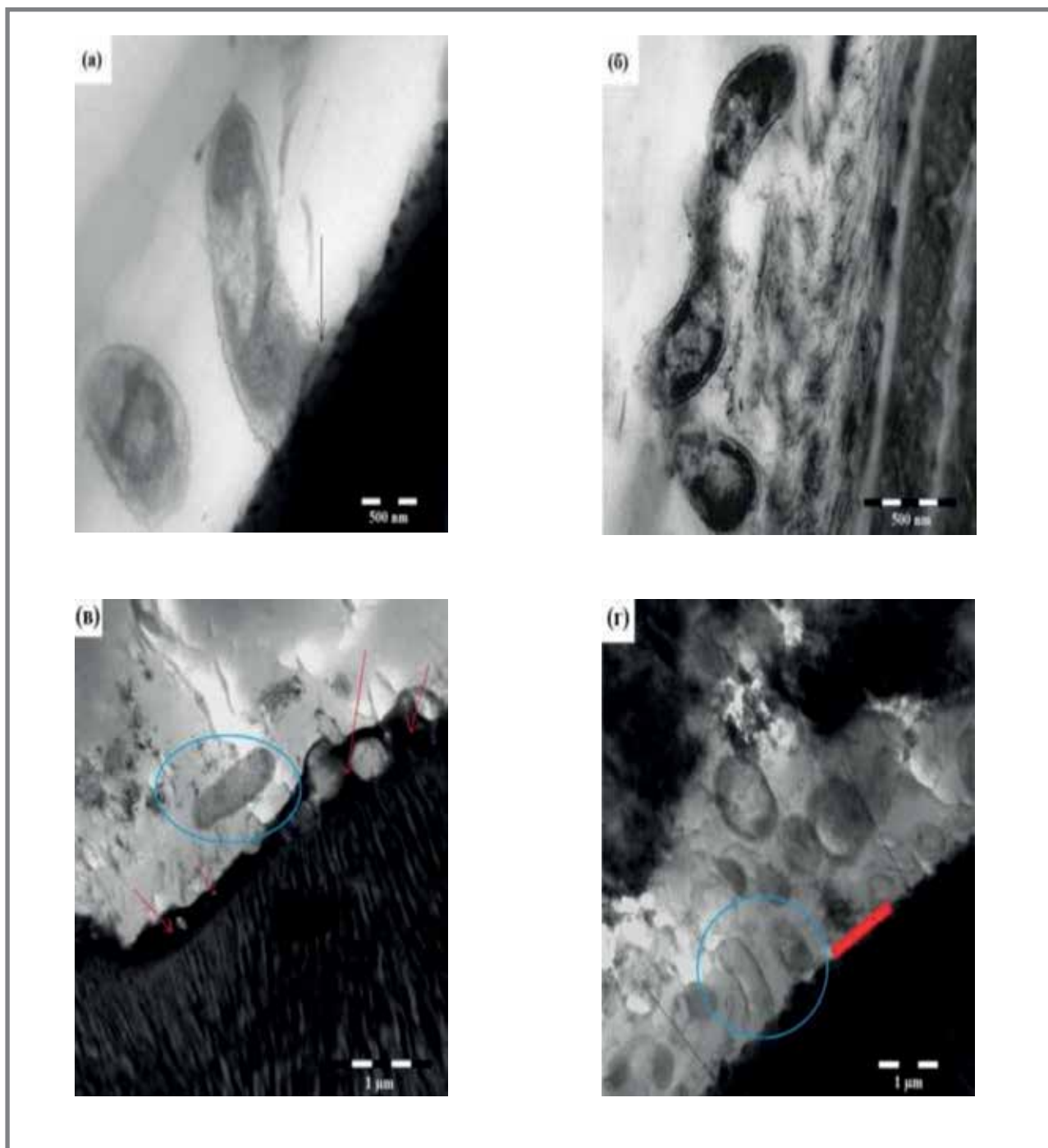
На рисунке 6 представлены результаты изменения толщины биопленки *V. cholerae*  $\text{ctxA}^+ \text{tcpA}^+$  штаммов при помощи программного обеспечения TEM imaging platform ITEM. Как показывает маркер на рисунках 6а, б и 6в толщина биопленок токсигенных штаммов составляет 5,6 и 7,9 мкм, при этом толщину биопленок *V. cholerae*  $\text{ctxA}^- \text{tcpA}^-$  штаммов точно измерить не удастся ввиду отсутствия четких границ матрикса, однако по наличию неинтенсивных электронноплотных складчатых структур можно предположить, что толщина биопленки примерно равна 2,3 мкм, что соответственно меньше, чем у *V. cholerae*  $\text{ctxA}^+ \text{tcpA}^+$  штаммов (рис. 2б, 3б).

#### Обсуждение

В результате электронно-микроскопического исследования образцов биопленок холерных вибрионов  $\text{ctxA}^+ \text{tcpA}^-$  и  $\text{ctxA}^- \text{tcpA}^-$  штаммов выявлены различия в биопленкообразовании взятых в эксперимент штаммов. Сравнительный анализ микрофотографий показывает, что образование биопленки на поверхности хитина у холерных вибрионов происходит независимо от наличия гена холерного токсина *ctxA* и токсин-корректируемых пилей адгезии *tcpA*, однако интенсивность биопленкообразования у данных штаммов различна. Для оценки интенсивности биопленкообразования мы сравнивали следующие структурные особенности биопленок: толщину биопленки, электронноплотность матрикса, морфологию клеток в составе биопленки и степень деградации хитинового субстрата. Исходя из полученных данных, токсигенные штаммы *V. cholerae* с наличием гена  $\text{tcpA}^+$  обладают большей интенсивностью биопленкообразования, чем нетоксигенные, у которых ген *tcpA* отсутствует. На это указывают большая толщина биопленки, объем и плотность матрикса. Активность холерных вибрионов в составе биопленок также различна. Если клетки в составе биопленки *V. cholerae*  $\text{ctxA}^+ \text{tcpA}^+$  располагаются преимущественно одиночно и поверхность хитинового экзоскелета, с которой они контактируют, интактна, то клетки в составе биопленки *V. cholerae*  $\text{ctxA}^- \text{tcpA}^-$  образуют цепочки, что указывает на процессы деления, а разрозненный хитин эндокутикулы свидетельствует об активности метаболических процессов.

Данный факт согласуется с результатами, опубликованными ранее авторами [3–5,16,17,26,27], показывающими, что холерные вибрионы, имеющие

**Рисунок 5. Взаимодействие клеток *V. cholerae* в составе биопленок с поверхностью субстрата**  
**Figure 5. Interaction of *V. cholerae* cells in biofilms with the substrate surface**



Примечание: а) адгезия клеток *V. cholerae* 19613 ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> к поверхности хитинового субстрата (стрелка указывает место прикрепления клетки к субстрату), увеличение ×80000, маркер – 500 нм; б) деградация хитина клетками *V. cholerae* 20000 ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>, увеличение ×60000, маркер – 500 нм; в) адгезия клеток *V. cholerae* 19241 ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> к поверхности хитинового субстрата на ранних стадиях культивирования биопленки, стрелки указывают на зоны лизиса эпикутикулы, увеличение ×30000, маркер – 1 мкм; г) зрелая биопленка *V. cholerae* 19241 ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> (стрелками показаны отсутствующие поверхностные слои хитинового экзоскелета в области формирования биопленки, маркер красного цвета), увеличение ×30000, маркер – 1 мкм. ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII) и цитратом свинца.

Note: a) adhesion of *V. cholerae* 19613 ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> cells to the chitin substrate surface (the arrow indicates the place of cell attachment to the substrate), magnification ×80000, marker – 500 nm; b) degradation of chitin by *V. cholerae* cells 20000 ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>, magnification ×60000, marker – 500 nm; c) adhesion of *V. cholerae* 19241 ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> cells to the surface of the chitin substrate at the early stages of biofilm cultivation, arrows indicate the epicuticle lysis zones, magnification ×30000, marker – 1 μm; d) mature biofilm of *V. cholerae* 19241 ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> (arrows indicate the missing surface layers of the chitinous exoskeleton in the region of biofilm formation, red marker), magnification ×30000, marker – 1 μm. TEM, staining with osmium (VIII) tetroxide and lead citrate.

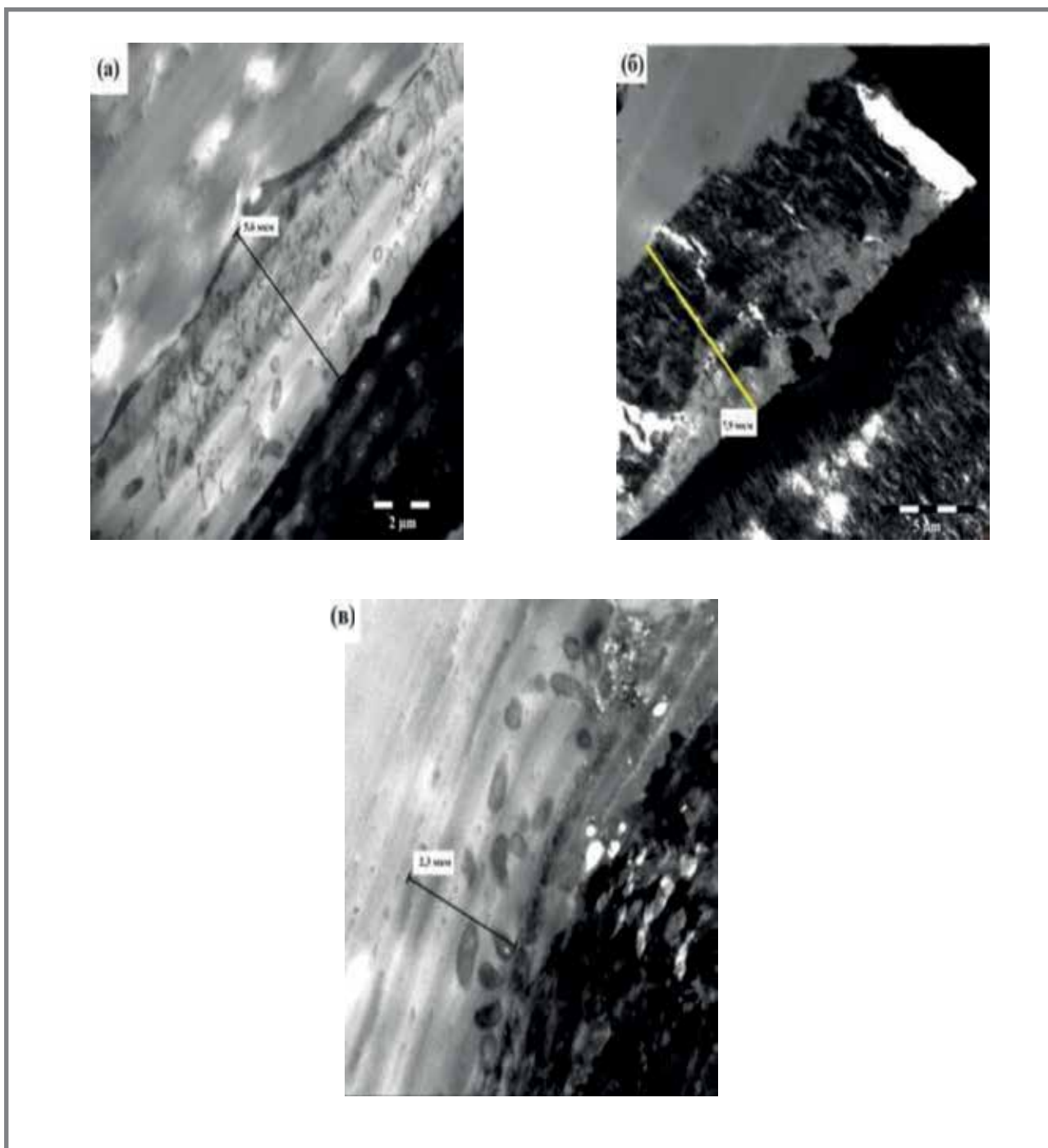
ген *tcpA*, обладают большей интенсивностью биопленкообразования, что, в свою очередь, указывает на эпидемическую значимость феномена биопленкообразования и свидетельствует

о важной роли хитина для персистенции холерных вибрионов в условиях гидробиоценозов водоемов и возможности выживания и сохранения эпидемически значимых штаммов. Интенсивность



Рисунок 6. Биопленки *V. cholerae* *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>

Figure 6. Biofilms *V. cholerae* *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>



Примечание: а) биопленка *V. cholerae* 19613 *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup> (толщина биопленки 5,6 мкм), увеличение  $\times 10000$ , маркер – 2 мкм; б) биопленка *V. cholerae* 19241 (толщина биопленки 7,9 мкм), увеличение  $\times 8000$ , маркер – 5 мкм; в) биопленка *V. cholerae* 20000 *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup> (толщина биопленки 2,3 мкм), увеличение  $\times 12000$ , маркер – 2 мкм. ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII) и цитратом свинца.

Note: a) biofilm *V. cholerae* 19613 *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup> (biofilm thickness 5,6  $\mu\text{m}$ ), magnification  $\times 10000$ , marker – 2  $\mu\text{m}$ ; b) biofilm *V. cholerae* 19241 (biofilm thickness 7,9  $\mu\text{m}$ ), magnification  $\times 8000$ , marker – 5  $\mu\text{m}$ ; c) *V. cholerae* 20000 *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup> biofilm (biofilm thickness 2,3  $\mu\text{m}$ ), magnification  $\times 12000$ , marker – 2  $\mu\text{m}$ . TEM, staining with osmium (VIII) tetroxide and lead citrate.

биопленкообразования у нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, не содержащих ген *tcpA*, менее выражена, однако биопленкообразующая способность у них сохранена, что, по некоторым данным, указывает на то, что TCP при биопленкообразовании принимают участие в межклеточном взаимодействии, усиливая quorum sensing, а адгезия к субстрату осуществляется в основном

за счет хитин-корректируемых пилей, маннозочувствительного гемагглютинаина и хитин-связывающих белков. Более ранняя активация quorum sensing у *tcpA*<sup>+</sup> штаммов способствует большей интенсивности биопленкообразования и раннему переходу клеток в покоящееся состояние по сравнению с *tcpA*<sup>-</sup> штаммами, что может приводить к искажению результатов эпидемиологических



обследований и мониторинга состояния природных водоемов.

### Заключение

Используемые в работе штаммы *V. cholerae*, независимо от наличия или отсутствия генов *ctx* и *tcp*, образуют биопленки на хитиновом субстрате. Показатель биопленкообразования по толщине матрикса биопленки выше у *V. cholerae ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>*,

по степени деградации хитинового субстрата выше у *V. cholerae ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>*. Холерные вибрионы, имеющие ген *tcpA*, обладают большей интенсивностью биопленкообразования, что, в свою очередь, указывает на эпидемическую значимость феномена биопленкообразования и свидетельствует о важной роли хитина для персистенции холерных вибрионов в условиях гидробиоценозов водоемов и возможности выживания и сохранения эпидемически значимых штаммов.

### Литература

1. Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis // PLOS Neglected Tropical Diseases. 2016. Vol. 10, N2. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
2. Rahman H., Mahub K.R., Vergara G.E., et al. Protozoal food vacuoles enhance transformation in *Vibrio cholerae* through SOS-regulated DNA integration // The ISME Journal. 2022. Vol. 16. P. 1993–2001. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01249-0>
3. Pruzzo C., Vezzulli L., Colwell R.R. Global impact *Vibrio cholerae* interactions with chitin // Environ. Microbiol. 2008. Vol. 10. P. 1400–1410. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01559.x>
4. Vezzulli L., Guzman C.A., Colwell R.R., Pruzzo C. Dual role colonization factors connecting *Vibrio cholerae*'s lifestyles in human and aquatic environments open new perspectives for combating infectious diseases // Curr. Opin. Biotechnol. 2008. Vol. 19. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2008.04.002>
5. Vezzulli L., Granda C., Reidb P.C., et al. Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. Proc Natl Acad Sci USA. 2016. Vol. 23, N113(34). P. 5062–5071. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1609157113>
6. Меньшикова Е. А., Курбатова Е. М., Титова С. В. Экологические особенности персистенции холерных вибрионов: ретроспективный анализ и современное состояние проблемы. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2020. Т.97, №2. С. 165–173. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-165-173; ISSN0372-9311>
7. Меньшикова Е. А., Курбатова Е. М., Водопьянов С. О. и др. Оценка способности холерных вибрионов формировать биопленку на поверхности хитинового панциря речного рака. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021. Т. 98, №4. С. 434–439. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-99>
8. Meibom K.L., Li X.B., Nielsen A.T., et al. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101. P. 2524–2529. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0308707101>
9. Sinha-Ray S., Ali A. Mutation in *fliA* and *mshA* genes of *Vibrio cholerae* inversely involved in *vps* – independent biofilm driving bacterium toward nutrients in lake water. Water. Front. Microbiol. 2017. Sec. Aquatic Microbiology. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01770>
10. Kirn T.J., Jude B.A., Taylor R.K. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. Nature. 2005. Vol. 438. P. 863–866. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature04249>
11. Waldor M.K., Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science. 1996. Vol. 272. P. 1910–1914. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1910>
12. Meibom K.L., Blokesch M., Dolganov N.A., et al. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. Science. 2005. Vol. 310. P. 1824–1827. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1120096>
13. Mondal M., Chatterjee N.S. Role of *Vibrio cholerae* exochitinase ChiA2 in horizontal gene transfer Can. J. Microbiol. 2016. Vol. 62, N3 P. 201–209. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0556>
14. Metzger L.C., Blokesch M. Regulation of competence-mediated horizontal gene transfer in the natural habitat of *Vibrio cholerae*. Curr Open Microbiol. 2016. Vol. 30. P.1–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.10.0070>
15. Worden A.Z., Seidel M., Smriga S., et al. Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine waters. Environ. Microbiol. 2006. Vol. 8. P. 21–29. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00863.x>
16. Sun S., Tay Q.X.M., Kjelleberg S., et al. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. The ISME Journal. 2015. Vol. 9, N8. P. 1812–1820. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.265>
17. Reguera G., Kolter R. Virulence and the environment: a novel role of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. Journal of bacteriology. 2005. Vol. 187, N10. P. 3551–3555. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3551-3555.2005>
18. Chiavelli D.A., Marsh J. W., Taylor R.K. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. Appl. Environ. Microbiol. 2001. Vol. 67, N7. P. 3220–3225. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3220-3225.2001>
19. Jude B.A., Taylor R.K. The physical basis of type 4 pilus-mediated microcolony formation by *Vibrio cholerae* O1. J. Struct. Biol. 2011. Vol. 175, N1. P. 1–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.04.008>
20. Окулич В. К., Кабанова А. А., Плотников Ф. В. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. Витебск: ВГМУ; 2017. 300 с.: ил. ISBN 978-985-466-896-0
21. Водопьянов С. О., Водопьянов А. С., Меньшикова Е. А. и др. Способ моделирования биопленок, формируемых *Vibrio cholerae* O1 серогруппы на поверхности хитина. Патент РФ №2685878; 23.04.2019. Бюл. №12.
22. Головин С. Н., Титова С. В., Симонова И. Р. Способ получения образцов биопленок холерных вибрионов для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии. Патент РФ № 2662938; 30.07.2018. Бюл. №22
23. Марков Е. Ю., Кулчалопа В. С., Урбанович Л. Я. и др. Хитин и продукты его гидролиза в экологии *Vibrio cholerae*. Биохимия. 2015. Т.80, №9. P. 1334–1343. DOI: <http://dx.doi.org/10.1134/S0006297915090023>
24. Дуванова О. В., Мишанькин Б. Н., Водопьянов А. С., Сорокин В. М. N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза холерных вибрионов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2016. Т. 2. С. 41–48. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2016-2-41-48>
25. Головин С. Н., Симонова И. Р., Титова С. В. и др. Изучение биопленок *Vibrio cholerae* методом трансмиссионной электронной микроскопии. Клиническая лабораторная диагностика. 2017. Т. 62, №9. С. 568–576. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-63-9-568-576>
26. Shahkarami M. *Vibrio cholerae* biofilm development on natural and artificial chitin substrates. 2005. Master's Theses. 2839. DOI: <https://doi.org/10.31979/etd.5478-vxaj>
27. Nahar S., Sultana M., Naser M.N., et al. Role of shrimp chitin in the ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* and cholera transmission. Frontiers in Microbiology. 2011. Vol. 2. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00260>

### References

1. Silva AJ, Benitez JA. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2016;10(2). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
2. Rahman H., Mahub K.R., Vergara G.E., et al. Protozoal food vacuoles enhance transformation in *Vibrio cholerae* through SOS-regulated DNA integration. The ISME Journal. 2022;16:1993–2001. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01249-0>
3. Pruzzo C., Vezzulli L., Colwell R.R. Global impact *Vibrio cholerae* interactions with chitin. Environ. Microbiol. 2008;10:1400–1410. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01559.x>
4. Vezzulli L., Guzman C.A., Colwell R.R., Pruzzo C. Dual role colonization factors connecting *Vibrio cholerae*'s lifestyles in human and aquatic environments open new perspectives for combating infectious diseases. Curr. Opin. Biotechnol. 2008;19. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2008.04.002>
5. Vezzulli L., Granda C., Reidb P.C., et al. Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. Proc Natl Acad Sci USA. 2016;23(34): 5062–5071. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1609157113>
6. Men'shikova EA, Kurbatova EM, Titova SV. Ecological features of the persistence of *Vibrio cholerae*: a retrospective analysis and the current state of the problem. Journal. microbiol., epidemiol. and immunobiol. 2020;97(2):165–173 (in Russ). DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-165-173; ISSN0372-9311>
7. Men'shikova EA, Kurbatova EM., Vodop'yanov SO., et al. Evaluation of the ability of cholera vibrios to form a biofilm on the surface of the chitin shell of crayfish. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2021;98(4):434–439 (in Russ). DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-99>

## Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

8. Meibom KL, Li XB, Nielsen AT, et al. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004;101:2524–2529. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0308707101>
9. Sinha-Ray S, Ali A. Mutation in *fliA* and *mshA* Genes of *Vibrio cholerae* Inversely Involved in *vps*-Independent Biofilm Driving Bacterium Toward Nutrients in Lake Water. *Water. Front. Microbiol.*, 2017 Sec. Aquatic Microbiology. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01770>
10. Kim TJ, Jude BA, Taylor RK. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature*. 2005; 438: 863–866. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature04249>
11. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*. 1996;272:1910–1914. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1910>
12. Meibom KL, Blokesch M, Dolganov NA, et al. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science*. 2005;310: 1824–1827. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1120096>
13. Mondal M, Chatterjee NS. Role of *Vibrio cholerae* exochitinase ChiA2 in horizontal gene transfer. *Can J. Microbiol.* 2016;62(3):201–209. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0556>
14. Metzger LC, Blokesch M. Regulation of competence-mediated horizontal gene transfer in the natural habitat of *Vibrio cholerae*. *Curr Open Microbiol.* 2016;30:1–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.10.0070>
15. Worden AZ, Seidel M, Smruga S, et al. Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine waters. *Environ. Microbiol.* 2006;8:21–29. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00863.x>
16. Sun S, Tay QXM, Kjelleberg S, et al. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. *The ISME Journal*. 2015;9(8):1812–1820. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.265>
17. Reguera G, Kolter R. Virulence and the environment: a novel role of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. *Journal of bacteriology*. 2005;187(10):3551–3555. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3551-3555.2005>
18. Chiavelli DA, Marsh JW, Taylor RK. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001;67(7):3220–3225. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3220-3225.2001>
19. Jude BA, Taylor RK. The physical basis of type 4 pilus-mediated microcolony formation by *Vibrio cholerae* O1. *J. Struct. Biol.* 2011;175(1):1–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.04.008>
20. Okulich VK, Kabanova AA, Plotnikov FV. Microbial biofilms in clinical microbiology and antibiotic therapy. *Vitebsk: VSMU*; 2017:300 (in Russ). ISBN 978-985-466-896-0
21. Vodopyanov SO, Vodopyanov AS, Men'shikova EA, Kurbatova EM, Titova SV. A method for modeling biofilms formed by *Vibrio cholerae* O1 serogroup on the surface of chitin. Patent RUS №2685878; 23.04.2019. Byul. №12 (in Russ).
22. Golovin SN, Titova SV, Simonova IR. Method for obtaining samples of biofilms of cholera vibrios for examination by transmission electron microscopy. Patent RUS №2662938; 30.07.2018. Byul. №22 (in Russ).
23. Markov E Ju, Kulikalova ES, Urbanovich LJ, et al. Chitin and its hydrolysis products in the ecology of *Vibrio cholerae*. *Biochemistry*. 2015;80(9):1334–1343 (in Russ). DOI: <http://dx.doi.org/10.1134/S0006297915090023>
24. Duvanova OV, Mishan'kin BN, Vodopyanov AS, Sorokin VM. N - acetyl-β-D-glucosaminidase of cholera vibrios. *Journal. microbiol., epidemiol. immunobiol.* 2016;2:41–48 (in Russ). DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2016-2-41-48>
25. Golovin SN, Simonova IR, Titova SV, et al. The study of *Vibrio cholerae* biofilms by transmission electron microscopy. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2017;62(9):568–576 (in Russ). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-63-9-568-576>
26. Shahkarami M. *Vibrio cholerae* biofilm development on natural and artificial chitin substrates. 2005. Master's Theses. 2839. DOI: <https://doi.org/10.31979/etd.5478-vxaj>
27. Nahar S, Sultana M, Naser MN, et al. Role of shrimp chitin in the ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* and cholera transmission. *Frontiers in Microbiology*. 2011;2. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00260>

### Об авторах

- **Светлана Викторовна Титова** – к. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. +7 (863) 240-91-08, [titova\\_sv@antiplague.ru](mailto:titova_sv@antiplague.ru). ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7831-841X>.
- **Ирина Рафиковна Симонова** – старший научный сотрудник лаборатории диагностических препаратов, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. ORCID <https://orcid.org/0000-0001-8261-2294>.
- **Елена Аркадьевна Меньшикова** – к. б. н., с. н. с. отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. [menshikova\\_ea@antiplague.ru](mailto:menshikova_ea@antiplague.ru). ORCID <https://orcid.org/0000-0002-6003-4283>.
- **Виктория Сергеевна Осадчая** – лаборант-исследователь лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Поступила: 13.01.2023. Принята к печати: 06.05.2023.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

### About the Authors

- **Svetlana V. Titova** – Cand. Sci. (Med.), leading researcher, laboratories of natural focal and zoonotic infections, FKUZ Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор. +7 (863) 240-91-08, [titova\\_sv@antiplague.ru](mailto:titova_sv@antiplague.ru). ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7831-841X>.
- **Irina R. Simonova** – senior Researcher, laboratories of diagnostic preparations FKUZ Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор. ORCID <https://orcid.org/0000-0001-8261-2294>.
- **Elena A. Menshikova** – Cand. Sci. (Biol.), senior researcher Department of Microbiology of cholera and other acute intestinal infections, FKUZ Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор. [menshikova\\_ea@antiplague.ru](mailto:menshikova_ea@antiplague.ru). ORCID <https://orcid.org/0000-0002-6003-4283>. **Victoria S. Osadchaya** – laboratory assistant of the laboratories of natural focal and zoonotic infections, FKUZ Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор.

Received: 13.01.2023. Accepted: 06.05.2023.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.