

С.В.Титова, Е.А.Меньшикова, Е.М.Курбатова, Л.К.Лысова, И.В.Архангельская, О.В.Дуванова, А.В.Миронова, А.В.Самородова, Э.А.Москвитина

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СРОКИ ПЕРСИСТЕНЦИИ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

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

Цель исследования. Изучение влияния температуры и среды культивирования на сроки персистенции, сохранение *ctx* гена и ферментативную активность *V. cholerae* O1 различной токсигенности. **Материалы и методы.** В работе использовали штаммы *V. cholerae* El Tor: P-5879, P-19613, а также штамм P-19787. **Результаты и выводы.** При изучении холерных вибрионов Эль Тор с разной генетической характеристикой установлено, что самая длительная выживаемость (19 сут) на минеральных субстратах при 5 °С наблюдалась у токсигенных штаммов, тогда как атоксигенный штамм сохранялся не более 17 сут. В то же время холерные вибрионы могут длительное время сохраняться и даже размножаться в условиях пониженной температуры (не менее 10 °С) на минеральных субстратах. Токсигенные штаммы холерных вибрионов, независимо от среды и температуры культивирования, сохраняли в своем геноме *ctx* ген и ферментативную активность в течение всего срока наблюдения в эксперименте. Такая продолжительная персистенция холерных вибрионов при низких температурах на минеральных субстратах может рассматриваться как возможность сохранения токсигенных штаммов холерных вибрионов при заносе больными или вибрионосителями.

Ключевые слова: холерный вибрион, токсигенность, персистенция, *ctx* ген, минеральные субстраты, ферментативная активность.

Корреспондирующий автор: Титова Светлана Викторовна, e-mail: titova_sv@antiplague.ru

S.V.Titova, E.A.Men'shikova, E.M.Kurbatova, L.K.Lysova, I.V.Arkhangel'skaya, O.V.Duvanova, A.V.Mironova, A.V.Samorodova, E.A.Moskvitina

Impact of Cultivating Environment on the Terms of Persistence and Certain Properties of Cholera Vibrios

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

Objective of the study is to investigate the impact of cultivating temperature and medium on the terms of persistence, *ctx* gene retention, and enzymatic activity of *V. cholerae* O1 with various toxigenicity. **Materials and methods.** Utilized were the strains of *V. cholerae* El Tor: P-5879, P-19613, and also the strain P-19787. **Results and conclusions.** In the process of studying cholera vibrios El Tor with different genetic characteristics it was determined that the longest terms of persistence (19 days) on mineral substrates at 5 °C were observed for toxigenic strains, while for non-toxigenic ones it made less than 17 days. At the same time cholera vibrios can persist continuously and even reproduce on mineral substrates under the conditions of subnormal lowered temperatures (not less than 10 °C). Toxigenic strains of *Vibrio cholerae*, irrespectively of cultivating medium and temperature, retained *ctx* gene in their genome and maintained enzymatic activity throughout the experiment. Such long-term persistence of cholera vibrios at low temperatures on mineral substrates may be regarded as possibility of preservation of *V. cholerae* toxigenic strains in case of import by the infected persons or vibrio-carriers.

Key words: cholera vibrio, toxigenicity, persistence, *ctx* gene, mineral substrates, enzymatic activity.

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

Corresponding author: Svetlana .V. Titova, e-mail: titova_sv@antiplague.ru.

Citation: Titova S.V., Men'shikova E.A., Kurbatova E.M., Lysova L.K., Arkhangel'skaya I.V., Duvanova O.V., Mironova A.V., Samorodova A.V., Moskvitina E.A. Impact of Cultivating Environment on the Terms of Persistence and Certain Properties of Cholera Vibrios. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:76–80. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-76-80

Известно, что поверхностные водоемы являются составной частью среды обитания холерных вибрионов [15]. Анализ накопленных за период седьмой пандемии данных указывает также на значительный диапазон экологической толерантности водной популяции вибрионов Эль-Тор в силу их адаптивной изменчивости к стрессорным факторам окружающей среды. Продолжительность персистенции зависит от многих факторов: температуры, pH, концентрации солей и углеводов, присутствия органических веществ

(загрязненности мелких водоемов неочищенными сточными водами), степени бактериальной обсемененности [6, 11, 14]. Наряду с выделением холерных вибрионов из речной воды известны факты их обнаружения в морской [1]. Факторами передачи холерных вибрионов в таких случаях могут быть и недостаточно проваренные крабы, креветки, устрицы, рыба (морепродукты) [5]. Установлено, что холерные вибрионы El Tor хорошо сохраняются и даже размножаются в сильно минерализованных водах. Г.М.Мединским

[7], Р.М.Саямовым, А.М.Зайденовым [10] описаны факты продолжительного выделения холерных вибрионов из сульфидной воды естественных источников на территории Больших Сочи. Экспериментально показана возможность сохранения при температуре 20–24 °С до 39–65 дней и 289–413 дней при температуре 37 °С, а также размножение холерных вибрионов в речной воде с примесью сульфидного минерального источника при исследовании р. Агура г. Сочи в месте слабого течения и глубокого прогревания [8]. С июля по сентябрь 2015 г. на участке р. Агуры, где происходит естественная разгрузка минерального источника, было выделено 98 штаммов *V. cholerae* El Tor Inaba (ctxAB⁻tcpA⁻). Такое длительное выделение атоксигенных холерных вибрионов El Tor можно рассматривать как создание благоприятных климато-географических условий для накопления токсигенных холерных вибрионов при заносе больными или вибрионосителями [6, 12, 13].

Целью исследования было изучение влияния температуры и среды культивирования на сроки персистенции, сохранение ctx гена и ферментативную активность *V. cholerae* O1 различной токсигенности.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы *V. cholerae* El Tor: P-5879 ctxAB⁺tcpA⁺, выделенный от человека в 1972 г., P-19613 ctxAB⁺tcpA⁺, изолированный из воды р. Темерник г. Ростова-на-Дону в 2014 г., а также штамм P-19787 ctxAB⁻tcpA⁻, выделенный из р. Агура в месте впадения минерального источника в 2015 г. В качестве сред культивирования использовали водопроводную, сульфидную воду и грязевые отложения минерального источника Мацеста, воду Черного моря и р. Агуры (рН всех используемых минеральных субстратов находилось в пределах 6,5–7,0). Субстраты трижды стерилизовали на водяной бане по 20 мин с последующими посевами на специфическую стерильность, затем 18-часовую культуру холерных вибрионов вносили в 30 мл среды культивирования до конечной концентрации 10⁴ микробных единиц/мл, используя исходные субстраты в различных сочетаниях: морская вода, морская вода с водой минерального источника (1:1), морская и речная вода (1:1), речная вода, речная вода с водой минерального источника (1:1), вода минерального источника, минеральная вода с водопроводной водой (1:1), минеральные грязевые отложения и минеральная вода (1:1). В качестве контроля использовали дехлорированную стерильную водопроводную воду. Исследуемые штаммы инкубировали при температуре 5, 10 и 25 °С. Учет результатов проводили при температурах культивирования 5 и 10 °С один раз в 2–4 дня, а при 25 °С – 1 раз в 7 дней в течение 1 месяца, затем 1 раз в месяц. Наличие ctx гена определяли с использованием пары праймеров ctx A-F и ctxB-R (производства ЗАО «Евроген», Москва) методом ПЦР. Амплификат включал дистальную часть

ctx A и проксимальную ctxB. Определение N-ацетил-β-D-глюкозаминидазной, твиназной (способность гидролизовать твин-20), ДНК-азной (с использованием DNase тест агара, Дифко) и алкилсульфатазной активностей проводили согласно методикам О.В.Дувановой и соавт. [2, 3, 4].

Результаты и обсуждения

Нами установлено, что при культивировании холерных вибрионов на минеральных субстратах при 5 °С все исследуемые штаммы, независимо от токсигенности, перестали высеваться к 8–19-м суткам от начала эксперимента, тогда как в контрольных пробах гибли на 2–12-е сутки. При 5 °С самая длительная выживаемость (19 сут) наблюдалась у токсигенных штаммов *V. cholerae* El Tor P-5879 и P-19613 в морской (Черное море) и речной воде (р. Агура) – от 15 до 19 сут. В то же время атоксигенный штамм *V. cholerae* El Tor P-19787 дольше всего сохранялся в морской, минеральной воде и в смеси речной и морской воды (17 сут). Нами отмечено, что при 5 °С культивирования добавление воды минерального источника (Мацеста) в пробы с водой р. Агура сокращает сроки выживаемости токсигенных и атоксигенного штаммов холерных вибрионов почти в два раза (8 и 10 сут соответственно) по сравнению с вышеперечисленными субстратами.

При 10 °С на тех же субстратах сроки персистенции вибрионов значительно удлинялись по сравнению с 5 °С инкубации и варьировали в зависимости от субстрата от 21 дня до 2 месяцев. Токсигенные штаммы (P-5879 и P-19613) дольше всего выживали в смеси р. Агура и Черного моря, весь срок наблюдения (более 2 месяцев), и быстрее погибали в смеси речной воды с минеральной (около полутора месяцев). Атоксигенный штамм дольше всего сохранялся в условиях минеральной воды (44 дня) и меньше в смеси минеральной грязи с минеральной водой (23 дня). У токсигенных штаммов в контрольных пробах к четвертым суткам концентрация вибрионов снизилась до единичных клеток, у атоксигенного штамма в контрольной пробе вибрионы регистрировали в течение первого месяца. В пробах со 100 % минеральной водой токсигенные холерные вибрионы выживали от одного до двух месяцев (P-19613 и P-5879 соответственно), атоксигенный – до 1,5 месяцев. Минеральная вода, разбавленная водопроводной, способствовала увеличению срока персистенции токсигенных холерных вибрионов (более 2,5 месяцев). Смесь минеральной воды с грязевыми отложениями также способствовала сохранению холерных вибрионов (*V. cholerae* El Tor № P-19787, P-5879, P-19613 – 23 дня, 1 месяц и 1,5 месяца соответственно). Отмечено размножение холерных вибрионов токсигенных и атоксигенных штаммов в морской и речной воде после первой недели культивирования в новых условиях, возможно, это срок адаптации или переход на новый источник питания (рис. 1, 2, 3).

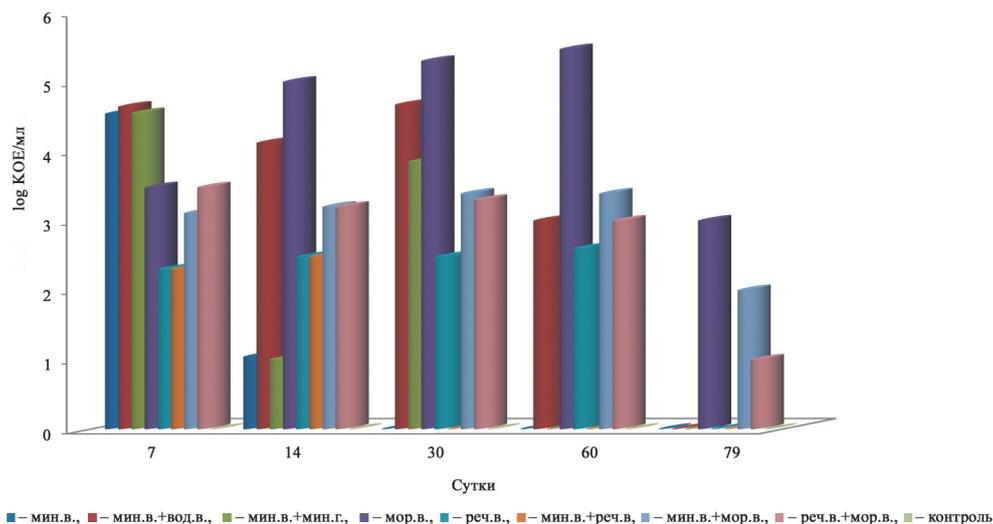


Рис. 1 Динамика концентрации штамма *V. cholerae* El Tor P-19613 ctx^+tcp^+ при 10 °С на различных субстратах:

Здесь и на рис. 2 и 3: мин.в. – минеральная вода 100 %, мин.в.+вод.в. – минеральная вода + водопроводная вода (1:1), мин.в.+мин.г. – минеральная вода + минеральная грязь (1:1), мор.в. – морская вода, реч.в. – речная вода, мин.в.+реч.в. – минеральная вода + речная вода (1:1)

При 25 °С во всех экспериментальных и контрольных пробах жизнеспособность холерных вибрионов сохранялась более двух месяцев (срок наблюдения). Через 7 дней от начала эксперимента у всех исследуемых штаммов, независимо от наличия *ctx* гена, на всех субстратах отмечали увеличение концентрации вибрионов на два и более порядка (10^6 , 10^7 м.к./мл). Такая концентрация холерных вибрионов сохранялась на том же уровне весь срок наблюдения.

Для выявления изменений в структуре генома токсигенных штаммов холерных вибрионов под влиянием температуры и среды культивирования, каждый высеv на агаровые пластины сопровождали постановкой ПЦР. Нами установлено, что токсигенные штаммы холерных вибрионов, независимо от среды и температуры культивирования, сохраняли в своем геноме *ctx* ген в течение всего срока наблюдения.

Для изучения влияния условий культивирования на ферментативную активность холерных вибрионов изучены ферменты, обеспечивающие им возможность адаптации к различным экологическим нишам. У всех исследованных штаммов обнаружены N-ацетил-β-D-глюкозаминидазная, твиназная (способность гидролизовать твин-20), ДНК-азная активности, которые сохранялись на протяжении всего

исследования у изученных штаммов при культивировании не ниже 10 °С. Наблюдалась тенденция к снижению алкилсульфатазной активности на поздних этапах исследования. Представляет интерес дальнейшее изучение ферментов холерного вибриона, учитывая важную роль N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы в сохранении/выживании холерных вибрионов во внешней среде [4].

При сопоставлении экспериментальных данных о сроках выживания холерного вибриона P-19787 $ctxAB^+tcpA^-$, выделенного при 25 °С из р. Агура в месте впадения минерального источника в 2015 г., со сроками обнаружения в естественных условиях установлено, что в речной воде с примесью сульфидных минеральных вод холерные вибрионы выделяли 63 дня, в устье – 44, а в морской воде в месте впадения р. Агура – 24 дня. Приведенные данные подтверждают, что речная вода с примесью сульфидной минеральной в случае контаминации холерными вибрионами является благоприятной экологической средой для сохранения микроба и диктует необходимость проведения эпидемиологического расследования для выявления причин нарушения эколого-гигиенического состояния водного объекта. В конкретном случае – в местах разгрузки минерального источника в р. Агура и впадения р. Агура в Черное море.

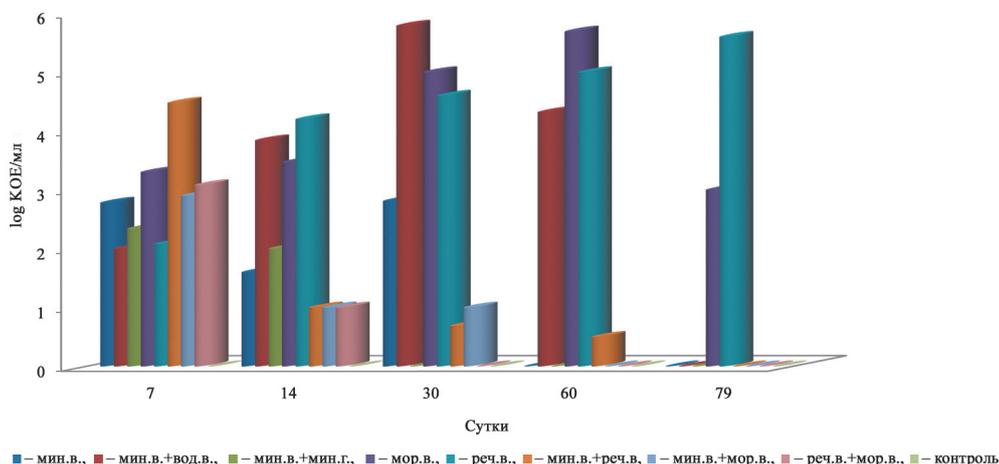


Рис. 2 Динамика концентрации штамма *V. cholerae* El Tor P-5879 ctx^+tcp^+ при 10 °С на различных субстратах

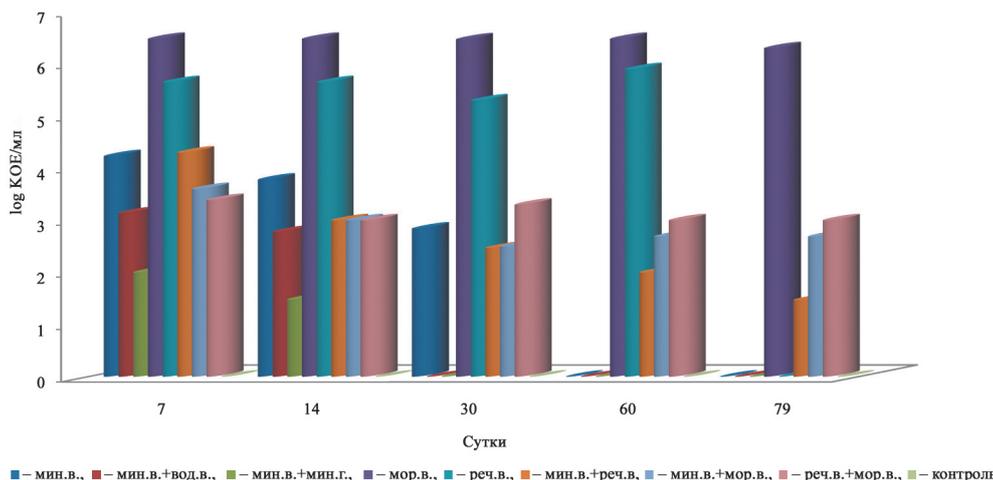


Рис. 3 Динамика концентрации штамма *V. cholerae* El Tor P-19787 stx+tcp- при 10 °С на различных субстратах

Таким образом, холерные вибрионы могут длительное время сохраняться и размножаться в условиях пониженной температуры (не менее 10 °С) на минеральных субстратах в эксперименте. Такая продолжительная персистенция холерных вибрионов с сохранением *stx* гена и ферментативной активности при низких температурах на минеральных субстратах может рассматриваться как возможность сохранения токсигенных штаммов холерных вибрионов при заносе больными или вибрионосителями, что, в свою очередь, может создать угрозу реализации водного пути распространения возбудителя при использовании водоемов для рекреационных целей и свидетельствует о необходимости оптимизации тактики мониторинговых исследований в плане определения дополнительных точек и кратности исследования воды поверхностных водоемов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грижебовский Г.М. Холера на Кавказе. Ставрополь; 1997. 782 с.
2. Дуванова О.В., Шиманюк Н. Я., Мишанькин Б.Н. Способность расщеплять твин-20 как дифференциальный тест для вибрионов O139 серовара различного происхождения. *Клин. и лаб. диагностика.* 2000; 5:48–9.
3. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Водопьянов С.О., Писанов Р.В. Способ дифференциации штаммов *Vibrio cholerae* O139 серогруппы по алкилсульфатазной активности. Патент 2473697 РФ. Бюл. № 3, опубли. 27.01.2013.
4. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С., Сорокин В.М. N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза холерных вибрионов. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2016; 2:41–8.
5. Мазрухо А.Б., Кругликов В.Д., Монахова Е.В., Москвитина Э.А., Шестиалтынова И.С., Подойницына О.А., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Зубкова Д.А., Кудрякова Т.А., Ежова М.И., Ускова Н.Н., Скачко М.В. Результаты мониторинга за холерными вибрионами акватории Таганрогского залива Азовского моря в 2011–2012 гг. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2013; 6:39–40.
6. Марамович А.С., Урбанович Л.Я., Миронова Л.В., Куликалова Е.С. Эволюция эпидемиологии холеры. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2006; 6:63–71.
7. Мединский Г.М., Ладный И.Д., Бичуль К.Г. Влияние сульфидной воды естественных источников на свойства холерных вибрионов. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1978; 2:125–9.
8. Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С. Изучение эпидемиологической значимости *Vibrio cholerae*, выделяемых из различных экологических систем. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1990; 8:62–8.

9. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Щербакова С.А., Москвитина Э.А., Титова С.В. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2016; 1:89–101.
10. Саямов Р.М., Зайденов А.М. Выживаемость и свойства холерных вибрионов при культивировании в минеральной воде. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1978; 11:66–70.
11. Сизова Ю.В., Черепихина И.Я., Бурлакова О.С. Роль температуры поверхностных водоемов в персистенции и биопленкообразовании холерных вибрионов различной эпидемиологической значимости. *Современные проблемы науки и образования.* 2015; 5:690.
12. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Самородова А.В., Тюленева Е.Г., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Иванова С.М., Ковалева Т.В., Водопьянов С.О. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006–2015 гг. Прогноз на 2016г. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:20–27. DOI: 1021055/0370-1069-2016-1-20-27
13. Хотько Н.И., Дмитриев А.П. Водный фактор в передаче инфекции. Пенза; 2002. 232 с.
14. Vagva D., Cvjetanović B. Холера в период 1961–1970 гг. В кн.: Принципы и практика борьбы с холерой. Женева; 1970. С. 15–22.
15. Sathiyamuthy K., Baskaran A., Kumar S.D. Prevalence of *Vibrio cholerae* and other vibrios from environmental and seafood sources, Tamil Nadu, India. *Brit. Microbiol. Res. J.* 2013; 3(4):538–49.

References

1. Grizhebovsky G.M. [Cholera in the Caucasus]. Stavropol; 1997. 782 p.
2. Duvanova O.V., Shimanyuk N.Ya., Mishan'kin B.N. [Ability to split twin-20 as differential test for cholera vibrios O139 serovar, of different origin]. *Klinich. Lab. Diagnostika.* 2000; 5:48–9.
3. Duvanova O.V., Mishan'kin B.N., Vodop'yanov S.O., Pisanov R.V. [Method for differentiation between *Vibrio cholerae* strains, O139 serogroup, by reference to alkylsulphatase activity]. RF Patent No 2473697. 27.01.2013.
4. Duvanova O.V., Mishan'kin B.N., Vodop'yanov A.S., Sorokin V.M. [N-acetyl-β-D- glucosaminidase of cholera vibrios]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2016; 2:41–8.
5. Mazrukho A.B., Kruglikov V.D., Monakhova E.V., Moskvitina E.A., Shestialtyanova I.S., Podoinitsyna O.A., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Pisanov R.V., Zubkova D.A., Kudryakova T.A., Ezhova M.I., Uskova N.N., Skachko M.V. [Results of monitoring over cholera vibrios in the surface waters of the Gulf of Taganrog, Azov sea, in 2011–2012]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2013; 6:39–40.
6. Maramovich A.S., Urbanovich L.Ya., Mironova L.V., Kulikalova E.S. [Evolution of cholera epidemiology]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2006; 6:63–71.
7. Medinsky G.M., Ladny I.D., Bichul' K.G. [Influence of sulfide water of natural sources on cholera vibrio properties]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1978; 2:125–9.
8. Moskvitina E.A., Podosinnikova L.S. [Studies of epidemiological significance of *V. cholerae*, isolated from different ecological systems]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1990; 8:62–8.
9. Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Kutyrev V.V., Smirnova N.I., Shcherbakova S.A., Moskvitina E.A., Titova S.V. [Topical issues of epidemiological surveillance, laboratory diagnostics, and prophylaxis of cholera in the Russian Federation]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2016; 1:89–101.
10. Sayamov R.M., Zaidenov A.M. [Survivability and properties of cholera vibrios in case of cultivation in mineral water]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1978; 11:66–70.

11. Sizova Yu.V., Cherepakhina I.Ya., Burlakova O.S. [The role of temperature of surface water bodies in the persistence and biofilm formation process of cholera vibrios with different epidemiological significance]. *Sovrem. Probl. Nauki i Obrazov.* 2015; 5:690.
12. Titova S.V., Moskvitina E.A., Kruglikov V.D., Samorodova A.V., Tyuleneva E.G., Monakhova E.V., Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Arkhangel'skaya I.V., Ivanova S.M., Kovaleva T.V., Vodop'yanov S.O. [Cholera: analysis of epidemiological situation across the world and in Russia within a period of 2006–2015. Prognosis for 2016]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:20–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-20-27.
13. Khot'ko N.I., Dmitrieva A.P. [Water Factor in Infection Transmission]. Penza; 2002. 232 p.
14. Barua D., Cvjetanović B. [Cholera during 1961–1970]. In: [Principles and Practice of Cholera Control]. Geneva; 1970. P. 15–22.
15. Sathiyamuthy K., Baskaran A., Kumar S.D. Prevalence of *Vibrio cholerae* and other vibrios from environmental and seafood sources, Tamil Nadu, India. *Brit. Mikrobiol. Res. J.* 2013; 3(4):538–49.

Authors:

Titova S.V., Men'shikova E.A., Kurbatova E.M., Lysova L.K., Arkhangel'skaya I.V., Duvanova O.V., Mironova A.V., Samorodova A.V., Moskvitina E.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:

Титова С.В., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Лысова Л.К., Архангельская И.В., Дуванова О.В., Миронова А.В., Самородова А.В., Москвитина Э.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 17.06.16.