



Влияние антибиотиков на образование биоплёнки *Streptococcus pyogenes* в условиях *in vitro*

Аджиева А.А.[✉], Данилова Т.А., Данилина Г.А., Шевлягина Н.В., Минко А.Г., Жуховицкий В.Г.

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Цель настоящей работы — изучение влияния антибиотиков оксациллина и цефазолина на рост культуры и образование биоплёнки штамма *Streptococcus pyogenes* 30M в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. Формирование биоплёнок исследовали в световом и сканирующем электронном микроскопе, на стерильных покровных стёклах с использованием специальных питательных сред. Для выявления опытные образцы окрашивали водно-спиртовым раствором альцианового синего.

Результаты. Небольшие количественные дозы (0,01–0,1 мг) оксациллина и цефазолина, независимо от длительности их воздействия, не оказывали негативного влияния как на процесс формирования, так и на готовую стрептококковую биоплёнку. Увеличение количественных доз антибиотиков до 0,5 и 1,0 мг на стадии формирования биоплёнки стрептококка оказывало ингибирующее действие на рост микробных клеток и образование биоплёнки. При действии оксациллина и цефазолина в дозах 0,5 и 1,0 мг на сформированную биоплёнку сохранялась целостность стрептококковых цепочек и биоплёнки. При этом наблюдался эффект скручивания микробных цепочек в шарообразные формы с окрашенной биоплёнкой внутри. Кроме того, отмечалось стимулирующее воздействие цефазолина на готовую стрептококковую биоплёнку. При воздействии на сформированную биоплёнку высоких доз антибиотиков (2 мг и выше) наблюдался разрыв стрептококковых цепочек, при этом оксациллин оказывал разрушающее действие и на микробную биоплёнку. В аналогичных опытах с цефазолином биоплёнка сохранялась, несмотря на то что наблюдался также разрыв микробных цепочек.

Заключение. Выявлены значительные различия в действии испытанных антибиотиков как на зрелую биоплёнку штамма *S. pyogenes* 30M, так и на процесс её формирования.

Ключевые слова: биоплёнка, матрикс, оксациллин, цефазолин, микроскопия, *S. pyogenes*

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Для цитирования: Аджиева А.А., Данилова Т.А., Данилина Г.А., Шевлягина Н.В., Минко А.Г., Жуховицкий В.Г. Влияние антибиотиков на образование биопленки *Streptococcus pyogenes* в условиях *in vitro*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021; 98(1):59–64.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-64>

Influence of antibiotics on biofilm formation by *Streptococcus pyogenes* *in vitro*

Atikat A. Adzhieva[✉], Tatyana A. Danilova, Galina A. Danilina, Natalya V. Shevlyagina, Aleksey G. Minko, Vladimir G. Zhukhovitsky

N.F. Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Aim. To study the effect of the antibiotics oxacillin and cefazolin on culture growth and biofilm formation of *Streptococcus pyogenes* type 30M *in vitro*.

Materials and methods. The formation of biofilms was studied in light and scanning electron microscope, on sterile cover glasses using special nutrient medium. To identify the biofilm, experimental samples were stained with alcohol-water solution of alcian blue.

Results. Small quantitative doses (0.01–0.1 mg) of oxacillin and cefazoline, regardless of the duration of the exposure, did not have a negative effect both on the biofilm formation process and the formed streptococcal biofilm. An increase in quantitative doses of antibiotics to 0.5–1.0 mg at the stage of formation of *Streptococcus*

biofilm had an inhibitory effect on the growth of microbial cells and the formation of biofilm. The integrity of streptococcal chains and biofilm was preserved when oxacillin and cefazoline were applied at a quantity of 0.5–1.0 mg to the formed biofilm. However, in some cases, the twisting of the chains in spherical shape with visible colored biofilm inside was observed. In addition, there was a stimulating effect of cefazoline on the formed *Streptococcal* biofilm. When the formed biofilm was exposed to high doses of antibiotics (2 mg or higher), a break of streptococcal chains was observed, while oxacillin had a destructive effect on the microbial biofilm. In similar experiments with cefazolin, the biofilm was preserved, despite the fact that the destruction of microbial chains was also observed.

Conclusion. Significant differences were found in the effect of tested antibiotics on both the mature *S. pyogenes* type 30M biofilm and the biofilm formation process.

Keywords: *biofilm, matrix, oxacillin, cefazolin, microscopy, Streptococcus pyogenes*

For citation: Adzhieva A.A., Danilova T.A., Danilina G.A., Shevlyagina N.V., Minko A.G., Zhukhovitsky V.G. Influence of antibiotics on biofilm formation by *Streptococcus pyogenes* *in vitro*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(1):59–64. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-64>

Введение

Проблема резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП) остаётся актуальной. Известно, что быстрому распространению генов множественной резистентности способствуют мигрирующие элементы, в частности плазмиды, фаги, включающие данные гены в свой состав и передающие их другим бактериям.

Другим важным фактором, ответственным за повышенную устойчивость бактерий к АБП, являются биоплёнки — способ защиты, позволяющий бактериям выживать и размножаться в условиях макроорганизма [1]. Важным свойством биоплёнок является их способность к адгезии на различных биотических и абиотических поверхностных субстратах [2]. Структура биоплёнки — это непрерывный мультислой бактериальных клеток, заключённых в биополимерный матрикс. В состав матрикса входят белки, нуклеиновые кислоты, липиды, но его главный компонент — экзогенные полисахариды [3, 4]. Матрикс защищает биоплёнку от повреждающих воздействий, в том числе факторов врождённого и приобретённого иммунитета, АБП. В результате биоплёнки значительно менее чувствительны к АБП, чем те же бактерии в планктонной форме, а способность бактерий к формированию биоплёнок является одной из причин хронизации инфекции [5, 6].

Бактерии рода *Streptococcus* обладают наибольшей чувствительностью к АБП пенициллиновой группы и в то же время наименее чувствительны или умеренно чувствительны к цефалоспорином 1–2-го поколения [7]. В связи с этим представляло определённый интерес изучить влияние на рост культуры и биоплёнокообразование *Streptococcus pyogenes* оксациллина и цефазолина — представителей вышеуказанных групп АБП.

Цель исследования — изучение влияния оксациллина и цефазолина на рост культуры и формирование биоплёнки штамма *S. pyogenes* 30M (Пражская коллекция) в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

Рост культуры и процесс формирования биоплёнок исследовали с помощью световой и электронной микроскопии на стерильных покровных стёклах с использованием специальных питательных сред. Покровные стёкла предварительно тщательно промывали, сначала в щелочном растворе детергента, затем в проточной воде, и выдерживали в смеси Никифорова для обезжиривания; стерилизовали в сухо-жаровом шкафу при 180°C в течение 1,5–2,0 ч. Суточную культуру штамма *S. pyogenes* 30M пересевали на бульон Todd Hewitt Broth (ТНВ) с 0,5% экстракта дрожжей и культивировали при 37°C в течение 24 ч. Полученную суспензию штамма *S. pyogenes* 30M доводили до концентрации микробных клеток, соответствующей 1,0 по шкале мутности McFarland с помощью бульона ТНВ с 0,5% экстракта дрожжей; 100 мкл этой суспензии, содержащей $5,0 \times 10^7$ КОЕ/мл штамма *S. pyogenes* 30M, наносили на стерильное покровное стекло размером 24 × 24 мм. Покровные стёкла с суспензиями в стерильных чашках Петри (55 мм) помещали в полиэтиленовые пакеты с полосками смоченной фильтровальной бумаги для создания влажной камеры.

В работе использовали следующие количества оксациллина и цефазолина («Синтез»): 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 и 4,0 мг. Готовили водный раствор АБП с концентрацией 200 мг/мл, который разводили таким образом, чтобы в 10–20 мкл раствора АБП содержалась необходимая опытная доза препарата. Затем препарат добавляли к 80–90 мкл суспензии с $5,0 \times 10^7$ КОЕ/мл штамма *S. pyogenes* 30M, нанесённой на стерильное покровное стекло. В контрольных опытах без воздействия АБП на покровное стекло помещали 100 мкл микробной суспензии, содержащей ту же концентрацию микробных клеток исследуемого штамма.

Исследования проводили в двух вариантах: в первом изучали влияние определённых доз АБП на рост культуры и формирование биоплёнки стреп-

тококка, во втором — влияние тех же доз АБП на готовую сформированную биоплёнку того же микроорганизма. В первом варианте на покровное стекло наносили одновременно микробную суспензию (80–90 мкл) и водный раствор с определённой дозой АБП (в объёме 10–20 мкл). Инкубировали 48 ч при 37°C по вышеописанной методике. Во втором варианте на покровное стекло наносили 80–90 мкл микробной суспензии, содержащей $5,0 \times 10^7$ КОЕ/мл исследуемого штамма микроорганизма. Через 48 ч инкубации при 37°C по вышеописанной методике на это же стекло наносили водный раствор с необходимой количественной дозой АБП (в объёме 10–20 мкл) и продолжали процесс инкубации в тех же условиях. Длительность действия оксациллина и цефазолина составляла 2, 4 и 24 ч. По окончании инкубации покровные стекла с биоплёнкой промывали дистиллированной водой, фиксировали над пламенем и окрашивали в течение 2–3 мин 1% спиртовым раствором альцианового синего («Био-Витрум»), предварительно разведённым дистиллированной водой в соотношении 1: 9 [8].

Препараты просматривали в световом микроскопе «AxioStar plus» («Zeiss») при общем увеличении $\times 400$. Для сканирующей электронной микроскопии препараты фиксировали формалином в течение 24 ч. Фиксированные образцы биоплёнок *S. pyogenes* крепили на алюминиевые столики и напыляли золотом (толщина слоя 5 нм) в модуле для напыления «SPI-Module Sputter Coater» («SPI Supplements»). Для анализа образцов использовали двулучевой ионно-электронный сканирующий микроскоп «Quanta

200 3D» («FEI Company») в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 5–10 кВ.

Результаты

Результаты исследований показали, что в нормальных условиях выращивания, без воздействия АБП, клетки *S. pyogenes* образуют биоплёнку голубоватого цвета, состоящую из полисахаридного матрикса, окружающего стрептококковые цепочки (рис. 1, а).

При исследовании в сканирующем электронном микроскопе выявлена многослойная структура биоплёнки, которая была неравномерной и варьировала от одной до нескольких клеток. Экзомакс более четко виден на участках скопления микроорганизмов (рис. 1, б).

В опытах по изучению воздействия оксациллина и цефазолина на рост культуры и процесс формирования биоплёнки показано, что небольшие дозы антибиотика (0,01, 0,05 и 0,1 мг) не оказывали негативного воздействия как на целостность стрептококковых цепочек, так и на микробную биоплёнку независимо от длительности его воздействия — 2, 4 и 24 ч (рис. 1, а). В то же время при действии АБП в дозах 0,5 и 1,0 мг наблюдалось подавление роста микробных клеток. При световом микроскопировании можно было видеть отдельные кокки и обрывки стрептококковых цепочек по всему полю зрения. Эффект действия АБП в данном количественном диапазоне на стадии роста и формирования биоплёнки стрептококка наблюдался уже после 4-часовой экспозиции. Дальнейшее повышение дозы АБП

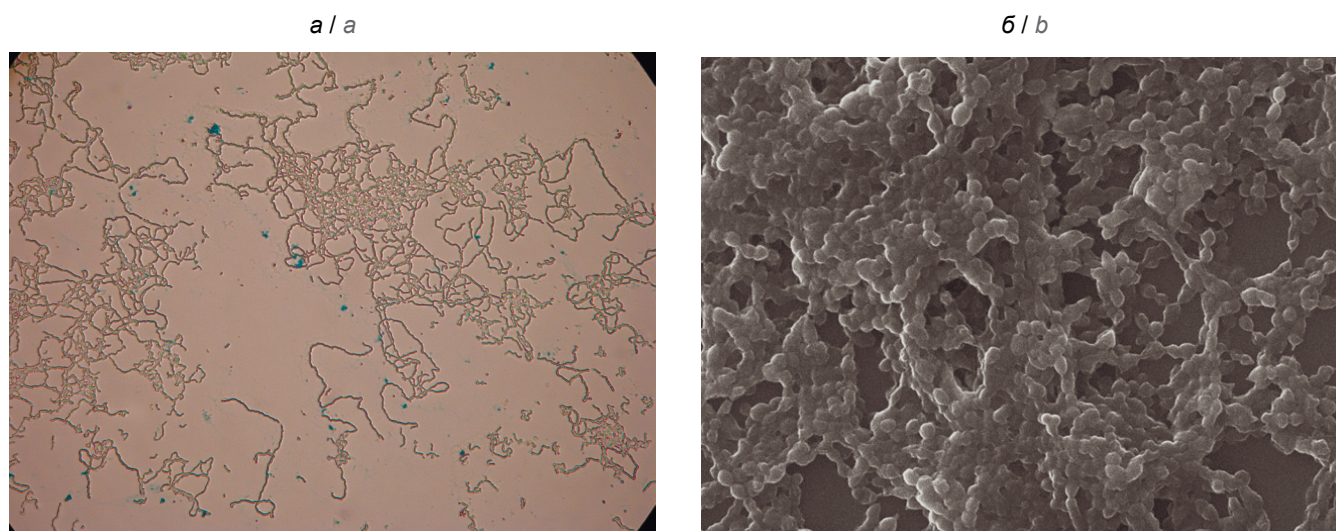


Рис. 1. Микрофотография цепочек и биопленок *S. pyogenes* тип 30М, выращенных на среде ТНВ с 0,5% экстракта дрожжей.

а — световая микроскопия, цепочки кокков, окруженные биопленкой; окраска альциановым синим, $\times 400$;
б — сканирующая электронная микроскопия, многослойная структура клеток, плотно прилегающих друг к другу и частично объединенных экзомаксом.

Fig. 1. Chains and biofilms of *S. pyogenes* type 30M grown on Toood Hewitt Broth medium with 0.5% yeast extract.

а — light microscopy, cocci chains surrounded by biofilm; stained with Alcian Blue, $\times 400$; б — scanning electron microscopy, the multilayer structure of bacterial cells that are tightly adjacent to each other, partially united by an exomatrix.

(до 2 мг и более) и времени их воздействия (4 ч и дольше) на стадии формирования биоплёнки стрептококка приводило к полному подавлению микробного роста и, как следствие, отсутствию биоплёнки.

В опытах по изучению воздействия оксациллина и цефазолина на сформированную биоплёнку установлено, что малые дозы АБП (0,01, 0,05 и 0,1 мг), независимо от времени их воздействия, не нарушали целостность стрептококковых цепочек и готовой биоплёнки. В аналогичных опытах в диапазоне воздействия более высоких доз (0,5 и 1,0 мг) оба АБП также не нарушали целостность стрептококковых цепочек. Однако при этом стабильно наблюдался эффект скручивания последних в шарообразные формы, внутри которых хорошо просматривалась окрашенная биоплёнка (рис. 2). В этом диапазоне концентраций отмечено стимулирующее влияние це-

фазолина на сформированную биоплёнку. При световой и электронной микроскопии опытных образцов с цефазолином можно наблюдать увеличение слоя биополимерного полисахаридного матрикса зрелой биоплёнки, окружающего стрептококковые цепочки. В интервале воздействия самых высоких доз АБП (2 и 4 мг) на готовую биоплёнку наблюдался разрыв микробных цепочек на отдельные фрагменты. При этом под воздействием оксациллина отмечался не только разрыв стрептококковых цепочек, но и разрушение биоплёнки (рис. 3, а). В аналогичных опытах с цефазолином, несмотря на разрыв микробных цепочек, биоплёнка сохранялась (рис. 3, б).

Обсуждение

Применение покровных стёкол в качестве абиотической поверхности даёт возможность наблюдать

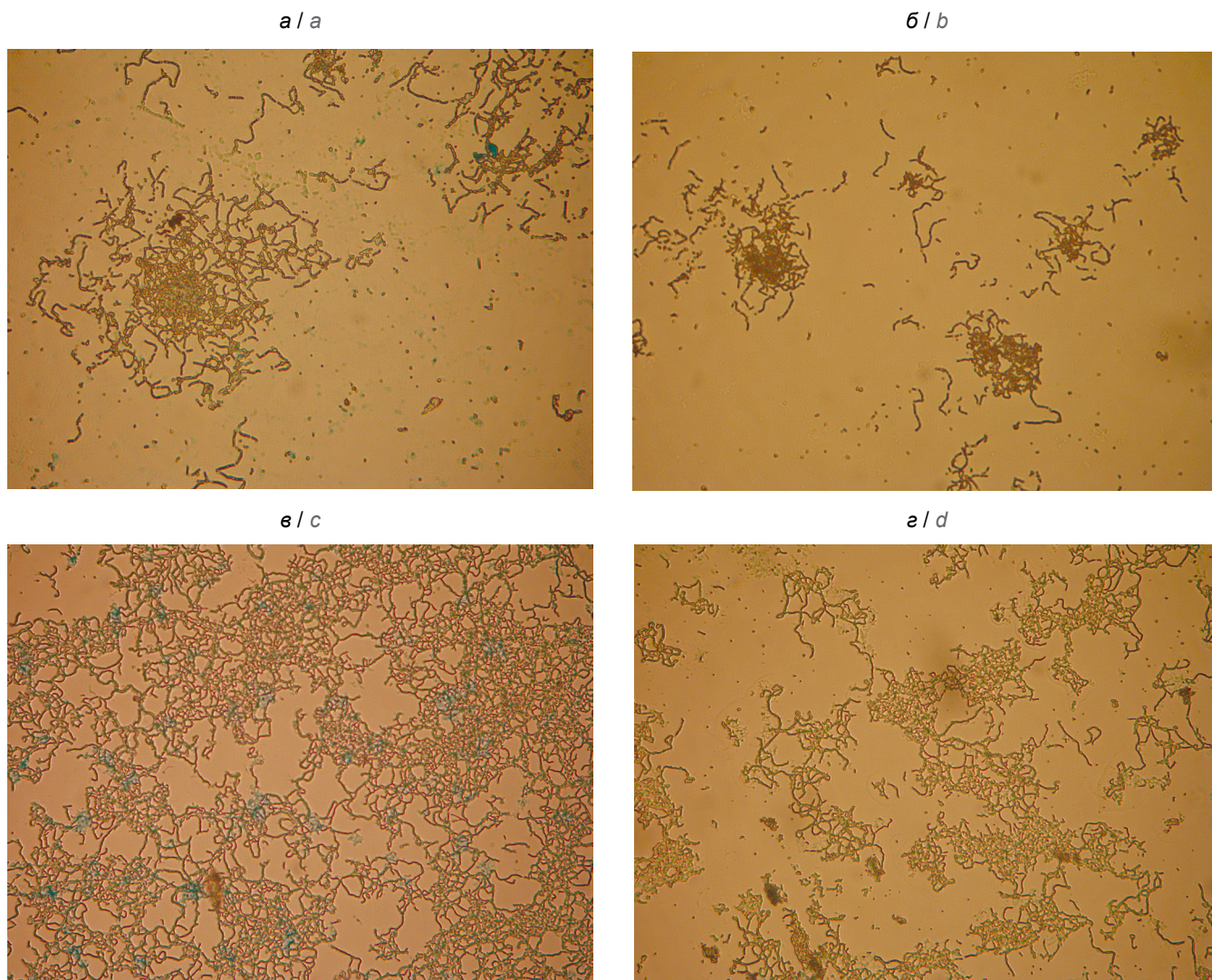


Рис. 2. Микрофотография цепочек и готовой сформированной биоплёнки *S. pyogenes* 30M под воздействием низких доз АБП.

а — оксациллин, 0,5 мг; б — оксациллин, 1,0 мг; в — цефазолин, 0,5 мг; г — цефазолин, 1,0 мг. Окраска альциановым синим, × 400.

Fig. 2. Chains and biofilm of *S. pyogenes* type 30M under the influence of the low doses of antibiotics.

а — oxacillin, 0.5 mg; б — oxacillin, 1.0 mg; в — cefazolin, 0.5 mg; г — cefazolin, 1.0 mg. Stained with Alcian Blue, × 400.

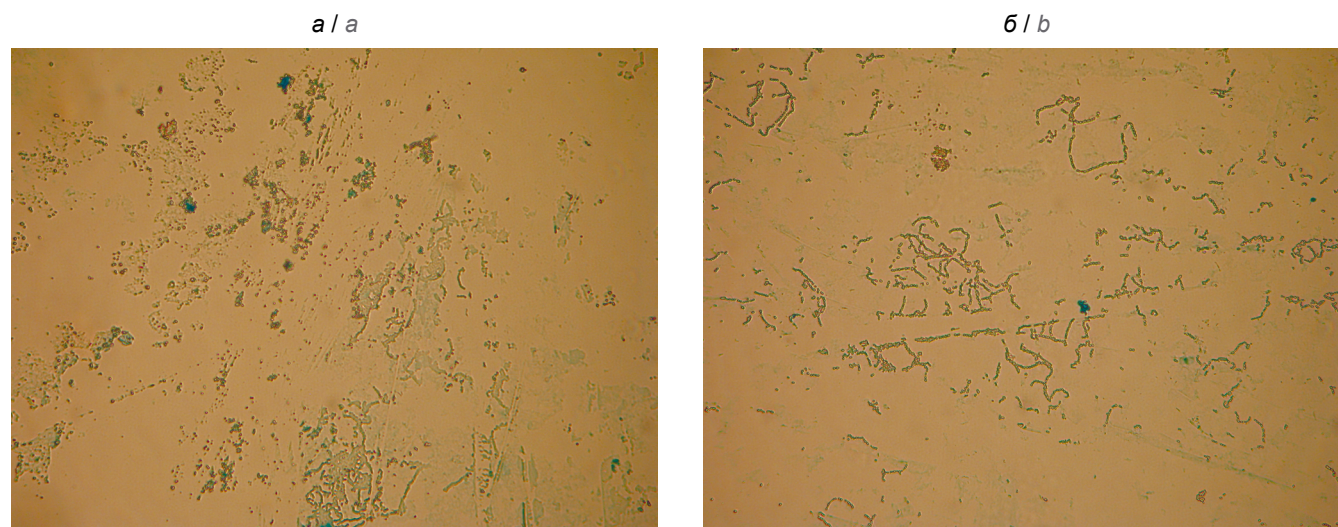


Рис. 3. Микрофотография цепочек и сформированной биоплёнки *S. pyogenes* 30М под воздействием высоких доз АБП.
а — оксациллин, 2,0 мг; б — цефазолин, 4,0 мг. Окраска альциановым синим, × 400.

Fig. 3. Chains and biofilm of *S. pyogenes* type 30M under the influence of high doses of antibiotics.
a — oxacillin, 2.0 mg; b — cefazolin, 4.0 mg. Stained with Alcian Blue, × 400.

за процессом формирования биоплёнки в нормальных условиях и при воздействии различных препаратов, в том числе АБП, в отличие от методов, используемых нами в предыдущих исследованиях [9–11].

Исследование влияния оксациллина и цефазолина на процесс формирования и готовую биоплёнку показало, что оба АБП в дозах 0,5 и 1,0 мг, начиная с 4-часового воздействия, на стадии формирования биоплёнки стрептококка оказывают одинаковое ингибирующее действие на рост микробных клеток и образование биоплёнки. В то же время низкие дозы АБП, независимо от длительности их воздействия, не оказывали негативного влияния как на процесс формирования, так и на зрелую сформированную биоплёнку.

При увеличении доз оксациллина и цефазолина, воздействующих на готовую сформированную биоплёнку, до 0,5 и 1,0 мг сохранялась целостность биоплёнки и стрептококковых цепочек. Однако при этом наблюдался эффект скручивания последних в шарообразные формы с хорошо просматриваемой окрашенной биоплёнкой внутри. Следует отметить, что так называемый эффект скручивания стрептококковых цепочек в этом диапазоне концентраций в большей степени проявлялся под воздействием оксациллина. Цефазолин оказывает более «мягкое» воздействие на структуру стрептококковых цепочек в сравнении с оксациллином. Кроме того, в данном количественном диапазоне АБП отмечалось стимулирующее влияние цефазолина на зрелую сформированную стрептококковую биоплёнку. Данное обстоятельство, по-видимому, связано с действием цефазолина на продукцию полисахаридного компонента в составе биополимерного матрикса биоплёнки стрептококка. Следует отметить, что длительность

воздействия цефазолина в этом количественном диапазоне на целостность стрептококковых цепочек и микробной биоплёнки существенно не влияла.

При воздействии на сформированную биоплёнку наиболее высоких доз АБП наблюдался разрыв стрептококковых цепочек, при этом оксациллин оказывал разрушающее действие и на микробную биоплёнку. В аналогичных опытах с цефазолином биоплёнка сохранялась, несмотря на то что разрыв стрептококковых цепочек тоже наблюдался.

Выявленные значительные различия в действии испытанных АБП как на зрелую биоплёнку штамма *S. pyogenes* 30М, так и на процесс её формирования в определённой степени коррелируют как с высокой чувствительностью стрептококков к АБП пенициллинового ряда, так и с определённой устойчивостью данного микроорганизма к цефалоспорином 1–2-го поколения [7].

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биоплёнка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? *Микробиология*. 2007; 76(2): 149–63.
2. Kolari M. *Attachment mechanisms and properties of bacterial biofilms on non-living surfaces*: Diss. Helsinki; 2003.
3. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбекян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биоплёнок. *Микробиология*. 2010; 79(4): 435–46.
4. Donlan R.M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(9): 881–90. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
5. Гинцбург А.Л., Ильина Т.С., Романова Ю.М. «Quorum sensing» или социальное поведение бактерий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2003; (5): 86–93.
6. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): 1318–22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>

7. Шепелин И.А., Миронов А.Ю., Шепелин К.А. *Антибиотики. Справочник бактериолога*. М.; 2018.
8. Герхард Ф., ред. *Методы общей бактериологии. Том 1*. Пер. с англ. М.: Мир; 1983.
9. Данилова Т.А., Данилина Г.А., Аджиева А.А., Минко А.Г., Алексеева Н.А. Формирование биоплёнок стрептококками группы А разных типов и изучение влияния антибиотиков на этот процесс. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2015; (2): 50–4.
10. Данилова Т.А., Данилина Г.А., Аджиева А.А., Минко А.Г., Николаева Т.Н., Жуховицкий В.Г. и др. Влияние мирамистина и фоспренила на микробные биоплёнки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 163(4): 435–8. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3823-x>
11. Данилова Т.А., Смирнова Т.А., Данилина Г.А., Аджиева А.А., Андреевская С.Г., Шевлягина Н.В. и др. Морфологическое и ультраструктурное исследование особенностей биоплёнок, формируемых *Streptococcus pyogenes*, методами световой и электронной микроскопии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018; 165(1): 127–32. <https://doi.org/10.1007/S10517-018-4110-1>
4. Donlan R.M. Biofilms: Microbiol life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(9): 881–90. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
5. Gintsburg A.L., Il'ina T.S., Romanova Yu.M. «Quorum sensing» or social behavior of bacteria. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2003; (5): 86–93. (in Russian)
6. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): 1318–22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
7. Shepelin I.A., Mironov A.Yu., Shepelin K.A. Antibiotics. Reference book of the bacteriologist [*Antibiotiki. Spravochnik bakteriologa*]. Moscow; 2018. (in Russian)
8. Gerhard P., ed. *Manual Methods for General Bacteriology*. Washington: ASM; 1981. (in Russian)
9. Danilova T.A., Danilina G.A., Adzhieva A.A., Minko A.G., Alekseeva N.A. Biofilm formation by group A streptococci of various types and study of antibiotics effect on this process. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; (2): 50–4. (in Russian)
10. Danilova T.A., Danilina G.A., Adzhieva A.A., Minko A.G., Nikolaeva T.N., Zhukhovitskiy V.G., et al. Effects of Miramistin and Phosprenil on microbial biofilms. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2017; 163(4): 439–42. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3823-x>
11. Danilova T.A., Smirnova T.A., Danilina G.A., Adzhieva A.A., Andreevskaya S.G., Shevlyagina N.V., et al. Optical and electron microscopic study of the morphology and ultrastructure of biofilms formed by *Streptococcus pyogenes*. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2018; 165(1): 110–4. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4110-1>

REFERENCES

Информация об авторах

Аджиева Атикат Абдулазимовна[✉] — к.б.н., с.н.с. лаб. индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, atikatnpo@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9400-9633>

Данилова Татьяна Абрамовна — д.б.н., г.н.с. лаб. индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8451-2553>

Данилина Галина Алексеевна — к.м.н., с.н.с. лаб. индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9615-6082>

Шевлягина Наталья Владимировна — к.м.н., с.н.с. лаб. индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9651-1654>

Минко Алексей Георгиевич — м.н.с. лаб. индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2850-0539>

Жуховицкий Владимир Григорьевич — к.м.н., рук. лаб. индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4653-2446>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

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

Статья поступила в редакцию 10.07.2020; принята к публикации 22.01.2021; опубликована 25.02.2021.

Information about the authors

Atikat A. Adzhieva[✉] — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of detection and ultrastructural analysis of microorganisms, N.F. Gamaleya National Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, atikatnpo@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9400-9633>

Tatyana A. Danilova — D. Sci. (Biol.), main researcher, Laboratory of detection and ultrastructural analysis of microorganisms, N.F. Gamaleya National Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8451-2553>

Galina A. Danilina — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of detection and ultrastructural analysis of microorganisms, N.F. Gamaleya National Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9615-6082>

Natalya V. Shevlyagina — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of detection and ultrastructural analysis of microorganisms, N.F. Gamaleya National Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9651-1654>

Aleksey G. Minko — junior researcher, Laboratory of detection and ultrastructural analysis of microorganisms, N.F. Gamaleya National Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2850-0539>

Vladimir G. Zhukhovitskiy — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory of detection and ultrastructural analysis of microorganisms, N.F. Gamaleya National Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4653-2446>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

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

The article was submitted 10.07.2020; accepted for publication 22.01.2021; published 25.02.2021.