

Е.В.Монахова, Р.В.Писанов, С.В.Титова, М.И.Ежова, С.А.Иванов

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ *CEF* ТОКСИГЕННЫХ И НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* O1

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

Целью исследования явился сравнительный биоинформационный анализ генов и белков Cef (CHO cell elongating factor) холерных вибрионов O1 серогруппы. **Материалы и методы.** В работе использовано 36 штаммов *Vibrio cholerae* O1 из коллекции Ростовского противочумного института. Секвенирование ДНК проводили на платформе MiSeq (Illumina), для идентификации генов и анализа использовали программы BioEdit 7.2.5, BLASTN 2.2.29, BLASTP, MEGA 7, Vector NTI Advance 11. **Результаты и выводы.** Полученные данные подтвердили достаточно высокую консервативность Cef у холерогенных штаммов (несущих гены холерного токсина *ctxAB* в составе интегрированного в геном профага CTX): все они содержали близкородственные прототипные аллели *cefC* или *cefE1*. Аллель E1 обнаружена также у *ctxAB*⁻ штаммов, содержащих профаг pre-CTX, и всего у одного лишённого обоих профагов. У остальных CTX⁻/pre-CTX⁻ вибрионов идентифицировано четыре новых, ранее не описанных варианта Cef, два из которых (E2 и E3), принадлежащие штаммам, выделенным в России, оказались уникальными, тогда как для двух других (E4 и E5) в NCBI были найдены полные гомологи. При этом в группу носителей *cefE4* попали несколько штаммов, вызывавших у людей тяжелые холероподобные заболевания. Поскольку Cef является одним из факторов патогенности/персистенции холерных вибрионов, мы полагаем, что сохранение в процессе естественного отбора его измененных вариантов несет определенный биологический смысл с точки зрения возможного приобретения ими свойств, существенных для реализации возбудителями как патогенетического, так и персистентного потенциала.

Ключевые слова: *Vibrio cholera*, CHO cell elongating factor, биоинформационный анализ, аллели гена *cef*, патогенетический потенциал, персистенция.

Корреспондирующий автор: Монахова Елена Владимировна, e-mail: monakhova_ev@antiplague.ru.

E.V.Monakhova, R.V.Pisanov, S.V.Titova, M.I.Ezhova, S.A.Ivanov

Variability of *cef* Genes in Toxigenic and Non-Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 Strains

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Objective of the investigation was a comparative bioinformatics analysis of *Vibrio cholerae* O1 Cef (CHO cell elongating factor) genes and proteins. **Materials and methods.** 36 *Vibrio cholerae* O1 strains from the Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute collection have been utilized. DNA sequencing was conducted on the MiSeq platform (Illumina); gene identification and analysis was carried out by means of BioEdit 7.2.5, BLASTN 2.2.29, BLASTP, MEGA 7, Vector NTI Advance 11 software programs. **Results and conclusions.** The data obtained confirmed Cef to be rather conserved in cholera strains (carrying cholera toxin genes *ctxAB* as a part of genome-integrated CTX prophage): all of them shared closely related prototype alleles *cefC* or *cefE1*. The E1 allele was also revealed in *ctxAB*⁻ strains carrying the pre-CTX prophage and in a single strain lacking both prophages. In the rest of CTX⁻/pre-CTX⁻ *V. cholerae* four novel *cef* variants, that were not previously described, have been identified, two of which (E2 and E3), belonging to the Russian isolates, appeared to be unique, while for the two others absolute homologues were found in NCBI. In this connection several strains which caused severe cholera-like diseases in humans were placed in the group of *cefE4* host strains. Since Cef is one of pathogenicity/persistence factors of cholera vibrios, we presume that conservation of its altered variants in the course of natural selection embodies a certain biological sense in respect of possible acquisition of qualities, significant for realization of both pathogenic and persistence potential.

Key words: *Vibrio cholerae*, CHO cell elongating factor, bioinformatics analysis, gene alleles, pathogenic potential, persistence.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Elena V. Monakhova, e-mail: monakhova_ev@antiplague.ru.

Citation: Monakhova E.V., Pisanov R.V., Titova S.V., Ezhova M.I., Ivanov S.A. Variability of *cef* Genes in Toxigenic and Non-Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:50–55. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-50-55

Как известно, возбудителями эпидемических вспышек холеры являются холерогенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 и O139, содержащие гены холерного токсина (СТ) *ctxAB* в составе интегрированного в геном профага CTX. Клиническая картина типичной холеры обусловлена главным образом СТ, но в ее развитии участвует и ряд других фак-

торов [1]. Также существуют штаммы, лишённые *ctxAB*, но способные вызывать у людей заболевания различной степени тяжести – от слабой и умеренной диареи до тяжелых форм, клинически неотличимых от холеры [1, 8, 9]; они также часто выделяются и из объектов окружающей среды (ООС) [4, 10]. Их патогенетический потенциал зависит от

экспрессии детерминант других токсических субстанций, наборы которых различаются у разных штаммов [1]. Поскольку передача инфекции осуществляется водным либо пищевым путем, вибрионы должны обладать и достаточным персистентным потенциалом, позволяющим выживать в ООС, конкурируя за источники питания с другими микроорганизмами [10]. Они способны усваивать многие органические соединения за счет экспрессии детерминант различных гидролаз (протеаз, липаз, эстераз, нуклеаз и др.), причем некоторые одновременно служат факторами патогенности [1, 4]. К числу таких факторов относится, в частности, Cef (СНО cell elongating factor) – белок с молекулярной массой около 84 кДа, состоящий из 796 аминокислотных остатков (aa), кодируемый геном в составе малой хромосомы. Помимо давней название этому фактору цитотонической активности по отношению к культурам клеток и диареогенной на модели мышей-сосунков, сопровождающимися серьезными нарушениями ультраструктуры клеток, он способен гидролизовать р-нитрофениловые эфиры жирных кислот, твины и трибутирин [1, 2, 3, 6, 7]. В молекуле Cef идентифицировано несколько функциональных доменов: домен Куница, свойственный ингибиторам протеаз; лейциновая молния, обеспечивающая формирование димерной структуры белков; домен альфа-бета-гидролаз (a/bH) с входящим в его состав консервативным субстрат-связывающим мотивом GHSLG; перекрывающийся с a/bH домен LIP. GHSLG отвечает за биохимическую, но не биологическую активность Cef [2]. Ранее нами проведен биоинформационный анализ генов и белков Cef нескольких холерогенных штаммов O1 и O139 серогрупп и показана его высокая консервативность. Вместе с тем установлено, что даже единственная нуклеотидная замена (SNP) в гене *cef V. cholerae* O139 привела к изменению спектра субстратной специфичности его продукта [3]. Поскольку СТХ⁻ штаммам свойственна значительно большая генетическая изменчивость по сравнению с СТХ⁺, мы допускали, что в их геномах могут присутствовать и измененные гены *cef*, продукты которых могли приобрести свойства, существенные для реализации как патогенетического, так и персистентного потенциала. Поэтому представляло интерес проведение более подробного анализа с привлечением других штаммов, в том числе нехолерогенных.

Цель настоящего исследования состояла в сравнительном биоинформационном анализе генов и белков Cef холерных вибрионов O1 серогруппы.

Материалы и методы

Объектами исследования служили 36 штаммов *V. cholerae* O1 различного происхождения из коллекции Музея живых культур Ростовского противочумного института. Гены *cef* идентифицировали с помощью программ BioEdit 7.2.5 ([\[ncsu.edu/bioedit\]\(http://ncsu.edu/bioedit\)\) и BLASTN 2.2.29 \(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>\) в «черновых» полных геномах этих штаммов, секвенированных нами на платформе MiSeq \(Illumina\) согласно прилагаемому протоколу. Анализ генов и их продуктов осуществляли с использованием программ Blastp \(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>\), AlignX \(Vector NTI Advance 11, Invitrogen\) и MEGA 7 \(<http://www.megasoftware.net>\). Список штаммов и номера \(ID\) нуклеотидных последовательностей генов *cef*, депонированных нами в NCBI GenBank, представлены в таблице. Для сравнения в анализ включили прототипные гены *cef V. cholerae* Эль Тор JBK70 \(AY7772384\) и двух штаммов классического биовара – CVD103HgR \(AY7772385\) и O395 \(VC0395_0373 в CP000626.1\) – и их продукты.](http://www.mbio.</p>
</div>
<div data-bbox=)

Результаты и обсуждение

По данным AlignX-анализа нуклеотидных последовательностей была построена дендрограмма, на которой *cef V. cholerae* Эль Тор образовали пять ветвей, каждая включала идентичные гены (рис. 1). Мы обозначили эти аллели как E1–E5 в соответствии с уровнем сходства с прототипным геном AY7772384 (E1). Аллель E1 длиной 2391 п.н. обнаружена у всех СТХ⁺ штаммов, у *ctxAB*⁻/pre-СТХ⁺ и у одного СТХ⁻/pre-СТХ⁻ штамма (14157). Результаты Blast-поиска в имеющихся на сегодняшний день в NCBI завершенных и «черновых» геномах показали, что данная аллель наиболее распространена среди штаммов Эль Тор. Следует отметить, что E1 почти полностью идентична *cefC* классических штаммов: как показано ранее, разница между ними состояла в единственной SNP G/A-2014, приведшей к синонимичной замене остатка изолейцина (I) в CefC на остаток валина (V) в CefE1 в позиции 672, однако это никак не повлияло на биохимическую и биологическую активность продукта [3, 7]. Такую же аллель содержали классические штаммы, найденные в NCBI: ATCC 14035 (JHXR01000002), M-29 (Астрахань, 1942, JFGR01000001), RC27 (Индонезия, 1991, ADAI01000039), 95412 (Мексика, 1997, APFM01000042). Кроме того, в *cef* классического штамма 569В выявлена дополнительная SNP – A/C-2267 с соответствующей несинонимичной заменой гистидина (H) на пролин (P) в позиции 756. По-видимому, эта SNP не является значимой, поскольку активность продукта клонированного гена *cef* 569В ничем не отличалась от таковой *cefE1* [3]. Кроме того, аллель *cefC* присутствовала и у отдельных штаммов, обозначенных как Эль Тор: ATCC 11629 (LOSM01000001) и 5/66 (Пакистан, 1966, JREO01000002).

Аллель E2 имела нормальную длину 2391 п.н. и обладала 96,5 % сходства с E1. Она идентифицирована в геноме всего одного из изученных нами штаммов (P-18904), а в базах NCBI не найдено ее полных гомологов.

Аллель E3 выявлена у двух штаммов из разных

Штаммы <i>V. cholerae</i> и гены, использованные в сравнительном анализе					
Наличие профагов	Штамм	Место выделения	Год	Источник выделения	ID гена <i>cef</i>
CTX ⁺	P-5879	Ростовская обл.	1972	Труп	KM588824
	17290	Дагестан	1994	Больной	KM522861
	16228	Дагестан	1994	Больной	KT779266
	17261	Дагестан	1994	Больной	KT779267
	17296	Дагестан	1994	Больной	KT779268
	18329	Казань	2001	Больной	KT779269
	3265	Москва	2014	Больной	KM522864
	P-17917	Ростов-на-Дону	1999	Речная вода	KR827238
	P-18252	Ростов-на-Дону	2000	Сточные воды	KR827239
	P-18367	Ростов-на-Дону	2001	Речная вода	KR827240
	P-18368	Ростов-на-Дону	2001	Речная вода	KR827241
	P-18369	Ростов-на-Дону	2001	Речная вода	KR827242
	P-18588	Ростов-на-Дону	2002	Речная вода	KR827243
	81	Ростов-на-Дону	2014	Речная вода	KM522865
569B	неизвестно	1948	Больной	KT188942	
pre-CTX ⁺	9961	Москва	1977	Речная вода	KT728924
	P-13169	Ростов-на-Дону	1987	Речная вода	KT728925
	15500	Крым	1991	Сточные воды	KM522863
CTX ⁻ /pre-CTX ⁻	14157	Азербайджан	1989	Больной	KM522866
	14863	Украина	1991	Больной	KM456178
	14873	Молдова	1991	Больной	KM456179
	15031	Украина	1991	Больной	KM456180
	9339	Краснодарский край	1975	Речная вода	KX640094
	11739	Краснодарский край	1980	Речная вода	KX640095
	12026	Краснодарский край	1981	Речная вода	KX640096
	17920	Краснодарский край	1999	Больной	KX640097
	18748	Краснодарский край	2004	Больной	KX640098
	18984	Краснодарский край	2007	Речная вода	KT728926
	434	Краснодарский край	2015	Речная вода	KX640099
	P-18904	Ростовская обл.	2006	Речная вода	KM522860
	P-18973	Ростов-на-Дону	2007	Речная вода	KM456181
	P-19051	Ростов-на-Дону	2008	Речная вода	KX640100
	19308	Астраханская обл.	2012	Речная вода	KX640101
	19758	Псковская обл.	2014	Речная вода	KX640102
	19710	Иркутская обл.	2014	Речная вода	KX640104
P-19430	Ростов-на-Дону	2013	Речная вода	KX640105	

регионов России, которые были практически идентичными и по другим генетическим признакам. За счет вставки СТА между нуклеотидами 1630 и 1631 (относительно E1) ген удлинился на три нуклеотида, а продукт – соответственно на 1 aa. Сходство с E1 составило 93,7 %. В NCBI идентичных генов не найдено. Представляет интерес тот факт, что один из этих штаммов (434) является представителем клона, широко распространившегося в открытых водоемах Краснодарского края (в основном в реке Агура в Сочи и окрестностях) в 2015 г., где в течение двух месяцев выделено 83 штамма, идентичных по ПЦР- и VNTR-генотипам. Отличительной чертой их явилось наличие довольно редко встречающегося у *V. cholerae* O1 гена *cholix*-токсина (*chxA*), который относят к факторам колонизации, способствующим персистенции вибрионов в ассоциации с водными организмами [5]. Поэтому мы полагали, что такая длительная циркуляция данного клона могла быть отчасти или полностью обусловлена именно экспрессией *chxA*. Обнаружение у штамма 434 новой аллели *cefE3* позволяет думать, что к этому мог быть причастен и

его продукт. Второй штамм, идентичный первому, выделен тремя годами ранее в Астраханской области, что не исключает возможности его длительного сохранения с заносом на другие территории, где в определенный период сложились благоприятные условия для его размножения.

У 12 нехолерогенных штаммов разного происхождения выявлена аллель E4, имеющая такую же вставку СТА, что и E3, такую же длину (2394 п.н.) и 94,2 % сходства с E1. В эту группу наряду с водными попали и клинические штаммы. Для трех из них (14863, 14873 и 15031) известно, что они явились этиологическими агентами тяжелых холероподобных заболеваний людей, на модели кроликов-сосунков вызывали эффект, близкий холерогенному, а их культуральные супернатанты – удлинение клеток СНО и L-929. Поскольку они не содержали генов других цитотонических токсинов (СТ и термостабильного), удлинение клеток скорее всего обусловлено действием Cef. Более того, ультраструктурные изменения в кишечнике животных, зараженных штаммом 14863, во многом напоминали таковые под действием рекомби-

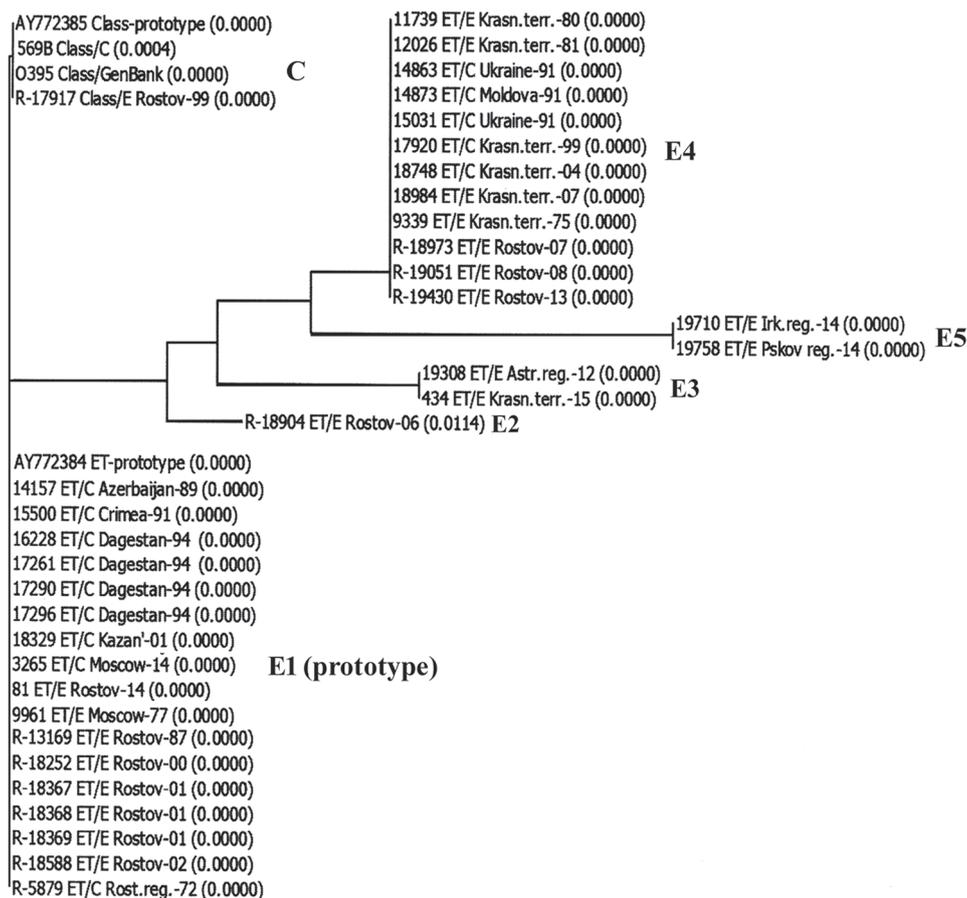


Рис. 1. Дендрогрaмма, отражающая сходство и различия генов *cef* *V. cholerae*: C – клинический штамм, E – штамм из ООС

нантного белка Cef [1]. Эти данные позволяют предположить, что способность упомянутых штаммов вызывать тяжелые формы кишечных инфекций отчасти (или даже полностью) обусловлена продукцией CefE4, возможно, обладающего повышенной биологической активностью. В NCBI найден один СТХ-штамм VC35 с такой же аллелью (AMBR01000017, Contig017), выделенный в 2004 г. в Малайзии от больного с диагнозом «холера» [8]. Выявление аллели *cefE4* у штаммов, не связанных общностью происхождения, указывает на его широкое распространение и необходимость дальнейшего изучения свойств его продукта для ответа на вопрос о том, является ли его присутствие в геномах возбудителей, выделяемых из ООС, показателем их высокого патогенетического потенциала и представляют ли они реальную угрозу. Не исключено также, что CefE4 обладает измененной эстеразной/липазной активностью, что может повлиять на персистентный потенциал.

Наименьшим уровнем сходства с прототипом (89,5 %) обладала аллель E5 длиной 2403 п.н. Увеличение длины обусловлено, помимо уже упомянутой вставки СТА между нуклеотидами 1630 и 1631, наличием еще двух вставок: TTAAT между 946 и 947 и GTGT между 958 и 959 (относительно E1). Первая привела к сдвигу рамки считывания, вторая – к восстановлению прежнего порядка кодонов. Кроме того, в последовательности «выше» данных вставок наблюдалось большое число 1-3-нуклеотидных замен. Все это привело к образованию в продукте ге-

терологичного 12 aa участка. Аллель E5 обнаружена всего у двух штаммов, выделенных в разных регионах России в разные годы, но практически идентичных и по другим генетическим признакам. Тем не менее, такая же аллель найдена в NCBI в сиквенсах двух СТХ-/pre-СТХ-штаммов M1522 (Калмыкия, 2014, вода, LQCA01000002, contig00002) и 12129 (больной, 1985, ACFQ01000009, contig178). Мы полагаем, что продукт аллели *cefE5* также заслуживает дальнейшего изучения по причинам, изложенным применительно к *cefE4*.

Интересно, что во всех случаях наличия вставок общее число «лишних» нуклеотидов было кратно трем, поэтому в продуктах измененных генов появлялись «лишние» aa, но в целом они сохраняли достаточно высокий уровень сходства друг с другом, как и сами гены.

Поскольку в связи с вырожденностью генетического кода не все SNP приводят к заменам aa, далее мы провели AlignX-анализ продуктов разных аллелей гена *cef* вибрионов Эль Тор (рис. 2). В соответствии с длиной генов их продукты также имели разные размеры: E1 и E2 – 786, E3 и E4 – 797, E5 – 800 aa.

Несмотря на различия по первичной структуре, все белки Cef сохранили активные домены. Домен Куница у всех находился в одной и той же позиции 179–196 и остался в неизменном виде. Локализация остальных доменов в E3, E4 и E5 отличалась от таковой в E1 и E2 вследствие сдвига за счет вставок дополнительных aa. Лейциновая молния была одинаковой

та. *Генетика*. 2012; 48(2):275–9.

4. Islam A., Labbate M., Djordjevic S.P., Alam M., Darling A., Melvold J., Holmes A.J., Johura F.T., Cravioto A., Charles I.G., Stokes H.W. Indigenous *Vibrio cholerae* strains from a non-endemic region are pathogenic. *Open Biol.* 2013; 3:120181. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3603452>. DOI: 10.1098/rsob.120181.

5. Lugo M.R., Merrill A.R. The father, son and cholix toxin: the third member of the DT group mono-ADP-ribosyltransferase toxin family. *Toxins (Basel)*. 2015; 7(8):2757–72. DOI: 10.3390/toxins7082757.

6. McCardell B.A., Kothary M.H., Hall R.N., Sathyamoorthy V. Identification of a CHO-elongating factor produced by *Vibrio cholerae* O1. *Microb. Pathog.* 2000; 29(1):1–8. DOI: 10.1006/mpat.2000.0361.

7. McCardell B.A., Sathyamoorthy V., Michalski J., Lavu S., Kothary M., Livezey J., Kaper J.B., Hall R. Cloning, expression and characterization of the CHO cell elongating factor (Cef) from *Vibrio cholerae* O1. *Microb. Pathog.* 2002; 32(4):165–72. DOI: 10.1006/mpat.2001.0492.

8. Osama A., Gan H.M., The C.S., Yap K.P., Thong K.L. Genome sequence and comparative genomics analysis of a *Vibrio cholerae* O1 strain isolated from a cholera patient in Malaysia. *J. Bacteriol.* 2012; 194(24):6933. DOI: 10.1128/JB.01832-12.

9. Saha P.K., Koley H., Mukhopadhyay A.K., Bhattacharya S.R., Nair G.B., RamaKrishnan S.T., Takeda Y. Nontoxicogenic *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba biotype El Tor associated with a cluster of cases of cholera in Southern India. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(5):1114–7.

10. Vezzulli L., Pruzzo C., Huq A., Colwell R.R. Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae* and their role in cholera. *Environ. Microbiol. Rep.* 2010; 2(1):27–3. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2009.00128.x.

References

1. Monakhova E.V. [Cholera vibrio virulence strategy and ways of its realization]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 4:60–8.
2. Monakhova E.V., Pisanov R.V., Mazrukho A.B., Markina O.V., Alekseeva L.P. [Characterization of *Vibrio cholerae* Cef (CHO cell elongating factor): bioinformatics analysis and experimental data]. *Mol. Genet.*

Mikrobiol. Virusol. 2012; 2:10–4.

3. Pisanov R.V., Monakhova E.V., Shalu O.A. [Point mutation in *Vibrio cholerae* O139 *cef* (CHO cell elongating factor) gene alters the substrate specificity of its product]. *Genetika*. 2012; 48(2):245–8.

4. Islam A., Labbate M., Djordjevic S.P., Alam M., Darling A., Melvold J., Holmes A.J., Johura F.T., Cravioto A., Charles I.G., Stokes H.W. Indigenous *Vibrio cholerae* strains from a non-endemic region are pathogenic. *Open Biol.* 2013; 3:120181. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3603452>. DOI: 10.1098/rsob.120181.

5. Lugo M.R., Merrill A.R. The father, son and cholix toxin: the third member of the DT group mono-ADP-ribosyltransferase toxin family. *Toxins (Basel)*. 2015; 7(8):2757–72. DOI: 10.3390/toxins7082757.

6. McCardell B.A., Kothary M.H., Hall R.N., Sathyamoorthy V. Identification of a CHO-elongating factor produced by *Vibrio cholerae* O1. *Microb. Pathog.* 2000; 29(1):1–8. DOI: 10.1006/mpat.2000.0361.

7. McCardell B.A., Sathyamoorthy V., Michalski J., Lavu S., Kothary M., Livezey J., Kaper J.B., Hall R. Cloning, expression and characterization of the CHO cell elongating factor (Cef) from *Vibrio cholerae* O1. *Microb. Pathog.* 2002; 32(4):165–72. DOI: 10.1006/mpat.2001.0492.

8. Osama A., Gan H.M., The C.S., Yap K.P., Thong K.L. Genome sequence and comparative genomics analysis of a *Vibrio cholerae* O1 strain isolated from a cholera patient in Malaysia. *J. Bacteriol.* 2012; 194(24):6933. DOI: 10.1128/JB.01832-12.

9. Saha P.K., Koley H., Mukhopadhyay A.K., Bhattacharya S.R., Nair G.B., RamaKrishnan S.T., Takeda Y. Nontoxicogenic *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba biotype El Tor associated with a cluster of cases of cholera in Southern India. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(5):1114–7.

10. Vezzulli L., Pruzzo C., Huq A., Colwell R.R. Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae* and their role in cholera. *Environ. Microbiol. Rep.* 2010; 2(1):27–3. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2009.00128.x.

Authors:

Monakhova E.V., Pisanov R.V., Titova S.V., Ezhova M.I., Ivanov S.A. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

Об авторах:

Монахова Е.В., Писанов Р.В., Титова С.В., Ежова М.И., Иванов С.А. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Поступила 03.11.17.