

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-150-153

УДК 616.932

С.П. Заднова, Д.В. Баданин, Н.А. Плеханов, Т.А. Полунина, Н.В. Котова, А.А. Крицкий,
А.В. Федоров, Я.М. Краснов

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ПРОТЕОМНЫЕ ПРОФИЛИ ТИПИЧНОГО ШТАММА И ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННОГО ВАРИАНТА *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 СЕРОГРУППЫ БИОВАРА ЭЛЬ ТОР

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

Цель работы – выявление различий в продукции белков у типичного штамма и генетически измененного варианта *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор. **Материалы и методы.** В качестве модельных использовали природные штаммы M1062 (Астрахань, 1970 г.) и M1509 (Москва, 2012 г.). Штаммы культивировали на агаре Лурия-Бертани при температуре 37 °С. Электрофорез проводили по методу W.K. Laemmli (1970 г.), масс-спектрометрическое профилирование – согласно методу, описанному A. Shevchenko *et al.* **Результаты и обсуждение.** Масс-спектрометрическое сканирование лизатов клеток исследуемых штаммов показало значительное сходство их протеомов (615 общих белков). Выявленные различия касались повышенной экспрессии у штамма M1062 белков, которые участвуют в биосинтезе ДНК/РНК, входящих в группу «пурины, пиримидины, нуклеозиды», а также регуляторных белков. У штамма M1509 увеличен биосинтез белков, ответственных за патогенез, адаптацию при действии неблагоприятных факторов внешней среды, входящих в группу «кофакторы, витамины, пигменты», участвующих в липидном, углеводном, белковом обменах, клеточных процессах, и белков-транспортёров. Высказано предположение, что широкое распространение геновариантов Эль Тор, возможно, обусловлено повышением патогенных и адаптивных свойств, а также существенной перестройкой метаболизма клеток.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, протеомное сканирование.

Корреспондирующий автор: Заднова Светлана Петровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Заднова С.П., Баданин Д.В., Плеханов Н.А., Полунина Т.А., Котова Н.В., Крицкий А.А., Федоров А.В., Краснов Я.М. Сравнительные протеомные профили типичного штамма и генетически измененного варианта *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор. Проблемы особо опасных инфекций. 2020; 3:150–153. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-150-153

Поступила 21.10.19. Отправлена на доработку 26.12.19. Принята к публ. 20.01.20.

S.P. Zadnova, D.V. Badanin, N.A. Plekhanov, T.A. Polunina, N.V. Kotova, A.A. Kritsky, A.V. Fedorov,
Ya.M. Krasnov

Comparative Proteomic Profiles of Typical Strain and Genetically Altered Variant of *Vibrio cholerae* O1, Biovar El Tor

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was to identify the differences in the production of proteins in typical strain and genetically altered variant of *V. cholerae* O1, biovar El Tor. **Materials and methods.** Natural strains M1062 (Astrakhan, 1970) and M1509 (Moscow, 2010) were used as model strains in this work. Strains were cultivated on Luria Bertani agar at 37 °C. Electrophoresis was performed in accordance with W.K. Laemmli technique (1970), mass-spectrometric profiling – the method described by A. Shevchenko *et al.* **Results and discussion.** Mass-spectrometric scanning of cell lysates of the examined strains showed significant similarity of their proteomes (615 common proteins). The identified differences pertained to high expression of proteins in the strain M1062, participating in biosynthesis of DNA/RNA, included into “purines, pyrimidines, nucleosides” group, as well as regulatory proteins. In M1509 strain, biosynthesis of the proteins responsible for pathogenesis, adaptation under the influence of unfavorable environmental factors, included into “co-factors, vitamins, pigments” group, involved in lipid, carbohydrate, and protein metabolism, cellular processes, as well as proteins-transporters was increased. It has been suggested that the wide dissemination of El Tor genovariants is probably due to enhanced pathogenic and adaptive properties and also to the considerable transformation of cell metabolism.

Key words: *Vibrio cholerae* biovar El Tor, proteomic scanning.

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

Corresponding author: Svetlana P. Zadnova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Zadnova S.P., Badanin D.V., Plekhanov N.A., Polunina T.A., Kotova N.V., Kritsky A.A., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M. Comparative Proteomic Profiles of Typical Strain and Genetically Altered Variant of *Vibrio cholerae* O1, Biovar El Tor. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2020; 3:150–153. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-150-153

Received 21.10.19. Revised 26.12.19. Accepted 20.01.20.

Zadnova S.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>
Badanin D.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9662-8438>
Plekhanov N.A., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2355-7018>
Polunina T.A., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2234-2760>
Kotova N.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9270-523X>
Kritsky A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>
Fedorov A.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7190-4427>
Krasnov Ya.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

К настоящему времени известно более 200 серогрупп штаммов *Vibrio cholerae*. Однако только токсигенные штаммы O1 и O139 серогрупп способны вызывать эпидемии и пандемии холеры. При этом штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы на основе биовара – классический и Эль Тор. В результате эволюционных преобразований штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор возникли различные генетически измененные варианты вибрионов Эль Тор (геноварианты) с повышенной вирулентностью, в том числе Матлабские, Мозамбикские и Гаитянские. Основное отличие Эль Тор геновариантов от типичных штаммов заключалось в биосинтезе повышенных количеств холерного токсина классического типа в результате приобретения аллеля *ctxB1* классических вибрионов [1, 2]. В настоящее время широкое распространение в мире получили Гаитянские варианты, вызвавшие в 2010 г. тяжелую эпидемию холеры на острове Гаити. При молекулярно-генетическом исследовании данных штаммов показано, что они отличаются не только от типичных изолятов, но и от других вариантов Эль Тор и имеют измененное строение суперинтегрона, острова пандемичности VSP-II, SXT элемента. Кроме того, SNPs выявлены в генах *tcpA*, *ctxB*, *rtxA*, *rstB*, кодирующих ключевые факторы колонизации и патогенеза *V. cholerae* [3–5]. Высказывается предположение, что изменения структуры генома могли быть причиной не только повышения вирулентности геновариантов Эль Тор, но и лучшего их сохранения во внешней среде [3]. Необходимо отметить, что штаммы, имеющие структуру генома, подобную Гаитянским вариантам, в 2012 и 2014 гг. завезены и в Российскую Федерацию [6].

Несмотря на активно проводимые исследования фенотипических и молекулярно-генетических свойств геновариантов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, многие вопросы их биологии изучены не в полной мере. В том числе недостаточно данных по сравнительному анализу экспрессии белков у типичных изолятов и генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор. Эти данные необходимы для получения более полной информации о циркулирующих в современный период штаммах возбудителя холеры, а также изучения вопросов доминирования и широкого распространения геновариантов. В связи с вышеизложенным целью нашей работы стало выявление различий в продукции белков у типичного штамма и генетически измененного варианта *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов и условия выращивания. В качестве модельных использованы типичный штамм *V. cholerae* M1062 O1 серогруппы биовара Эль Тор серовара Огава, выделенный в 1970 г. при вспышке холеры в Астрахани, а также геновариант из группы Гаитянских штаммов –

V. cholerae M1509 O1 серогруппы биовара Эль Тор серовара Огава, завезенный туристом в 2012 г. в Москву из Индии. Указанные клинические штаммы хранились в лиофильно высушенном состоянии в Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Культивирование штаммов осуществляли на агаре Лурия-Бертани (HiMedia, Индия) pH (7,0±0,2) в течение 16–17 ч при температуре 37 °C. Выросшую культуру центрифугировали, получая осадок клеток.

Электрофорез белков. Одномерный электрофорез образцов лизатов клеток проводили в 12,5 % полиакриламидном геле по методу W.K. Laemmli [7]. Для визуализации белков пластину геля после электрофореза окрашивали Кумасси синим G-250.

Молекулярное масс-спектрометрическое сканирование. Для выполнения масс-спектрометрического сканирования окрашенную пластину полиакриламидного геля, полученную после проведения одномерного электрофореза, нарезали на белковые полосы с различными интервалами молекулярных масс (116,0–34,0; 35,0–19,0; 20,0–14,5 кДа). Далее белки в геле гидролизовали трипсином [8]. Полученную триптическую смесь пептидов разделяли с помощью системы высокоэффективной жидкостной нано-хроматографии на хроматографической колонке AcclaimPepMap™100 75 µm x 25 cm, nanoViper C18, 3 µm, 100 Å (Thermo Fisher Scientific, USA). Масс-спектры получали на тандемном квадрупольном времяпролетном масс-спектрометре с высоким разрешением класса ESI-Q. Идентификацию белков проводили с помощью программы Mascot в режиме поиска MS/MS Ion search относительно базы данных NCBI с таксономическим ограничением для исследуемого вида микроорганизмов. В качестве вариабельных модификаций выбрали карбамидометилирование цистеина, окисление метионина и ацетилирование лизина. Допустимое отклонение для масс пептидных ионов устанавливали равным 20 ppm, для фрагментарных ионов – 0,1 Да, минимальное число уникальных пептидов одного белка ≥2. Белки, имеющие критерии достоверности score >18, считались идентифицированными надежно. Белки распределяли на функциональные группы в соответствии со схемой, предложенной зарубежными исследователями (www.tigr.org).

Статистический анализ. Статистический анализ полученных экспериментальных данных осуществляли при помощи программ Microsoft Excel (стандартный пакет программ Microsoft Office 2010, США) и Statistica 6.0 (Statsoft, Россия).

Результаты и обсуждение

При молекулярном масс-спектрометрическом сканировании лизатов клеток у типичного штамма *V. cholerae* M1062 выявлено 787 белков, у штамма *V. cholerae* M1509 – 707. При этом 615 белков, необходимых для обеспечения жизнедеятельности

бактериальных клеток, поддержания структуры клеточной оболочки, репарации ДНК, обнаружены у обоих штаммов. Особый интерес вызвали оставшиеся протеины (уникальные для каждого штамма), которые и были взяты для последующего анализа. В соответствии с выполняемой в клетке функцией и согласно используемой зарубежными исследователями классификации данные белки распределили по 13 различным функциональным группам: компоненты клеточной стенки; регуляторные белки; белки с неизвестной функцией; белки патогенности; транспортные белки; белки, участвующие в биосинтезе аминокислот/белка; липидном и углеводном обменах; образовании ДНК/РНК; адаптации; клеточных процессах; белки, входящие в группы «кофакторы, витамины, пигменты» и «пурины, пиримидины, нуклеозиды».

В итоге у анализируемых штаммов практически не выявлены различия в продукции белков, необходимых для биосинтеза клеточной стенки (3,3 % у M1509 и 3,5 % у M1062) и с неустановленной функцией (7,6 % у M1509 и 8,1 % у M1062). Однако у штамма M1062, в отличие от M1509, обнаружена повышенная (на 2,6 %) экспрессия регуляторных белков, а также белков, необходимых для биосинтеза ДНК/РНК (на 6,8 %) и входящих в группу «пурины, пиримидины, нуклеозиды» (на 3,0 %). При этом регуляторные белки включали в основном регуляторы транскрипции. Отличий в биосинтезе глобальных белков-регуляторов, а также участвующих в контроле биосинтеза факторов патогенности не выявлено. Штамм *V. cholerae* M1509 синтезирует в большем количестве белки, участвующие в патогенезе (на 4,8 %); адаптации холерного вибриона при действии неблагоприятных факторов внешней среды (на 4,6 %); липидном (на 2,4 %) и углеводном (на 1,6 %) обменах; биосинтезе аминокислот и белков (на 1,3 %); белков-транспортёров аминокислот, пептидов, углеводов (на 5,1 %); относящихся к группе «кофакторы, витамины, пигменты» (на 3,5 %); обеспечивающих различные клеточные процессы: дыхание, сборка рибосом, ассимиляция азота, образование запасных веществ и т.д. (на 5,6 %). Необходимо отметить, что, несмотря на данные литературы о повышенной подвижности геновариантов Эль Тор по сравнению с типичными изолятами [5], у анализируемых нами штаммов не обнаружено отличий по продукции белков, обеспечивающих подвижность/хемотаксис клеток.

Выявление у штамма *V. cholerae* M1509 увеличенного количества белков, необходимых для проявления патогенных свойств, было вполне ожидаемым, учитывая то, что геноварианты Эль Тор вызывают клинически тяжелые случаи холеры с высокой смертностью, а также продуцируют значительно больше холерного токсина, чем типичные изоляты [1, 2, 5]. Увеличенный биосинтез белков, способствующих выживанию патогена при действии различных неблагоприятных факторов внешней среды, согласуется с ранее полученными нами, а также

зарубежными исследователями данными о повышенных адаптационных свойствах вариантов Эль Тор по сравнению с типичными изолятами [5, 9]. Значительные различия в экспрессии белков, участвующих в углеводном, липидном, белковом обменах, а также белков-транспортёров и относящихся к группе «кофакторы, витамины, пигменты» могут указывать на интенсивно протекающие метаболические процессы у данных штаммов. Возможно, увеличенная экспрессия белков, участвующих в метаболических процессах, является одной из причин выявленного нами ранее повышенного роста бактериальной популяции Эль Тор вариантов по сравнению с типичными штаммами [9].

Другим важным моментом, на который стоит обратить внимание, является обнаружение у штамма M1509 биосинтеза двух белков, входящих в систему секреции 6 типа (Т6СС). У типичного штамма Т6СС белки не выявлены. Согласно данным литературы, контакт-зависимая система секреции 6 типа используется холерным вибрионом для уничтожения бактерий, амёб, иммунных клеток макроорганизма, фагоцитов. Показано, что штаммы с повышенной экспрессией белков Т6СС лучше выживают как во внешней среде, так и в кишечнике человека. Гены, кодирующие белки Т6СС, присутствуют в геноме всех штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, но у типичных штаммов их экспрессия происходит только *in vivo* [10]. В то же время сведения о продукции данных белков у геновариантов отсутствуют. Обнаружение экспрессии *in vitro* белков Т6СС у штамма M1509 может указывать на повышенный адаптационный потенциал вариантов Эль Тор.

Необходимо также отметить выявление у анализируемых штаммов различий в содержании ферментов, участвующих в биосинтезе (дигуанилат циклаза) и деградации (дигуанилат фосфодиэстераза) 3'-5'-циклического дигуанилатмонофосфата c-di-GMP, который является важной сигнальной молекулой, контролирующей транскрипцию генов, необходимых для продукции холерного токсина, формирования биопленки, а также подвижности. K.J.F. Satchell *et al.* показали, что геноварианты, в отличие от типичных штаммов, имеют SNPs в генах *cdgM* и *cdgL*, кодирующих дигуанилат циклазу, поэтому данные штаммы синтезируют меньше c-di-GMP, чем типичные изоляты [5]. Проведенный нами анализ выявил, что действительно в типичном штамме M1062 присутствует белок с дигуанилат циклазным доменом, а у штамма *V. cholerae* M1509 обнаружена только дигуанилат фосфодиэстераза.

Таким образом, при молекулярном протеомном сканировании типичных и генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор установлено значительное сходство их протеомов, обусловленное биосинтезом белков, необходимых для обеспечения жизнедеятельности клетки, входящих в состав клеточной оболочки, участвующих в репарации ДНК, а также гипотетических белков. При этом в типичном

штамме обнаружена повышенная экспрессия регуляторных белков, а также белков, участвующих в биосинтезе ДНК/РНК и составляющих группу «пурины, пиримидины, нуклеозиды». В то же время у геноварианта увеличена экспрессия белков, ответственных за патогенез, адаптацию при действии неблагоприятных факторов внешней среды, а также участвующих в липидном, углеводном, белковом обменах, белков-транспортеров и относящихся к группе «кофакторы, витамины, пигменты». Возможно, что именно такое удачное сочетание повышения патогенных и адаптивных свойств, а также изменение метаболизма клеток явилось одной из причин доминирования и широкого распространения генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор.

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

Список литературы

1. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. 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):3296–9. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002.
2. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. doi: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
3. Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E., Haley B., Chun J., Brettin T.S., Bruce D.C., Detter J.C., Han C.S., Chertkov O., Challacombe J., Huq A., Nair G.B., Colwell R.R. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B33 and CIRS101 and comparative genomics with *V. cholerae*. *J. Bacteriol.* 2010; 192:3524–33. DOI: 10.1128/JB.00040-10.
4. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11):3739–49. DOI: 10.1128/JCM.01286-11.
5. Satchell K.J., Jones C.J., Wong J., Queen J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun.* 2016; 84(9):2473–81. DOI: 10.1128/IAI.00189-16.
6. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Кульшань Т.А., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Микроэволюция возбудителя холеры в современный период. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2014; 69(7–8):46–53. DOI: 10.15690/vramn.v69i7-8.1109.
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
8. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*. 2006; 1(6):2856–60. DOI: 10.1038/nprot.2006.468.
9. Заднова С.П., Крицкий А.А., Плеханов Н.А., Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ адаптационных свойств типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tor. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2019; 2:25–30. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-2-25-30.

10. Conner J.G., Teschler J.K., Jones C.J., Yildiz F.H. Staying alive: *Vibrio cholerae*'s cycle of environmental survival, transmission, and dissemination. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4(2):VMBF-0015-2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015.

References

1. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. 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):3296–9. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002.
2. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. doi: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
3. Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E., Haley B., Chun J., Brettin T.S., Bruce D.C., Detter J.C., Han C.S., Chertkov O., Challacombe J., Huq A., Nair G.B., Colwell R.R. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B33 and CIRS101 and comparative genomics with *V. cholerae*. *J. Bacteriol.* 2010; 192:3524–33. DOI: 10.1128/JB.00040-10.
4. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11):3739–49. DOI: 10.1128/JCM.01286-11.
5. Satchell K.J., Jones C.J., Wong J., Queen J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun.* 2016; 84(9):2473–81. DOI: 10.1128/IAI.00189-16.
6. Smirnova N.I., Agafonov D.A., Kul'shan' T.A., Krasnov Ya.M., Kutyrev V.V. Microevolution of cholera agent in the modern period. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk [Bulletin of the RAMS]*. 2014; 69(7–8):46–53. DOI: 10.15690/vramn.v69i7-8.1109.
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
8. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*. 2006; 1(6):2856–60. DOI: 10.1038/nprot.2006.468.
9. Zаднова S.P., Kritsky A.A., Plekhanov N.A., Cheldyshova N.B., Smirnova N.I. Comparative analysis of adaptation properties in typical and genetically altered *Vibrio cholerae* El Tor strains. *Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology [Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii]*. 2019; 2:25–30. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-2-25-30.
10. Conner J.G., Teschler J.K., Jones C.J., Yildiz F.H. Staying alive: *Vibrio cholerae*'s cycle of environmental survival, transmission, and dissemination. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4(2):VMBF-0015-2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015.

Authors:

Zаднова S.P., Badanin D.V., Plekhanov N.A., Polunina T.A., Kotova N.V., Kritsky A.A., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Заднова С.П., Баданин Д.В., Плеханов Н.А., Полунина Т.А., Котова Н.В., Крицкий А.А., Федоров А.В., Краснов Я.М. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.