



Чувствительность биопленок *Bordetella pertussis* к поливалентной коклюшной сыворотке

Зайцев Е.М.[✉], Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г.

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия

Цель работы — изучение чувствительности биопленок *Bordetella pertussis* к поливалентной коклюшной сыворотке (ПКС).

Материалы и методы. Интенсивность образования биопленок штаммами *B. pertussis* в круглодонных полистироловых 96-луночных планшетах в присутствии ПКС оценивали окрашиванием 0,1% раствором генциан-фиолетового. За титр ПКС принимали наибольшее ее разведение, подавляющее рост биопленочных культур.

Результаты. Титры ПКС, полностью подавлявшие формирование биопленок исследованными штаммами, варьировали от 1 : 1000 до 1 : 20 000. Вакцинный штамм № 475а (серовар 1.2.3) отличался наиболее высокой чувствительностью к ПКС, титр которой составлял 1 : 20 000. Вакцинный штамм № 305 (серовар 1.2.0) и штаммы, выделенные от больных коклюшем в 2001–2010 гг.: № 287 (серовар 1.0.3), № 178 (серовар 1.2.0), № 317 (серовар 1.2.3), были чувствительны к ПКС в титрах 1 : 1000–1 : 2000. Вакцинный штамм № 703 (серовар 1.0.3) был устойчив ко всем исследованным разведениям сыворотки. При посеве супернатантов из лунок с биопленками на плотную питательную среду отмечен рост типичных для *B. pertussis* колоний. Аналогичные результаты получены при посеве супернатантов культур из лунок с отсутствием биопленок.

Закключение. Приведенные данные свидетельствуют о гетерогенности штаммов *B. pertussis* по чувствительности к ПКС. Рост типичных для *B. pertussis* колоний при посеве надосадочной жидкости культур на плотную питательную среду, при отсутствии биопленок в планшетах, свидетельствует о подавлении биопленкообразования ингибированием адгезии микробных клеток на субстрате, а не за счет бактерицидного действия сыворотки.

Ключевые слова: штаммы *B. pertussis*; биопленки; поливалентная коклюшная сыворотка.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Чувствительность биопленок *Bordetella pertussis* к поливалентной коклюшной сыворотке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(5): 413–417.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-3>

Поступила 06.02.2020
Принята в печать 08.07.2020

Sensitivity of *Bordetella pertussis* biofilms to polyvalent pertussis serum

Eugene M. Zaytsev[✉], Marina V. Britsina, Maria N. Ozeretskovskaya, Natalia U. Mertsalova, Irina G. Bazhanova

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia

Aim. Study of the sensitivity of *Bordetella pertussis* biofilms to polyvalent pertussis serum.

Materials and methods. The intensity of biofilm formation by strains of *B. pertussis* in round-bottomed polystyrene 96-well plates in the presence of polyvalent pertussis serum was estimated by staining with 0.1% gentian-violet solution. The serum titer was estimated as a highest dilution, which suppressed the growth of biofilm cultures.

Results. Serum titers that completely suppressed the formation of biofilms by the studied strains ranged from 1 : 1,000 to 1 : 20,000. Vaccine strain No. 475а (serotype 1.2.3) was characterized by the highest sensitivity to serum, the titer of which was 1 : 20,000. Vaccine strain No. 305 (serotype 1.2.0) and strains isolated from whooping cough patients in the period from 2001 to 2010: No. 287 (serotype 1.0.3), No. 178 (serotype 1.2.0), No. 317 (serotype 1.2.3) were sensitive to serum in the titers 1 : 1,000–1 : 2,000. Vaccine strain No. 703 (serotype

1.0.3) was resistant to all serum dilutions studied. When sowing supernatants from wells with biofilms on a dense nutrient medium, the growth of colonies typical for *B. pertussis* was observed. Similar results were obtained when seeding the supernatants of the cultures from the wells with no biofilm.

Conclusion. These data indicate that *B. pertussis* strains are heterogeneous in sensitivity to pertussis serum. The growth of colonies typical for *B. pertussis* when culture supernatants are sown on a dense nutrient medium, in the absence of biofilms in the wells, indicates that the biofilm formation is suppressed by inhibiting the adhesion of microbial cells on the substrate, and not due to the bactericidal action of the serum.

Keywords: *B. pertussis* strains; biofilms; polyvalent pertussis serum.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G. Sensitivity of *Bordetella pertussis* biofilms to polyvalent pertussis serum. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(5): 413–417. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-3>

Received 6 February 2020

Accepted 8 July 2020

Введение

Коклюш остается актуальной проблемой здравоохранения во всем мире, в том числе в странах с высоким уровнем вакцинации. Наблюдаются активизация эпидемического процесса коклюша во всех возрастных группах населения, скрытая циркуляция *Bordetella pertussis*, рост заболеваемости и смертельных исходов [1, 2]. Одной из вероятных причин продолжающегося эпидемического процесса коклюшной инфекции могут быть биопленочные формы *B. pertussis* [3].

Большинство бактерий существуют в природе в виде биопленочных форм. Биопленки отличаются от планктонных (суспендированных) культур измененным спектром экспрессии генов и обладают повышенной устойчивостью к условиям внешней среды, антибиотикам, иммунным факторам [4, 5]. В связи с этим проблема подавления формирования и роста биопленочных форм бактерий продолжает оставаться актуальной для здравоохранения.

Формирование биопленок рассматривается как один из способов преодоления воздействия иммунной системы. Важное значение имеет понимание того, как иммунный ответ влияет на рост биопленок и особенности проявления вирулентности возбудителя. Все основные звенья иммунитета (врожденный и адаптивный, клеточный и гуморальный) имеют эффекторные механизмы, направленные на элиминацию биопленок. Возможны различные механизмы иммунного подавления образования и деструкции биопленок. Антитела к поверхностным адгезинам, фимбриям, участвующим в фиксации биопленок на субстрате, могут ингибировать образование биопленок. Антитела в присутствии компонента могут стимулировать опсонинзависимую активацию фагоцитоза, приводящую к деструкции биопленок. Важное значение для создания высокоэффективных антибиопленочных вакцин имеет выявление структур с антигенными свойствами, присутствующих в биопленках, но отсутствующих

у планктонных форм. Перспективным является изучение возможности использования антител для профилактики образования и деструкции биопленок [6–8].

Механизмы формирования биопленок разными штаммами *B. pertussis*, их чувствительность к иммунным факторам пока изучены недостаточно, по данной проблеме имеются лишь единичные публикации [3].

Цель работы заключалась в изучении чувствительности биопленок штаммов *B. pertussis* к поливалентной коклюшной сыворотке (ПКС).

Материалы и методы

В опытах использовали «вакцинные» штаммы *B. pertussis*, выделенные от больных коклюшем в 1950–1960-е гг., применяющиеся в России для изготовления корпускулярных коклюшных вакцин: штамм № 475a (серовар 1.2.3), селекционированный из штамма № 475, штамм № 305 (серовар 1.2.0), штамм № 703 (серовар 1.0.3), а также выделенные в России от больных коклюшем в 2001–2010 гг. штамм № 178 (серовар 1.2.0), штаммы № 287 (серовар 1.0.3) и № 317 (серовар 1.2.3). В опытах использовали ПКС для реакции агглютинации, полученную из сыворотки крови ослов или кроликов, гипериммунизированных инактивированными, а затем живыми коклюшными микробами (филиал «Медгамал» ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи). Титр ПКС в реакции агглютинации составлял 1 : 16 000, консервант — мертиолят 1 : 10 000. Контроль морфологических, серологических и культуральных свойств штаммов проводили в соответствии с методическими указаниями [9].

В качестве инокулята для получения биопленок использовали ночные культуры штаммов, выращенные на плотной питательной среде («Бордетеллагар», ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск). Суспензию бактерий культивировали в 96-луночных пластиковых планшетах («Nunc») в жидкой синтетической

питательной среде [10]. Культуры штаммов в жидкой синтетической питательной среде в концентрации 5,0 МОЕ в объеме 0,1 мл вносили в лунки планшетов. После этого в лунки добавляли по 0,1 мл ПКС в разведениях 1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 20 000 и 1 : 40 000. Планшеты накрывали крышкой и ставили в термостат при 37°C в горизонтальном положении на ровную поверхность на 24 ч. После культивирования бактерий из лунок планшета с разведениями ПКС 1 : 1000 и 1 : 40 000 осторожно отбирали среду с планктонными клетками в объеме 0,1 мл и высевали на кассеты с плотной питательной средой («Бордетелагар»), которые инкубировали в термостате при 37°C в течение 2 сут.

Интенсивность образования биопленок в планшетах после окрашивания 0,1% раствором генциан-фиолетового оценивали по отношению оптической плотности (ОП) окрашенного растворителя биопленки к негативному контролю (ОП питательной среды = 0,045 ± 0,003) как плотные (ОП > 0,192), умеренные (0,096 < ОП ≤ 0,192), слабые/отсутствие биопленок (ОП ≤ 0,096). Результаты оценивали по значениям титра ПКС, который определяли как наибольшее ее разведение, подавляющее рост биопленочных культур. Для достоверности результатов использовали 4 лунки на один опытный образец и рассчитывали среднюю величину ОП опытного образца и удвоенную ошибку. Сравнения проводили по критерию *t* Стьюдента [11].

Результаты

Результаты исследования чувствительности вакцинных и свежeweыделенных штаммов *B. pertussis*

к ПКС приведены в **таблице**. Для оценки влияния ПКС на рост биопленок определяли ее титр. Контрольные культуры исследованных штаммов, не содержавшие ПКС, различались по интенсивности образования биопленок. Штаммы № 475а и 703 формировали умеренные биопленки, а штаммы № 305, 317, 178 и 287 — плотные биопленки.

Вакцинный штамм № 475а отличался высокой чувствительностью к ПКС, титр которой составлял 1 : 20 000. Только в разведении сыворотки 1 : 40 000 микробные клетки этого штамма формировали умеренные биопленки. Титр ПКС с вакцинным штаммом № 305 составлял 1 : 1000. В присутствии остальных разведений ПКС формировались плотные биопленки. Вакцинный штамм № 703 проявлял устойчивость к действию ПКС и формировал умеренные биопленки при всех исследованных разведениях. Титр ПКС, полностью подавлявшей рост биопленок свежeweыделенных штаммов № 317 и 178, составлял 1 : 1000 с ростом умеренных и плотных биопленок при больших разведениях сыворотки. Титр ПКС со свежeweыделенным штаммом № 287 составлял 1 : 2000 с ростом умеренных и плотных биопленок при разведении ПКС 1 : 20 000 и 1 : 40 000 соответственно. При посеве надосадочной жидкости биопленочных культур всех исследованных штаммов в присутствии ПКС на плотную питательную среду отмечен сплошной рост типичных для *B. pertussis* колоний. Аналогичные результаты получены при посеве надосадочной жидкости культур всех штаммов из лунок с отсутствием биопленок. На плотной питательной среде росли мелкие колонии размером 0,5–1,0 мм, выпуклые,

Влияние ПКС на рост биопленок штаммов *B. pertussis*

Effect of polyvalent pertussis serum on the growth of biofilms of *B. pertussis* strains

Разведение сыворотки Serum dilutions	Значения ОП и интенсивность роста биопленок штаммов <i>B. pertussis</i> Optical density values and growth rate of biofilms of <i>B. pertussis</i> strains					
	вакцинные штаммы vaccine strains			свежeweыделенные штаммы freshly isolated strains		
	475а (1.2.3)	305 (1.2.0)	703 (1.0.3)	317 (1.2.3)	178 (1.2.0)	287 (1.0.3)
1 : 1000	0,068 ± 0,008 Нет No	0,089 ± 0,013 Нет No	0,119 ± 0,025 Умеренная Medium	0,067 ± 0,003 Нет No	0,093 ± 0,020 Нет No	0,061 ± 0,011 Нет No
1 : 2000	0,074 ± 0,004 Нет No	0,230 ± 0,009 Плотная Dense	0,101 ± 0,011 Умеренная Medium	0,104 ± 0,006 Умеренная Medium	0,107 ± 0,008 Умеренная Medium	0,077 ± 0,009 Нет No
1 : 20 000	0,096 ± 0,008 Нет No	0,196 ± 0,013 Плотная Dense	0,165 ± 0,049 Умеренная Medium	0,156 ± 0,008 Умеренная Medium	0,178 ± 0,013 Умеренная Medium	0,155 ± 0,009 Умеренная Medium
1 : 40 000	0,126 ± 0,008 Умеренная Medium	0,276 ± 0,019 Плотная Dense	0,188 ± 0,023 Умеренная Medium	0,204 ± 0,014 Плотная Dense	0,219 ± 0,007 Плотная Dense	0,227 ± 0,013 Плотная Dense
Контроль биопленки Control of biofilm	0,134 ± 0,011 Умеренная Medium	0,269 ± 0,002 Плотная Dense	0,192 ± 0,050 Умеренная Medium	0,218 ± 0,006 Плотная Dense	0,246 ± 0,019 Плотная Dense	0,201 ± 0,019 Плотная Dense

круглые, сероватого цвета, блестящие. Проверка морфологических свойств колоний показала, что это неподвижные, грамотрицательные, овоидной формы мелкие палочки, в мазках располагавшиеся отдельно или парами.

Обсуждение

Биопленки *B. pertussis* имеют важное значение для поддержания эпидемического процесса коклюшной инфекции. В связи с этим актуальным является исследование механизмов формирования биопленок и поиск факторов, влияющих на этот процесс. Механизмы антибиопленочного иммунитета при коклюше практически не изучены и могут быть связаны с эффекторными механизмами клеточного и гуморального иммунитета.

Результаты опытов выявили определенные различия между биопленками исследованных штаммов по чувствительности к ПКС. По отношению к 5 из 6 штаммов выявлена отчетливая зависимость интенсивности роста биопленок от разведения ПКС. Титры ПКС, полностью подавлявшие формирование биопленок исследованными штаммами, варьировали от 1 : 1000 до 1 : 20 000. Наиболее высокой чувствительностью к ПКС отличался вакцинный штамм № 475а. Вакцинный штамм № 305 и свежeweделенные штаммы были чувствительны к ПКС в титрах 1 : 1000–1 : 2000. Вакцинный штамм № 703 обладал устойчивостью ко всем исследованным разведениям ПКС. Полученные результаты указывают на гетерогенность исследованных нами вакцинных и свежeweделенных штаммов *B. pertussis* по чувствительности к ПКС.

Результаты высева супернатантов культур штаммов на плотную питательную среду позволяют сделать определенные выводы о механизме подавления биопленкообразования ПКС. Наличие роста типичных для *B. pertussis* колоний на плотной питательной среде при отсутствии роста биопленок в планшетах указывает на отсутствие бактерицидного действия ПКС и свидетельствует о подавлении биопленкообразования за счет ингибирования адгезии микробных клеток на субстрате. Используемая нами ПКС является суммарной фракцией антител к антигенам коклюшного микроба, среди которых можно предположить наличие антител к другим структурным компонентам помимо агглютиногенов, в том числе факторам, принимающим участие в адгезии микробных клеток на субстрате (пертактин, филаментозный гемагглютинин и др.). Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов о подавлении поликлональными антителами к филаментозному гемагглютинину образования биопленок штаммами *B. pertussis* [12]. Различия между интенсивностью образования биопленок могут быть обусловлены различным соотношением между уровнем экспрес-

сии этих факторов и уровнем антител к ним в составе ПКС.

Полученные нами результаты указывают на целесообразность дальнейшего изучения чувствительности биопленок *B. pertussis* в отношении антител к адгезинам и другим вирулентным факторам коклюшного микроба. Изучение факторов гуморального противококлюшного иммунитета, подавляющих образование биопленок или разрушающих зрелые биопленки, имеет важное научное и практическое значение. Выяснение механизмов антибиопленочного иммунитета будет способствовать расширению наших представлений о патогенезе коклюшной инфекции и причинах продолжающейся циркуляции возбудителя коклюша в условиях широкого охвата населения прививками, а также открывает перспективы для обоснования терапевтического воздействия на биопленки антителами к определенным структурным компонентам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Субботина К.А., Фельдблюм И.В., Кочергина Е.А., Лехтина Н.А. Эпидемиологическое обоснование к изменению стратегии и тактики специфической профилактики коклюша в современных условиях. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019; 18(2): 27–33. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-2-27-33>
2. Di Mattia G., Nicolai A., Frassanito A., Petrarca L., Nenna R., Midulla F. Pertussis: New preventive strategies for an old disease. *Paediatr. Respir. Rev.* 2019; 29: 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2018.03.011>
3. Cattelan N., Dubey P., Arnal L., Yantorno O.M., Deora R. Bordetella biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016; 74(1): fiv108. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv108>
4. Бехало В.А., Бондаренко В.М., Сысолятина Е.В., Нагурская Е.В. Иммунологические особенности бактериальных клеток медицинских биопленок. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии*. 2010; (4): 97–105.
5. Del Pozo J.L. Biofilm-related disease. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2018; 16(1): 51–65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>
6. Чеботарь И.В. Механизмы антибиопленочного иммунитета. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012; 67(12): 22–9.
7. Chung P.Y., Khanum R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2017; 50(4): 405–10. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>
8. Pletzer D., Coleman S.R., Hancock R.E Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr. Opin. Microbiol.* 2016; 33: 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.016>
9. МУК 4.2.2317-08. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий. М.; 2009.
10. Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Культивирование биопленок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; (1): 49–53. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-49-53>
11. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Ленинград; 1962.
12. Serra D.O., Conover M.S., Arnal L., Sloan G.P., Rodriguez M.E., Yantorno O.M., et al. FHA-mediated cell-substrate and

cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One*. 2011; 6(12): e28811.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028811>

REFERENCES

1. Subbotina K.A., Fel'dblyum I.V., Kochergina E.A., Lekhtina N.A. Epidemiological rationale for changing the strategy and tactics of vaccination of pertussis in current conditions. *Epidemiologiya i vaksinooprofilaktika*. 2019; 18(2): 27–33. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-2-27-33> (in Russian)
2. Di Mattia G., Nicolai A., Frassanito A., Petrarca L., Nenna R., Midulla F. Pertussis: New preventive strategies for an old disease. *Paediatr. Respir. Rev*. 2019; 29: 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2018.03.011>
3. Cattelan N., Dubey P., Arnal L., Yantorno O.M., Deora R. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis*. 2016; 74(1): ftv108. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv108>
4. Bekhalo V.A., Bondarenko V.M., Sysolyatina E.V., Nagurskaya E.V. Immunological features of bacterial cells of medical biofilms. *Zhurnal mikrobiologii i immunobiologii*. 2010; (4): 97–105. (in Russian)
5. Del Pozo J.L. Biofilm-related disease. *Expert Rev. Anti Infect. Ther*. 2018; 16(1): 51–65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>

Информация об авторах

Зайцев Евгений Михайлович[✉] — д.м.н., зав. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4813-9074>.
E-mail: pertussis@yandex.ru

Брицина Марина Васильевна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-0790>.
E-mail: britsinamarina@yandex.ru

Озерецковская Мария Николаевна — к.м.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9809-4217>.
E-mail: manja33@yandex.ru

Мерцалова Наталья Устиновна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9072-2538>.
E-mail: n.mertzalova@yandex.ru

Бажанова Ирина Глебовна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1404-1498>.
E-mail: ibajanowa@yandex.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

6. Chebotar' I.V. Mechanisms of antibiofilm immunity. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2012; 67(12): 22–9. (in Russian)
7. Chung P.Y., Khanum R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2017; 50(4): 405–10. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>
8. Pletzer D., Coleman S.R., Hancock R.E. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr. Opin. Microbiol.* 2016; 33: 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.016>
9. MYK 4.2.2317-08 Selection, validation and storage of industrial strains of pertussis, paracoccus and bronchiseptica bacteria. Moscow; 2009. (in Russian)
10. Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G. Cultivation of *Bordetella pertussis* biofilms on abiotic substrate. *Zhurnal mikrobiologii i immunobiologii*. 2019; (1): 49–53. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-49-53> (in Russian)
11. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical Methods in Microbiological Research [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad; 1962. (in Russian)
12. Serra D.O., Conover M.S., Arnal L., Sloan G.P., Rodriguez M.E., Yantorno O.M., et al. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One*. 2011; 6(12): e28811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028811>

Information about the authors

Eugene M. Zaytsev[✉] — Doct. Sci. (Med.), Head, Laboratory of immunomodulators, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4813-9074>.
E-mail: pertussis@yandex.ru

Marina V. Britsina — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-0790>.
E-mail: britsinamarina@yandex.ru

Maria N. Ozeretskovskaya — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9809-4217>.
E-mail: manja33@yandex.ru

Natalia U. Mertsalova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9072-2538>.
E-mail: n.mertzalova@yandex.ru

Irina G. Bazhanova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1404-1498>.
E-mail: ibajanowa@yandex.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.