

УДК 619:579

БАКТЕРИОФАГИ PROVIDENCIA

Н.Г.Барт, С.Н.Золотухин, Д.А.Васильев

Бактерии рода *Providencia* относятся к семейству Enterobacteriaceae. Бактерии данного рода ранее относились к одному из видов рода *Proteus*. Самостоятельное название род *Providencia* он получил лишь в 1963 году на основе Международной классификации Enterobacteriaceae, в которой входящие в него бактерии группы *Proteus* – **Providencia, так же, как и в классификационных схемах Ф.Кауфмана 1959 и 1963 гг., подразделялись на 4 рода: Proteus, Morganella, Retgerella, и Providencia.**

Позднее таксономическое положение некоторых представителей группы *Proteus* – **Providencia было пересмотрено с включением в род Providencia** нескольких видов бактерий.

В 9-ом издании «Определителя бактерий Берджи» (1994) род *Providencia* представлен 5 видами: *P.agalifaciens, P.rettgeri, P.stuartii, P.heimbachae, P.rustiginii*, отличающиеся друг от друга некоторыми биохимическими свойствами.

Бактерии рода *Providencia* выделяют из воды, почвы, фекалий и мочи животных и человека. Некоторые штаммы, вероятно входят в состав нормальной микрофлоры кишечника. Однако встречаются и патогенные штаммы, способные вызывать вспышки гастроэнтеритов, токсикоинфекций мочевых инфекций у детей и взрослых людей.

При постановке диагноза бактериологическим методом на заболевания, причиной которых являются представители рода *Providencia*, существует ряд трудностей. Одна из них состоит в том, что основной идентификации этих бактерий являются их биохимические свойства. Трудоемкость и длительность изучения ферментативных свойств не позволяют быстро и точно идентифицировать названные микроорганизмы.

В связи с этим возникла необходимость в поиске альтернативных методов лабораторной диагностики, которые были бы менее трудоемкими, более быстрыми и доступными для лабораторий любого уровня. Одним из таких методов является фагодиагностика (Адамс М., 1961; Гольдфарб Д.М., 1961; Ганюшкин В.Я., 1988, 1990; Кольпикова Т.И. и др., 1990, 1992).

Для индикации и идентификации микроорганизмов с помощью бактериофагов необходимо иметь набор фагов с определенными биологическими свойствами изыскание активных штаммов бактериофагов, лизирующих патогенные культуры *Providencia*, и является одной из целей наших исследований.

Материалом для исследований были сточные воды из животноводческих помещений и общественных туалетов разных хозяйств Ульяновской и Самарской областей (к-з «Маяк» Сурского района Ульяновской области, Учхоз УГ-СХА Чердаклинского района Ульяновской области, с-з «Волжский» Самарской области, п. Мирный Чердаклинского района Ульяновской области, центральный автовокзал г. Ульяновск и др.). Сточные воды больниц Города Ульяновска (медицинская часть УАЗ, областная клиническая больница, городская клиническая больница № 3).

В качестве индикаторных культур были использованы 8 патогенных штаммов рода *Providencia*, полученные из музея кафедры и выделенные нами из патологического материала и объектов внешней среды животноводческих ферм.

В качестве питательных сред использовали МПБ, 1,5% МПА с генциан-виолетом, 0,3 и 0,7% МПА. Бактерии рода *Providencia* культивировали в термостате при 37°C в течение 18-24 часов на МПБ.

Фаги выделяли из сточных вод методом агаровых слоев с предварительным прогреванием и центрифугированием исследуемого материала по Грациа (1936).

Селекцию изолятов фагов производили методом пассирования штаммов на индикаторных культурах с последующим клонированием типичной для каждого изолята негативной колонии.

Активность выделенных фагов определяли по методам Грациа и Апфельмана.

В результате проведенных исследований нами было выделено 17 термостабильных расщ фагов, обладающих способностью на индикаторных штаммах индикаторных культур *Providencia* образовывать негативные колонии разного диаметра от 1,0 до 2,0 мм или стерильные пятна в виде зон лизиса диаметром 4,0-8,0 мм.

Литическая активность выделенных фагов была на плотных питательных средах (по методу Грациа) от 9×10^7 до $2,4 \times 10^9$, а в жидкой среде (по методу Апфельмана) от 10^{-3} до 10^{-9} .

Таким образом, умеренные и вирулентные терморезистентные бактериофаги рода *Providencia* достаточно широко распространены в природе и их можно выделить классическими методами, используемыми разными авторами для выделения фагов энтеробактерий различных родов.

Для изучения возможности использовать выделенные и селекционированные нами фаги с целью конструирования диагностического препарата необходимо более детально изучить их биологические свойства.

В настоящее время этиопатогенетическая роль разных видов бактерий рода *Providencia* не вызывает сомнений.

Providencia патогенны для разных видов лабораторных животных (белых мышей, морских свинок, кроликов, хомяков). О заболеваниях людей, вызванных бактериями рода *Providencia*, указывали В.М. Холодкова, В.П. Рагинская (1972), А.М. Казановский (1975) и др.

О случаях обнаружения вида *Providencia rettgeri* в фекалиях больных диареей поросят-сосунов и новорожденных телят в период массовых желудочно-кишечных заболеваний молодняка сообщают Л.С. Каврук, А.Б. Кононенко, С.В. Бритова (1994) Л.С. Каврук (1994). Указанные бактерии удавалось чаще выделять на свиноводческих, реже на молочных фермах, в то время как в период относительного благополучия ферм по данным заболеваниям молодняка находки провиденций были лишь в единичных пробах фекалий поросят.

Бактерии данного вида были обнаружены в продуктах питания: газированной воде в Греции в 2005 году [6]; куриных яиц в США [7]; устрицах из реки Кокоса в Бразилии [8]; рыбе – окуне пойманной в реке Волга [9]; колбасе салями из домашней птицы в Словакии [10]. Следовательно данные бактерии

могут вызывать токсикоинфекции.

Из выше сказанного следует, что при диагностике различных заболеваний необходимо исследовать материал на обнаружение бактерий данного вида.

В частности необходимо разработать доступные и нетрудоемкие методы, позволяющие в краткие сроки точно поставить диагноз на инфекцию. Таким методом является фагодиагностика, основанная на специфичности действия бактериофагов, которая позволяет дифференцировать не только отдельные виды бактерий, но и серологически неотличимые штаммы одного и того же вида [2]. Благодаря высокой специфичности фаг размножается только на гомологичных бактериях, не реагируя на присутствие сопутствующей микрофлоры. Это позволяет обнаружить возбудитель заболевания без выделения чистой культуры [3].

В связи с отсутствием в нашей стране стандартных наборов специфических бактериофагов *Providencia*, целью наших исследований является выделение активных изолятов фагов, лизирующих бактерии рода *Providencia* и изучение некоторых их биологических свойств.

В качестве патологического материала для исследования были использованы пробы сточных вод животноводческих хозяйств Ульяновской, Самарской областей и больниц г. Ульяновска.

Индикаторными культурами служили патогенные штаммы бактерий рода *Providencia*.

В качестве питательных сред использовался мясо-пептонный бульон (МПБ), 1,5%-ный мясо-пептонный агар (МПА) с добавлением 1%-ного водного раствора генцианового фиолетового, 0,3% и 0,7%-ный МПА.

Для проведения опыта по выделению фагов из материалов внешней среды использовали суточную бульонную культуру бактерий вида *P. rettgeri*. Исследование материала на присутствие фагов проводили по следующей методике: в колбу со стерильным питательным бульоном добавляли исследуемый материал (в разведении 1:2) и по 1,0 мл суточной культуры. Колбу с содержимым инкубировали в термостате при 37°C в течение пяти суток. Затем содержимое колбы (надсадочную жидкость) в объеме 10 мл помещали в 2 стерильные пробирки. Выделение бактериофагов осуществляли методом агаровых слоев по Грациа (1936). Предварительно исследуемый материал обрабатывали хлороформом (в разведении 1:10) с последующим центрифугированием и прогреванием надсадка в течение 30 мин при температуре 60°.

Селекцию изолятов и усиление их литической активности производили путем многократного пассирования на индикаторных штаммах бактерий вида *P. rettgeri* с последующим клонированием типичной для каждого изолята негативной колонии.

Литическую активность селекционированных штаммов определяли на плотных (по Грациа) и в жидких питательных средах (по Аппельману).

В результате проведенных исследований нами было выделено 4 термостабильных изолята бактериофагов, устойчивых к хлороформу, образующих прозрачные колонии различного диаметра от 1,0 до 5,0 мм или стерильные пятна в виде зон лизиса, диаметром от 5,0 до 9,0 мм. Литическая активность выделенных фагов по методу Аппельмана составляет от 10^{-6} до 10^{-9} , по методу Грациа – от 2×10^{-8} до 1×10^{-11} (табл.1).

Таблица 1. Литическая активность фагов *P. rettgeri*

Фаги	Литическая активность по Апельманну	Литическая активность по Грациа
Н – 20	$10^6 - 10^8$	1×10^9
С – 17	$10^7 - 10^9$	1×10^{10}
Д – 1	$10^6 - 10^7$	2×10^8
М – 9	$10^7 - 10^{10}$	1×10^{11}

Изученные нами фаги бактерий вида *Providencia rettgeri* циркулируют в объектах внешней среды. Для создания диагностического препарата на основе выделенных и селекционированных нами фагов необходимо более подробно изучить их биологические свойства.

Свойство фагов не снижать литическую активность при воздействии хлороформа и температуры, в результате чего происходит инактивация бактерий, имеет огромное значение для ветеринарной практики. Поэтому при изучении биологических свойств фагов важными параметрами являются определение их устойчивости к воздействию хлороформа и обработка температурой.

Методика. Определение чувствительности бактериофагов и бактерий проводили методом обработки фаговой суспензии и бульонных культур провиденций хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании. А также обрабатывали температурой 60°. Для этого брали по три пробирки с 4,5 мл исследуемого бактериофага для обработки хлороформом, и по три пробирки для обработки температурой. Номеровали их 1х, 2х, 3х, 1т, 2т, 3т, и вносили 0,2 мл исследуемого бактериофага и 0,2 мл индикаторной культуры *Providencia rettgeri* (*Providencia rettgeri* 175 для фага Н-67 УГСХА и *Providencia rettgeri* 104а для фага С-87 УГСХА). Затем посеы культивировали в термостате в течение 3 часов при 37°C. Далее в пробирки 1х, 2х, 3х с фагом добавляли по 0,5 мл хлороформа и встряхивали пробирку № 1х в течение 15 минут, пробирку № 2х – 30 минут, пробирку № 3х – 45 минут. Пробирки обрабатывали температурой: 1т - в течение 30 минут, 2т – 40 минут, 3т – 50 минут. Активность обработанных бактериофагов определяли по методу агаровых слоев по Грациа (1936).

Накануне опыта по чашкам разливали 1,5% мясо-пептонный агар. Перед использованием чашки подсушивали в термостате 15-20 минут. Индикаторные культуры *Providencia rettgeri* 175 для фага Н-67 УГСХА и *Providencia rettgeri* 104а для фага С-87 УГСХА выращивались в условиях термостата в течение 18-20 часов при 37°C на мясо-пептонном бульоне. Стерильно подготовленный 0,7% мясо-пептонный агар, разлитый в пробирки по 2,5 мл, расплавляли и остужали до 46-48°C. Исследуемый бактериофаг в количестве 1,0 мл помещали в 2,5 мл 0,7% мясо-пептонного агара, туда же вносили 0,2 мл индикаторной культуры. Все быстро и тщательно перемешивали вращением пробирки в ладонях и выливали на поверхность 1,5% МПА. Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности мясо-пептонного агара, чашки оставляли на горизонтальной поверхности с приоткрытыми крышками на 30 минут до полного застывания агара, затем инкубировали в термостате при 37°C в течение 18-20 часов.

Для определения устойчивости бактерий рода *Providencia* к воздействию хлороформа суточные культуры штаммов *Providencia rettgeri* 175 и *Providencia*

rettgeri 104a обрабатывались этим химическим препаратом в соотношении 1:10 в течение 15, 30 и 45 минут. А для определения устойчивости бактерий данного рода к воздействию температуры суточные культуры штаммов *Providencia rettgeri* 175 и 104a обрабатывались температурой 60° в течение 30, 40 и 50 минут. Затем обработанные культуры высевали на чашки Петри методом агаровых слоев по Грациа: в остуженный 0,7% мясо-пептонный агар вносили 1 мл исследуемой культуры и 0,2 мл мясо-пептонного бульона, все быстро и тщательно перемешивали вращением пробирки в ладонях и выливали на поверхность 1,5% МПА. Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности мясо-пептонного агара, чашки оставляли на горизонтальной поверхности с приоткрытыми крышками на 30 минут до полного застывания агара, затем инкубировали в термостате при 37°С в течение 18-20 часов.

Результаты. Бактериофаги Н-67 УГСХА и С-87 УГСХА проявили не одинаковую устойчивость к воздействию хлороформа. Бактериофаг Н-67 УГСХА проявил выраженную устойчивость к воздействию хлороформом. При обработке хлороформом в течение 15 и 30 минут вышеуказанный фаг не терял своей активности. Она составляла $1,0 \times 10^9$ корпускул на 1 мл. Обработка хлороформом в течение 45 минут понизила активность фага на 50%. В то время как, фаг Н-2 УГСХА значительно терял свою активность в течение 15 минут, и существенно уменьшалось количество фаговых корпускул (до 40%). Бактериофаги клонированные из них, отмечались низкой литической активностью, которая восстанавливалась только после 3-го пассажа фага Н-2 УГСХА. При действии хлороформа на фаг Н-2 УГСХА в течение 30 минут происходила полная его инактивация. При обработке фагов Н-1 УГСХА и Н-2 УГСХА температурой 60° было выявлено, что выделенные нами бактериофаги проявили одинаковую устойчивость к заданной температуре. При обработке температурой 60° в течение 30 и 40 минут данные фаги не теряли свою активность, при обработке в течение 50 минут фаги погибали и не восстанавливались.

Обработка бактерий индикаторных штаммов *Providencia rettgeri* 175 для фага Н-67 УГСХА и *Providencia rettgeri* 104a для фага С-87 УГСХА в течение 15 минут обработки хлороформом и обработка температурой 60° в течение 30 минут приводила к их полной гибели.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что селекционированные бактериофаги Н-67 УГСХА и С-87 УГСХА проявили различную степень устойчивости к воздействию хлороформа. При действии хлороформа на фаг Н-67 УГСХА в течение 15 и 30 минут существенного уменьшения фаговых корпускул в 1 мл не наблюдалось. В то время как бактериофаг С-87 УГСХА терял свою активность при действии хлороформа в течение 15 минут, а, следовательно, является неустойчивым к действию хлороформа. При обработке бактериофагов температурой мы выявили, что бактериофаги Н-67 УГСХА и С-87 УГСХА устойчивы к температуре 60°, но только в течение 30 и 40 минут, а при обработке в течение 50 минут фаги погибают.

Также было установлено, что штаммы бактерий рода *Providencia rettgeri* 175 и *Providencia rettgeri* 104a не устойчивы к воздействию хлороформа и температуры. Это свойство можно использовать для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий при пастеризации хлороформоустойчивых и терматуроустойчивых бактериофагов.

Эффективность лечебных мероприятий во многом зависит от своевременности диагностики болезни, поэтому совершенствованию методов лабораторной диагностики указанной инфекции уделяется большое внимание.

В ветеринарной практике для ускоренного обнаружения некоторых микроорганизмов в патологическом материале и объектах внешней среды предложены индикаторные бактериофаги [2,3,4,6,7]. Метод индикации и идентификации патогенных микроорганизмов с помощью бактериофагов специфичен, не требует больших затрат времени, материалов и общедоступен.

Целью наших исследований была разработка оптимальной схемы выделения фагов *Providencia*.

В основу метода для поиска фагов положена схема, предложенная Грация (1936). Исследуемый материал (сточные воды) засеивали с бактериями *Providencia* на МПБ. Бульон инкубировали при 37°C в течение 14-18 часов, затем фильтровали через бумажные фильтры. Полученный фильтрат подогревали при 60°C в течение 30 минут для освобождения от бактерий. Наличие фага в фильтрате выявляли путем высева на плотные питательные среды (1,5% мясопептонный агар) методом агаровых слоев.

Сущность метода заключается в следующем: 1,5% мясопептонный агар с генцианвиолетом накануне опыта разлили по чашкам в количестве 25-30 мл.

Чашки, прикрытые стерильной бумагой, высушивали под бактерицидной лампой в течение нескольких часов, затем закрывали крышками и в перевернутом виде оставляли на ночь при комнатной температуре для полного высушивания агара в чашках, так как малейшее увлажнение может исказить результаты опыта. Предварительно разлитый в пробирку 0,7% агар в количестве 2,5 мл расплавляли и остужали до 46-47°C. 1 мл исследуемого фильтрата вносили в 2,5 мл 0,7% агара, туда же вносили 0,2 мл индикаторной культуры *Providencia* № 175 и 104а.

Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности 1,5% агара, для затвердения чашки оставляли на столе в течение 30 минут, а затем выдерживали в термостате при 37°C в течение 20-24 часов. При наличии фага на чашках обнаруживали негативные колонии или зоны лизиса.

По указанной схеме нами было исследовано 7 проб сточных вод, взятых из животноводческих ферм УЧХОЗа УГСХА, клинических больниц г. Ульяновска, Ульяновского мясокомбината. Из двух проб было выделено 2 фага (табл.2).

Таблица 2

№ штамма фага	Морфология негативных колоний селекционированных колифагов	Литическая активность по Аппельману	Литическая активность по Грация
№ 1 Н-67	D = 1 мм, с ровными краями, прозрачные	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
№ 2 С-87	D = 2 мм, с ровными краями, прозрачные	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹

Для селекции клонов фагов бактериологической петлей отщипывали одну негативную колонию и помещали в пробирку с МПБ и индикаторной культурой

провиденций. Пробирки инкубировали в термостате при 37°C в течение 3-4 часов, прогревали при 60°C и полученный фаголизат вновь исследовали методом агаровых слоев. Каждый штамм пассировали 7-10 раз до получения расы колифага с однородными негативными колониями.

Селекционированные бактериофаги имели прозрачные негативные колонии с ровными краями диаметром 1,0-2,0 мм (табл.). Литическая активность составила по Аппельману 10^{-8} , по Грациа 10^{-9} .

Литература:

1. Адамс М. Бактериофаги (перевод с английского) // -М., - 1961. -521С.
2. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии // Учебное пособие – Ульяновск. – 1988. – С.45.
3. Ганюшкин В.Я. Обследование свиней на носительство сальмонелл и фагопрофилактика.// Вопросы ветеринарной микробиологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы. – Ульяновск. – 1990. – С.20-28.
4. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия.// -М.: Медгиз. -1961. – С.297.
5. Золотухин С.Н., Каврук Л.С., Васильев Д.А. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями. – Ульяновск. – 2005. – С.48-51.
6. Кольпикова Т.И., Бакулов И.А., Котляров В.М. Фаготипирование листерий. / Ветеринария. -№6. – 1990. –С.31-32.
7. Кольпикова Т.И., Бакулов И.А., Котляров В.М. Перспективы практического применения листериозных бактериофагов. // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии./ Материалы научной конференции ВНИИВиМ. – Покров. -1992. –Часть 11. –С.211-212.
8. Мищенко В.А. и др. Некоторые аспекты патогенеза диареи новорожденных телят. Ветеринария, 1999, № 9 –С.105-110.
9. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: «Урожай», 1978. –С.20-21.