

Новые бактериальные патогены в промышленном птицеводстве

Г. Лаптев, Н.Новикова, Е.Йылдырым, Д.Тюрина, Л.Ильина, А.Дубровин, Н.Тарлавин, В.Филиппова, ООО «БИОТРОФ»

Характерная для настоящего времени глобальная сеть межконтинентальных связей, высокая скорость перемещения кормов, кормовых добавок, племенного материала, сельскохозяйственной продукции, населения, в том числе из стран с низким уровнем санитарно-эпидемиологического и ветеринарного контроля, курс, направленный на сверхпродуктивность, значительная скученность поголовья и пр. — в разы увеличивают риски, связанные с распространением опасных, высоковирулентных патогенов

В связи с повышенным уровнем экологической адаптации возбудители заболеваний часто проявляют способность циркулировать во многих звеньях технологической цепи птицефабрик, формируя стойкие очаги инфекций, а также распространяются за пределы производств, представляя опасность для человека. Наблюдается постоянное образование новых эпидемических форм, возврат ликвидированных инфекций вследствие заноса возбудителей из эпидемиологически неблагополучных регионов мира, маскировка патогенов вследствие межвидовой рекомбинации (перераспределения генетического материала — ДНК, приводящего к появлению новых комбинаций) и др. За последние три десятилетия было обнаружено более 30 новых патогенов человека, источником 75% из которых были животные и птицы. Ряд новых эпидемических заболеваний, например COVID-19, приводят к катастрофическим последствиям, выражающимся в массовой гибели людей. Значительные угрозы для здоровья животных и человека со стороны новых инфекционных заболеваний побуждают к принятию серьезных мероприятий по их своевременному выявлению и контролю.

Новый уровень диагностики

Лаборатории, практикующие классические высевы на питательные среды, закономерно испытывают трудности при выделении патогенов, поскольку инфекционные агенты, как правило, медленно растут на питательных средах, их рост подавляет вторичная микрофлора либо они вообще не имеют способности к культивированию. Поэтому в настоящее время целесообразно на птицеводческих предприятиях использовать молекулярно-генетических методов идентификации возбудителей заболеваний. Другие современные системы идентификации, такие как MALDI-TOF масс-спектрометрия, не получили признания для типирования многих патогенов до вида, поскольку используемые алгоритмы обеспечивают в основном идентификацию только до рода.

В лаборатории НПК «БИОТРОФ» функционирует единственный в России Центр молекулярно-генетических исследований микробиома сельскохозяйственных животных. Применяемый специалистами метод

NGS-секвенирования 16S-региона рНК бактерий позволяет определить все 100% микроорганизмов в сообществе, включая некультивируемые формы.

Возбудитель заболеваний суставов

Специалисты птицеводческих предприятий все чаще регистрируют у птиц проблемы опорно-двигательной функции, экономические потери от которых могут достигать весьма высоких показателей.

В последние годы установлено, что важную роль в возникновении заболеваний опорно-двигательного аппарата играют бактерии вида *Enterococcus cecorum*. Первоначально *E. cecorum* (более раннее название *Streptococcus cecorum*) был описан как представитель нормофлоры кишечника птицы, выявляемый преимущественно у цыплят. Однако впоследствии это мнение было пересмотрено, поскольку было установлено, что многие штаммы *E. cecorum* патогенны для птицы.

К предпосылкам, способствующим развитию инфекции *E. cecorum* у птицы, относят особенности ее анатомического строения — наличие подвижного сочленения грудного отдела (свободного позвонка), где и происходит размножение патогена, что приводит к негативным последствиям и способствует нарушению сосудистого кровообращения (рис. 1).

Есть мнение, что значимым фактором могли стать изменения генотипа птицы в процессе селекции в сторону ее высокой продуктивности. Организм бройлеров, которые считаются наиболее подверженными заболеванию, в силу интенсивного наращивания мышечной массы не выдерживает повышенной нагрузки на костную и суставную ткань.

При вспышках инфекционных заболеваний в птицеводствах сначала наблюдается первая волна смертности с патологоанатомической картиной септицемии. При вскрытии на стадии септицемии отмечается характерная картина поражения внутренних органов: фибринозный перикардит, перигепатит, застойные легкие и спленомегалия. В дальнейшем через 10–14 дней развивается вторая волна, связанная с возникновением хромоты, параличом конечностей и повреждением позвоночника, ведущими к обездвиживанию и потере массы тела. У больных осо-

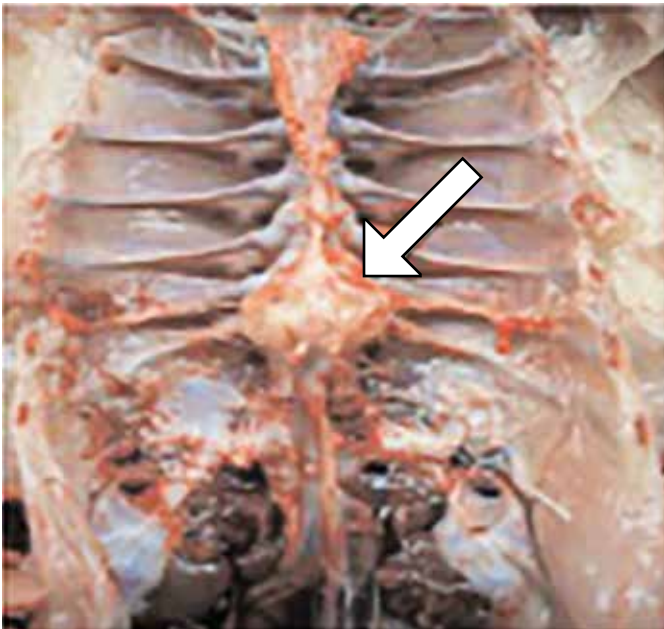


Рис. 1. Продольный разрез позвоночного столба бройлера с картиной пареза: пораженные остеомиелитом позвонки сдавливают спинной мозг (стрелка), приводя к проявлению клинических признаков

бей наблюдаются затруднения в перемещении, хромота, птица присаживается и принимает характерное сидячее положение с краниально вытянутыми обеими ногами. Уровень заболеваемости в стаде в среднем достигает 35%, летальность — до 15%.

Наибольшее опасение вызывает тот факт, что при инфицировании птицы патогенные штаммы *E. secorum* могут достаточно быстро передаваться внутри стада. При этом на предприятиях, где было зафиксировано заболевание, часто наблюдаются повторные вспышки. Это может быть связано с тем, что патогенные штаммы *E. secorum* обладают повышенной устойчивостью к противомикробным препаратам — энрофлоксацину, тейкопланину, доксициклину, эритромицину и имеют сразу несколько генов вирулентности.

В связи с высокой частотой обнаружения *E. secorum* в кишечнике одним из важнейших механизмов поражения организма птицы патогеном предполагают возможность его проникновения в кровоток при нарушении кишечного слизистого барьера, сопутствующем бактериальным энтеритам, клостридиозам, кокцидиозам и пр.

Известно, что у птиц в таких случаях наблюдается явление бактериальной транслокации, т.е. миграции патогенных микроорганизмов и их токсинов из просвета кишечника в лимфатическую систему, кровь, проникновение их в большой и малый круги кровообращения и последующее инфицирование различных систем и органов. Такое развитие событий чаще всего происходит при ослаблении иммунитета, в результате чего патогенные формы получают возможность нарушать эпителиальный барьер кишечника с помощью различных механизмов: деградации специфических белков, разрушения клеточного цитоскелета и др.

Мониторинг *E. secorum* на птицефабриках РФ

Ученые компании «БИОТРОФ» впервые провели мониторинг присутствия *E. secorum* на птицеводческих предприятиях нашей страны. Всего было проанализировано 134 образца содержимого кишечника птицы, в том числе от цыплят-бройлеров, кур-несушек, родительского поголовья. При этом процент поражения кишечника *E. secorum* среди клинически здоровой птицы был существенным и составил для бройлеров 55%, несушек — 50%, родительского поголовья — 78% (рис. 2). *E. secorum* обнаруживался у птицы уже в двухсуточном возрасте. Процент встречаемости *E. secorum* у птицы с заболеваниями различной этиологии оказался ожидаемо более высоким по сравнению с клинически здоровой птицей практически всех исследованных групп.

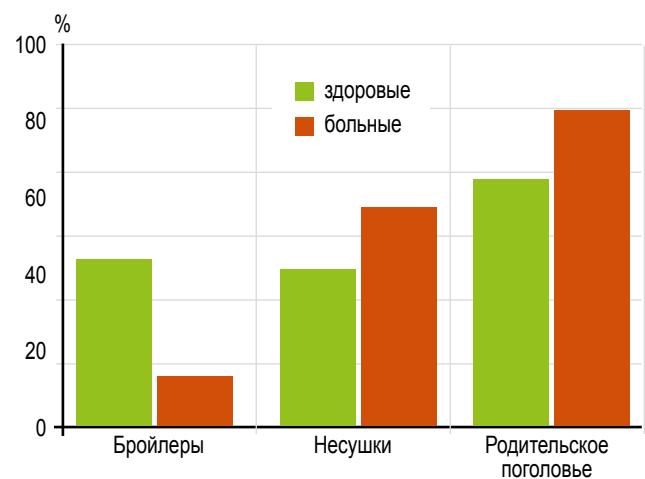


Рис. 2. Анализ распространения *E. secorum* в ЖКТ птицы методом NGS-секвенирования (n=134)

Пробиотик для контроля *E. secorum*

В условиях одной из птицефабрик на птице родительского стада был проведен эксперимент по оценке эффективности пробиотика Профорт в отношении *E. secorum* в сравнении с препаратом зарубежного производства. Зарубежный пробиотик включал смесь кишечных бактерий и применялся на птице одной из групп однократно, на птице из другой группы — двукратно.

Как видно из рис. 3, по данным NGS-секвенирования, наибольшая доля патогенной бактерии *E. secorum* была обнаружена в кишечнике птиц, дважды получавших зарубежный препарат (забитых в 106-суточном возрасте), и составляла 1,62%. В составе микробиома кишечника птиц группы с введением Профорта опасных патогенов обнаружено не было. Это связано с тем, что штаммы в составе пробиотика Профорт имеют повышенный уровень антимикробной активности в отношении патогенов за счет синтеза активных пептидов — бактериоцинов.

Соответственно, проблема распространения *E. secorum* у сельскохозяйственной птицы может достаточно эффективно решаться коррекцией микробиома пищеварительной системы с помощью правильно подобранных биологических добавок.

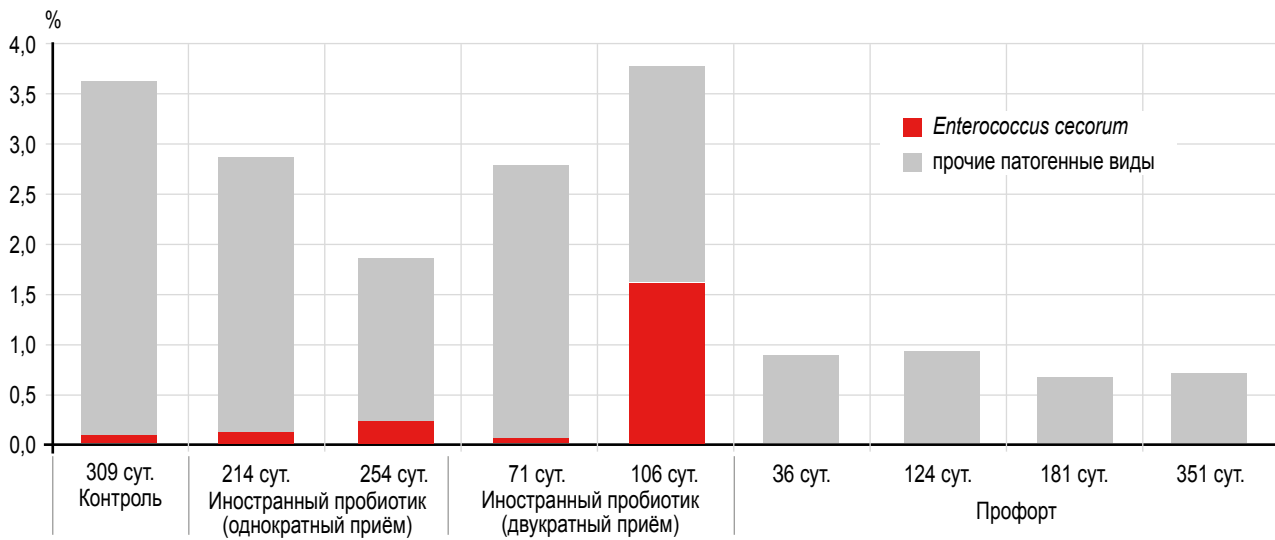


Рис. 3. Содержание *E. secorum* в слепых отростках кишечника птиц родительского стада

Acinetobacter radioresistens

Не так давно к нам обратились специалисты одной из птицефабрик для помощи в идентификации возбудителя вторичной бактериальной инфекции бройлеров, возникшей на фоне ослабления иммунитета вирусной этиологии. Поскольку компания «БИОТРОФ» проводит анализы анонимно, название предприятия не раскрывается. Заболевание достигло масштабов эпизоотии, приводя к массовому падежу птицы. При патологоанатомическом вскрытии павших цыплят на птицефабрике ветеринарные врачи отмечали поражения печени, сердца, яйцеводов, которые были симптомами острой фазы заболевания, более поздними симптомами были аэросаккулиты.

Как показали анализы методом NGS-секвенирования патологического материала (семи образцов печени, сердца, яйцеводов и тонкого кишечника), отобранного от больных бройлеров, причиной внезапной гибели птиц явилось развитие на фоне вирусного инфекционного бронхита вторичной бактериальной

инфекции, вызванной бурным преимущественным ростом микроорганизма *Acinetobacter radioresistens* (рис. 4) и сопровождающейся системными нарушениями в организме птицы.

Лечили не от того

Многие виды рода *Acinetobacter*, когда-то считавшегося организмами с низкой вирулентностью, на сегодняшний день являются клинически значимыми патогенами. Ранее роль микроорганизмов *Acinetobacter sp.* недооценивалась в связи с отсутствием адекватной возможности идентификации.

Среди различных видов ацинетобактера *Acinetobacter baumannii* считается самым распространенным патогеном, вызывающим широкий спектр инфекций, но изучается он в основном в связи с заболеваниями человека. Пневмония и бактериемия у людей с ослабленным иммунитетом — наиболее часто регистрируемое проявление *A. baumannii* в отделениях интенсивной терапии. Действительно, Американское

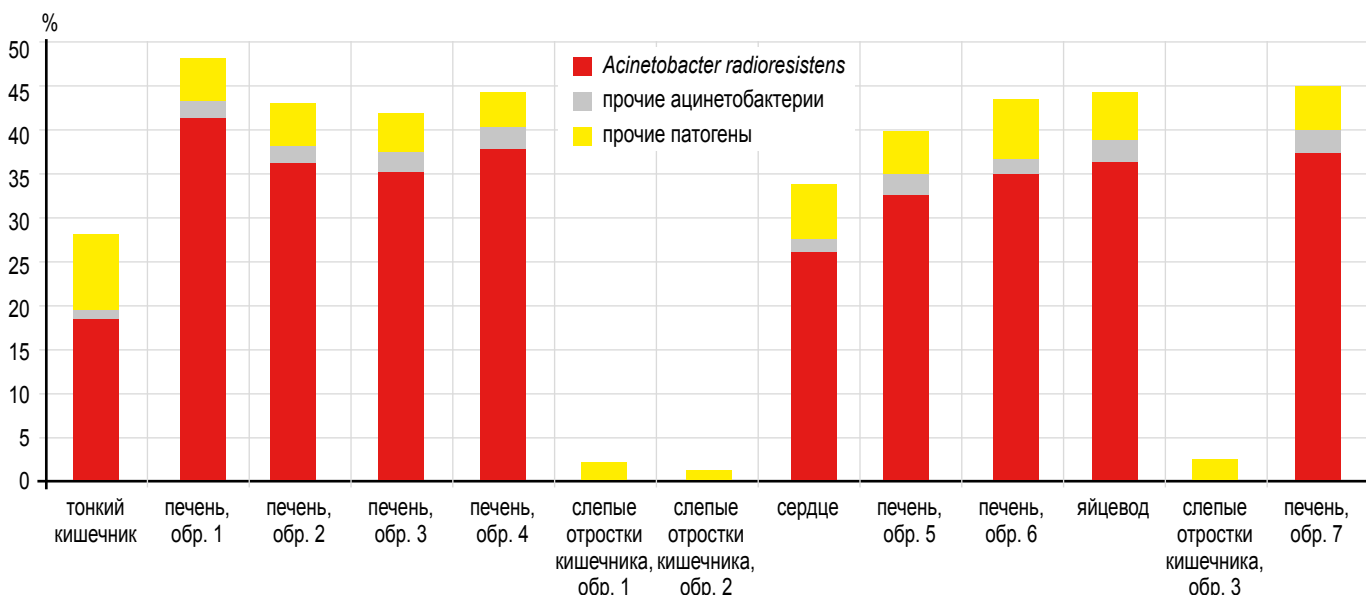


Рис. 4. Анализ состава микробиоты патологического материала, отобранного от больных бройлеров, методом NGS-секвенирования

ПРАКТИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ ДЛЯ ЖИВОТНОВОДСТВА

БИОТРОФ



БИОТРОФ

здоровый микробиом
- основа продуктивности

общество инфекционных заболеваний (IDSA) классифицировало *A. baumannii* как один из шести бактериальных патогенов, представляющих непосредственную угрозу для здравоохранения США, поскольку они вызывают большинство внутрибольничных инфекций и проявляют устойчивость ко многим доступным в настоящее время антибиотикам.

Однако к 2013 году в связи с развитием молекулярно-биологических методов идентификации стало появляться достаточно много сообщений об инфекциях *A. baumannii* у сомов, свиней, крупного рогатого скота и уток в Китае, демонстрирующих тенденцию к увеличению случаев заражения *A. baumannii* у сельскохозяйственных животных.

В 2016 году применение секвенирования 16s рРНК позволило идентифицировать штамм *A. baumannii* CCGGD201101, ставший причиной массовой гибели цыплят в китайской провинции Цзилинь [1]. В публикации отражены данные о клинических симптомах при поражении бройлеров *A. baumannii* CCGGD201101, которые включали спастичность и ригидность конечностей (рис. 4А), оральное кровотечение (рис. 4Б) и отеки желчного пузыря.

Коллективом ученых [2] был описан также факт инфицирования цыплят-бройлеров другим видом ацинетобактерий — *Acinetobacter iwoffii*, который вызывал респираторный дистресс, диарею и поражение конечностей, что приводило к гибели птиц. Исследователями был сделан вывод, что употребление недозаваренного мяса от пораженной птицы может привести к заражению человека.

Выявленный нами возбудитель септицемии бройлеров *A. radioresistens*, ранее был известен лишь как патоген, опасный для человека, и был описан в нескольких случаях пневмонии, бактериемии и септицемии. Выделение и идентификация этого патогена классическими методами микробиологии, а также биохимическими методами практически невозможны. Вероятность ошибочной идентификации

A. radioresistens с помощью таких методов ставит вопрос об истинной эпидемиологии этого организма. Вполне вероятно, что некоторые из ранее зарегистрированных инфекций сельскохозяйственных животных и птицы, вызванных другими видами *Acinetobacter* или микроорганизмами из родственных таксонов, на самом деле были вызваны *A. radioresistens*.

Источники инфекции *A. radioresistens*

Что касается уровня вирулентности *A. radioresistens*, то данный микроорганизм входит в группу условно-патогенных обитателей пищеварительной системы птиц и в норме выполняет функции, аналогичные представителям нормофлоры. Тем не менее результаты проведения полногеномного секвенирования *A. radioresistens* [3], выделенного из кишечника бройлеров, показали, что в геноме данного вида присутствует значительное количество белков, связанных с вирулентностью.

Хорошо известно, что кишечные капилляры могут транспортировать бактерии и их токсины в печень через портальную систему, а бактерии и эндотоксины являются нормальным компонентом портальной венозной крови. В норме кишечные токсины и бактерии, попадающие в печень через портальную систему, выводятся клетками Купфера и ретикулоэндотелиальными клетками печени. Однако на фоне иммуносупрессий у птиц бактерии, в частности *A. radioresistens*, и эндотоксины, содержащиеся в портальной крови, могут вызывать повреждение гепатоцитов. Постоянная антигенная стимуляция печени, связанная с дисбалансом микрофлоры кишечника и аномальными реакциями организма на антигены из-за нарушения работы иммунной системы, может привести к длительной воспалительной реакции и гепатиту, проявляющемуся в виде гранулем в печени. Возникшая септицемия может вызвать целый ряд заболеваний, в том числе аэросаккулиты, токсикоз, перикардиты и др.

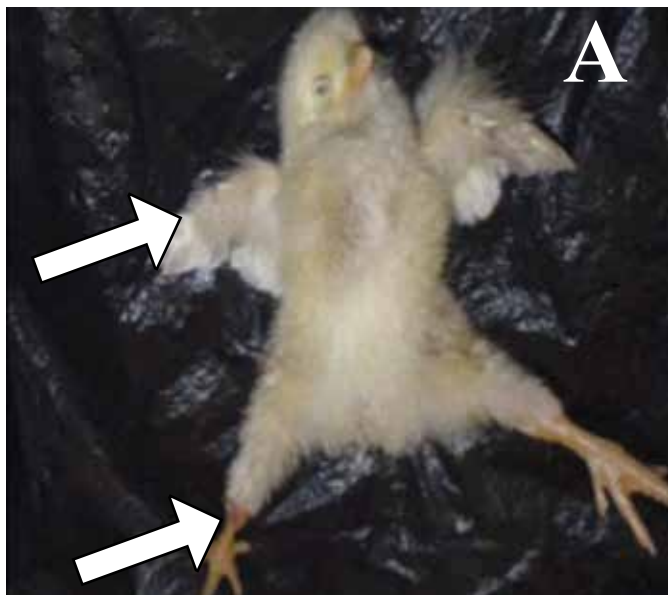


Рис. 5. Патологоанатомическая картина поражений бройлеров *A. baumannii*: А — спастичность и ригидность конечностей, Б — оральное кровотечение

Мы предположили, что в нашем исследовании на фоне снижения иммунитета у птиц вследствие вирусного инфекционного бронхита произошел дисбаланс кишечной микрофлоры, вследствие чего целостность кишечного барьера могла быть нарушена. На этом фоне печень утратила способность эффективно нейтрализовать бактерии и токсины, проникающие из кишечника, что привело к повышению восприимчивости организма к вторичным инфекциям.

Для поиска решения проблемы было проведено исследование микробиологического состава используемых на птицефабрике кормов и кормовых добавок. Оказалось, что имеющиеся проблемы — это во многом результат низкого качества пробиотика (европейского производства), применяемого на бройлерах, а заражение *A. radioresistens*, вероятно, произошло пероральным путем. Дело в том, что производителем заявлен следующий состав пробиотика: *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus salivarius*. Реальный же состав препарата практически не соответствовал заявленному (рис. 6). Более того, в составе пробиотика в значительном количестве (10,5%!) выявлялись патогенные бактерии того самого вида, который был связан с падением птицы, — *Acinetobacter radioresistens*.

Выпуск таких биопрепаратов — это лишь результат работы рынка и спроса со стороны потребителя.

В чем же причина несоответствия пробиотика?

Дело в том, что в погоне за удовлетворением потребительского спроса практически никто из производителей пробиотиков не желает тратить время и не-

сти колоссальные финансовые затраты, так как грамотная разработка пробиотика с нуля до финального продукта занимает около 20 лет. Пробиотики, возникшие ниоткуда, — это своего рода лотерея, и никогда нельзя знать наверняка, соответствует ли состав паспорту качества и какой ожидается эффект. Поэтому к любой рекламе без отсутствия доказательной базы нужно относиться критически. Ошибки могут быть не только на этапе разработки, но и в процессе производства. Так, эксплуатация ферментеров, необходимых при производстве пробиотических бактерий, связана со многими факторами риска.

Нужно также учитывать тот факт, что производство многих препаратов компаниями за рубежом идет «для России». Грубо говоря, в понедельник, среду и пятницу препарат производится для поставки в Евросоюз, что определяет более жесткий контроль при производстве и «на выходе», а во вторник и четверг — в Россию. Контролирующие инстанции всегда имеют возможность внезапно прийти на завод, расположенный в России, изъять образцы препарата, проверить их качество, условия, в которых препарат производится. В отношении зарубежных производителей такой возможности нет.

Вывод

На наш взгляд, специалистам птицеводческих предприятий необходимо принять во внимание информацию об опасности новых патогенов *E. secorum* и *A. radioresistens* для птиц и людей — потребителей продукции птицеводства, чтобы не пропустить возникшую угрозу. Полученные знания обосновывают необходимость разработки новых критериев в системе санитарно-эпидемиологического контроля продовольственного сырья и готовой продукции, в том числе на основе создания и внедрения высокочувствительных и эффективных методов молекулярно-генетического анализа. Одним из перспективных способов снижения распространения мультирезистентных к антибиотикам патогенов в птицеводстве является нормализация микробиома пищеварительного тракта птицы при помощи пробиотиков, обладающих высокой антимикробной активностью в отношении патогенов. Тем не менее следует помнить, что разработка и производство пробиотиков — это сложные наукоемкие технологические процессы, требующие больших интеллектуальных вложений (иначе и быть не может, поскольку мы вмешиваемся в сложные процессы микробиологии, метаболизма и иммунитета животных). Поэтому перед покупкой стоит узнать чуть больше о производителе препарата, при этом не так важна страна производства.

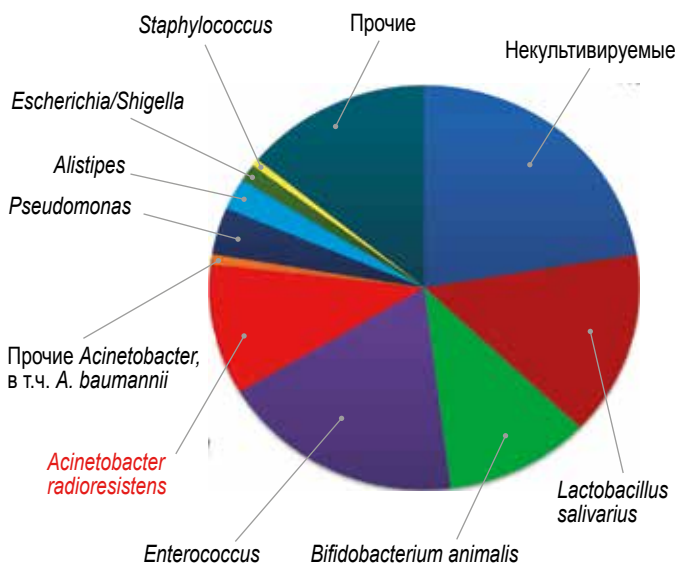


Рис. 6. Реальный состав пробиотика европейского производства методом NGS-секвенирования, %

Литература

1. Liu, D. Characterization of a highly virulent and antimicrobial-resistant *Acinetobacter baumannii* strain isolated from diseased chicks in China / D. Liu, Z.S. Liu, P. Hu et al. // *Microbiol Immunol.* — 2016. — 60(8). — P. 533–539. doi:10.1111/1348-0421.12400.
2. Wani, S.A. Isolation of *Acinetobacter iwoffii* from broiler chicken with septicaemia in Kashmir valley / S.A. Wani, I. Samanta, M.A. Bhat // *Medicine Indian Journal of Animal Research.* — 2006. — P. 61–63.
3. Crippen, C. Complete genome sequence of *Acinetobacter radioresistens* strain LH6, a multidrug-resistant bacteriophage-propagating strain / C. Crippen, S. Huynh, W.G. Miller et al. // *Microbiology Resource Announcements.* — 2018. — 7(5). — e00929-18. doi:10.1128/MRA.00929-18.
4. Betts, G. *Food Spoilage Microorganisms* / G. Betts // Woodhead Publishing. — 2006. — P. 736.