

УДК 579.8:636.5

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.1.22

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ДОМИНИРУЮЩИХ ЭТИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ БАКТЕРИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ПРОМЫШЛЕННОМ ПТИЦЕВОДСТВЕ

С.А. Макавчик, к.в.н., доцент orcid.org/0000-0001-5435-8321, Смирнова Л.И., к.в.н., доцент, А.А. Сухинин, д.б.н., профессор orcid.org/0000-0002-1245-3440, В.А. Кузьмин, д.в.н., профессор orcid.org/0000-0002-6689-3468, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», Санкт-Петербург

Ключевые слова: бактерии, птицы, микробиологические методы, культивирование, термофильные кампилобактерии.

Key words: bacteria, poultry, identification, molecular biological methods, cultivation, thermophilic campylobacteria.

Исследование выполнено в рамках выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (Соглашение Минсельхоза России от 21.01.2021 № 082-03-2021-259/1). The study was carried out as part of the fulfillment of the state task for the provision of public services (Agreement of the Ministry of Agriculture of Russia dated January 21, 2021 No. 082-03-2021-259/1).



РЕФЕРАТ

Проблема распространения бактериальных инфекций птиц, ассоциированных с условно-патогенными микроорганизмами, занимает значительное место в современной инфекционной патологии птиц.

Цель работы – определить видовое разнообразие доминирующих этиологически значимых бактерий, циркулирующих в промышленном птицеводстве.

По результатам за период 2019 по 2020 г. нами были проведены бактериологические исследования патологического материала от птиц на птицефабриках различного технологического направления.

Доминирующими видами являются *Escherichia coli*, удельный вес которой составляет 50,7%, *Enterococcus faecalis* - 25,4% и *Proteus mirabilis* - 8,4%. Также из органов были выделены термофильные *Campylobacter spp.* - 4,3%, среди которых такие эпидемиологически опасные виды, как *Campylobacter jejuni*. Микроорганизмы были вирулентны, отличались по культурально-биохимическим свойствам.

Такие культуры как *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* выделяются из многих органов, что свидетельствует о генерализованности инфекционного процесса, культуры термофильных *Campylobacter spp.* были выделены из печени, что указывает на органотропность этих видов микроорганизмов.

Видовой состав выделяемой микрофлоры обусловлен эпизоотической ситуацией в каждом отдельном хозяйстве, следствием чего является различное процентное соотношение доминирующих видов.

Получены чистые культуры термофильных кампилобактерий на селективном агаре Престона с культивированием в течение 7 суток при температуре 42 °С в микроаэрофильных условиях. Культивирование таких видов, как *Campylobacter hepaticus*, было затруднено, поскольку они чувствительны к ряду противомикробных препаратов, ис-

пользуемых в средах для обогащения *Campylobacter* и селективном агаре.

Появление новых видов *Campylobacter* требует пересмотра алгоритмов фенотипической идентификации. Необходимо обновить базы данных масс-спектрометрии MALDI TOF и разработать специфические праймеры для идентификации новых видов *Campylobacter*.

Значительная вариабельность показателей выявления той или иной микрофлоры из печени и желчного пузыря указывает на существенные различия в этиологии бактериальных инфекций птиц.

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные болезни птиц и животных, вызванные условно-патогенными полирезистентными микроорганизмами с атипичными биологическими свойствами, отличаются более тяжелым течением, хроническим или латентным инфекционным процессом, что увеличивает продолжительность лечения [2].

Условно-патогенные полирезистентные микроорганизмы («ESCAPE»-патогены – от англ. «escape» — ускользать, избегать, спасаться) эффективно «избегающие» действия антибактериальных препаратов, вызывают самые тяжелые, хронические и латентные инфекционные процессы [2].

Многие виды *Campylobacter* колонизируют кишечник домашней птицы и водоплавающих птиц, но, как правило, не являются патогенными для птиц. Исключением составляет *Campylobacter hepaticus* – возбудитель пятнистой болезни печени у кур-несушек [3,4, 5, 7, 8].

Campylobacter jejuni – это преобладающий вид, связанный с инфекцией пищевого происхождения, происходящей от домашней птицы, но в некоторых случаях из кишечного тракта птиц также могут выделяться *C. coli* и *C. lari* [1,4, 6, 7, 10,11].

В условиях нарушения адаптационных механизмов, при иммунодефицитных состояниях, вызванных действием различных факторов, нерациональное применение антибактериальных средств приводит к тому, что патогенные персистирующие бактерии вызывают бактериальные инфекции, нанося значительный ущерб птицеводческим хозяйствам [3, 5, 6].

Разнообразный видовой спектр микроорганизмов, формирование ими в орга-

низме микробных биопленок, трудно культивируемые и атипичные формы возбудителей осложняют диагностику, проведение профилактики и своевременного лечения [2,4].

Проблема распространения бактериальных инфекций птиц, ассоциированных с условно-патогенными микроорганизмами, занимает значительное место в современной инфекционной патологии птиц. Несмотря на противоэпизоотические мероприятия, частота возникновения таких инфекций, летальность и увеличение стоимости лечения продолжают возрастать [2].

Для успешной фармакотерапии птиц важны видовая идентификация возбудителей, анализ антибиотикограмм и правильная интерпретация результатов, надзор за механизмами антибиотикорезистентности. Это необходимо ветеринарным врачам для осуществления рационального подбора антибактериальных препаратов и прогнозирования их клинической эффективности. В птицеводческих хозяйствах алгоритм антимикробной терапии требует пересмотра чаще, чем другие виды лечения.

Учитывая вышеизложенное, цель работы – определить видовое разнообразие доминирующих этиологически значимых бактерий, циркулирующих в промышленном птицеводстве

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичные посевы из печени и желчного пузыря делали на колумбийский агар с бараньей кровью, МПБ, МПБ с 6,5% соли, среду Кода, среду Эндо, затем инкубировали посевы при 37°C в течение 24 часов.

Получали чистую культуру, изучали морфологические, культурально-

биохимические и патогенные свойства. Для последующей идентификации стрептококков и энтерококков до вида применяли тест-системы: STREPTOtest 24 («Erba Lachema», Чешская Республика) и api 20 Strep («BIOMERIEUX», Франция), для идентификации энтеробактерий использовали Enterotest 24 N, EnteroRapid 24 («Erba Lachema», Чешская Республика), api 20 E и Rapid 20 E («BIOMERIEUX», Франция), для идентификации грамотрицательных неферментирующих бактерий использовали Nefermtest 24 («Erba Lachema», Чешская Республика).

Культивирование кампилобактерий проводили в микроаэрофильных условиях в течение 5-7 суток при температуре 42 °C с применением микроаэрофильно-генерирующей системы: газогенерирующих пакетов «Кампилогаз», анаэротат.

Для выделения кампилобактерий применили модифицированный бульон Престона, инкубировали при 37 ° C в микроаэрофильных условиях в течение 7 дней, а затем изолировали на селективный агар Престона, эритрит-агар с селективными добавками фирмы Oxoid и 5-7% дефибринированной крови лошади. Для идентификации использовали коммерческие тестовые системы (API Campy).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По результатам за период 2019 по

2021 г. нами были проведены бактериологические исследования патологического материала птиц на птицефабриках различного технологического направления. Всего было исследовано 60 трупов павших и вынужденно убитых птиц из 4-х птицефабрик. Посевы делали из крови сердца, печени, желчного пузыря.

Микроорганизмы были вирулентны, отличались по культурально-биохимическим свойствам. Видовой состав микроорганизмов, выделяемых из трупов птиц, представлен в таблице 1.

Из таблицы видно, что из трупов птиц выделены 71 культура шести видов микроорганизмов. Доминирующими видами являются *Escherichia coli*, удельный вес которой составляет 50,7%, *Enterococcus faecalis* - 25,4% и *Proteus mirabilis* - 8,4%. Также из органов были выделены термофильные *Campylobacter spp.*- 4,3%, среди которых эпидемиологически опасные виды, такие как *Campylobacter jejuni*.

Из данных, представленных в таблице, видно, что такие культуры, как *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, выделяются из многих органов, что свидетельствует о генерализованности инфекционного процесса.

Культуры термофильных *Campylobacter spp.* были выделены из печени, что

Таблица 1

Видовой спектр различных видов микроорганизмов, выделенных из патологического материала птиц на птицефабриках

Виды культур	Термофильные <i>Campylobacter spp.</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	Всего культур
60 проб	4	18	36	3	4	6	71
Удельный вес в %	5,6	25,4	50,7	4,3	5,6	8,4	100

указывает на органотропность этих видов микроорганизмов.

Видовой состав выделяемой микрофлоры обусловлен эпизоотической ситуацией в каждом отдельном хозяйстве, следствием чего является различное процентное соотношение доминирующих видов.

Получены чистые культуры термофильных кампилобактерий на селективном агаре Престона с культивированием в течение 7 суток при температуре 42 °C в микроаэрофильных условиях.

Учитывая особенности роста в режиме культивирования до 7 суток, культурально-биохимические свойства, отсутствие роста на средах с цефоперазоном можно предположить, что некоторые выделенные изоляты относятся к виду *Campylobacter avium* или *Campylobacter hepaticus*.

Культивирование *C. hepaticus* затруднено, поскольку он чувствителен к ряду противомикробных препаратов, используемых в средах для обогащения термофильных видов *Campylobacter* и селективном агаре.

Коммерческие тестовые системы (API Camпу) в настоящее время не позволили идентифицировать *Campylobacter avium* и *Campylobacter hepaticus*.

Видовая идентификация и дифференциация термофильных видов *Campylobacter* с применением MALDI TOF масс-спектрометрии и полимеразной цепной реакции затруднительна в практической работе. Появление новых видов термофильных *Campylobacter* требует пересмотра алгоритмов фенотипической идентификации: обновления базы данных MALDI TOF масс-спектрометрии и разработки, специфических праймеров для идентификации новых видов *Campylobacter*.

ВЫВОДЫ

Значительная вариабельность представителей той или иной микрофлоры, выделенной из печени и желчного пузыря, указывает на существенные различия в этиологии бактериальных инфекций птиц. В каждом птицеводстве наблюдается особенный спектр доми-

нирующих этиологически значимых бактерий.

Внедрение в лабораторную практику молекулярных методов исследований для идентификации возбудителей и быстрого получения результатов анализа позволит в короткие сроки принимать решения по схеме лечения птиц, а точная идентификация патогенных микроорганизмов сокращает спектр используемых антибиотиков, что поддерживает продуктивность на высоком уровне и обеспечивает продовольственную безопасность.

Исследование выполнено в рамках выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (Соглашение Минсельхоза России от 21.01.2021 № 082-03-2021-259/1).

SPECIES DIVERSITY OF DOMINANT ETIOLOGICALLY SIGNIFICANT BACTERIA CIRCULATING IN INDUSTRIAL POULTRY. Makavchik S.A. - candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor, Smirnova L.I. - candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor, Sukhinin A.A. - doctor of Biological sciences, professor, Kuzmin V.A. - doctor of Veterinary Sciences, professor, «St. Petersburg state University medicine», St. Petersburg.

ABSTRACT

The problem of the spread of bacterial infections of birds associated with opportunistic microorganisms occupies a significant place in the modern infectious pathology of birds.

The aim of this work is to determine the species diversity of the dominant etiologically significant bacteria circulating in industrial poultry farming.

Based on the results for the period 2019 to 2020, we carried out bacteriological studies of pathological material from birds in poultry farms of various technological directions.

The dominant species are *Escherichia coli*, which accounts for 50.7%, *Enterococcus faecalis* - 25.4%, and *Proteus mirabilis* - 8.4%. Also, thermophilic *Campylobacter* spp. - 4.3% were isolated from the organs, including such epidemiologically dangerous species as *Campylobacter jejuni*. The microorganisms were virulent and differed in their cultural and biochemical properties.

Cultures such as *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus fae-*

calis are isolated from many organs, which indicates the generalization of the infectious process, the culture of thermophilic *Campylobacter* spp. were isolated from the liver, which indicates the organotropy of these types of microorganisms.

The species composition of the allocated microflora is determined by the epizootic situation in each individual farm, which results in a different percentage of the dominant species.

Pure cultures of thermophilic *Campylobacter* were obtained on selective Preston agar with cultivation for 7 days at a temperature of 42 °C under microaerophilic conditions. However, culturing *Campylobacter hepaticus* is difficult because it is sensitive to a number of antimicrobial agents used in *Campylobacter* enrichment media and selective agar.

The emergence of new *Campylobacter* species requires a revision of phenotypic identification algorithms. MALDI TOF mass spectrometry databases need to be updated and specific primers developed to identify new *Campylobacter* species.

Significant variability of indicators of indication of one or another microflora from the liver and gallbladder indicates significant differences in the etiology of bacterial infections of birds.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1.Макавчик, С.А. Отбор перспективных лактобацилл, антагонистичных к *Campylobacter jejuni*/Макавчик С.А., Карпенко Л.Ю., Кузнецов Ю.Е., Никонов И.Н., Бахта А.А.//В сборнике: Материалы Международной научно-практической конференции "Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных". - 2019.- С. 191-201.
2.Макавчик, С.А. Лабораторные методы контроля полирезистентных возбудителей бактериальных болезней животных и рациональное применение антимикробных препаратов: монография/ Макавчик С.А., Сухинин А.А., Енгашев С.В., Кротова А.Л.- Санкт-Петербург: изд-во ВВМ, 2021.-С.152, ил.
3.Новикова, О.Б. Усовершенствование методов контроля эпидемиологически опасных и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных от птиц: дисс. ... канд. вет. наук.-Санкт-Петербург, 2004.-168 с

4.Сухинин, А.А. Возбудители кампилобактериоза птиц - этиологические факторы токсикоинфекции у людей /Сухинин А.А., Рождественская Т.Н., Панкратов С.В., Смирнова Л.И., Макавчик С.А.// Ветеринария и кормление. -2021. - № 3.- С. 52-54.

5.Cheng, Z. Rapid Detection of *Campylobacter jejuni* in Chicken Rinse Water by Melting-Peak Analysis of Amplicons in RealTime Polymerase Chain Reaction/ Cheng Z., Griffiths M.W. // J. Food Protection.- 2003.- Vol. 66, N 8.- P. 1343-1352.

6.Crawshaw, T. R .Spotty liver syndrome in poultry in Great Britain/ Crawshaw, T. R ., and R. Irvine. // Vet. Rec. – 2012 – 170 – P.317–318.

7.Crawshaw, T. R. Isolation of a novel thermophilic *Campylobacter* from cases of spotty liver disease in laying hens and experimental reproduction of infection and microscopic pathology/ Crawshaw, T. R., J. I. Chanter, S. C. L. Young, S. Cawthraw, A. M. Whatmore, M. S. Koylass, A. B. Vidal, F. J. Salguero, and R. M. Irvine.//Vet. Microbiol.- 2015- 179 - P.315–321.

8. Gregory, M. Isolation and Characterization of *Campylobacter hepaticus* from Layer Chickens with Spotty Liver Disease in the United States/ M. Gregory, B. Klein, O. Sahin, G. Girgis// Avian Dis – 2018 - 62 (1) - P. 79–85.https://doi.org/10.1637/11752-092017-Reg.1

9. Jennings, J. L. *Campylobacter jejuni* is associated with, but not sufficient to cause vibronic hepatitis in chickens/ Jennings, J., L. Sait, C. Perrett, C. Foster, L. Williams, T. Humphrey, and T. Cogan. //Vet. Microbiol.- 2011- 149 –P.193–199.

10.Makavchik, S. Selection of promising lactobacilli antagonistic to *Campylobacter jejuni* / Makavchik S., Karpenko L., Kuznetsov Yu., Nikonov I., Bakhta A. // International Journal of Engineering and Advanced Technology. -2019. -Т. 9.- № 1. - С. 3983-3986.

11. Porin, A.A. A new vision at the identification of thermotolerant *Campylobacters*/ Porin A.A., Matveeva Z.N.//Инфекция и иммунитет.- 2018.- Т. 8.- № 4. - P. 536.doi: 10.15789/2220-7619-2018-4-2.17