

Новый патоген *Acinetobacter radioresistens* – причина массового падежа бройлеров

Йылдырым Е.А., доктор биологических наук, биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории

Лаптев Г.Ю., доктор биологических наук, директор

Новикова Н.И., кандидат биологических наук, зам. директора

Тюрина Д.Г., кандидат экономических наук, зам. директора

Ильина Л.А., кандидат биологических наук, биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории

Дубровин А.В., биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории

Тарлавин Н.В., биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории

Филиппова В.А., биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории

ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург

Аннотация: В ООО «БИОТРОФ» обратились специалисты одной из птицефабрик для помощи в идентификации возбудителя вторичной бактериальной инфекции бройлеров, возникшей на фоне ослабления иммунитета вирусной этиологии. Заболевание достигло масштабов эпизоотии, приведя к массовому падежу птицы. При патологоанатомическом вскрытии павших цыплят на птицефабрике отмечали поражения печени, сердца, яйцеводов, которые были симптомами острой фазы заболевания, более поздними симптомами были аэросаккулиты. Причиной заболевания явилась вторичная бактериальная инфекция, протекающая по типу септицемии. Системная инфекция была связана с иммуносупрессивным состоянием. В молекулярно-биологической лаборатории компании был проведен анализ патологического материала от птиц и образцов кормов, а также кормовых добавок методом NGS-секвенирования; выявлен патоген, которым оказался *Acinetobacter radioresistens*. Приводится характеристика патогена и его распространенности, возможные пути заражения им птицы и птицепродуктов; предлагаются возможные стратегии борьбы с ним.

Ключевые слова: бройлеры, инфекционные бактериальные болезни птиц, молекулярно-генетические методы анализа, *Acinetobacter radioresistens*, антибиотикорезистентность.

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 на птицеводческих предприятиях целесообразно использование молекулярно-генетических методов идентификации возбудителей заболеваний.

В лаборатории НПК «БИОТРОФ» функционирует единственный в России Центр молекулярно-гене-

тических исследований микробиома сельскохозяйственных животных (рис. 1). Применяемый специалистами лаборатории метод NGS-секвенирования региона бактериальных генов 16S rPHK позволяет определить все 100% микроорганизмов в сообществе, включая некультивируемые формы.

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, приведя 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. Причиной заболевания явилась вторичная бактериальная инфекция, протекающая по типу септицемии. Системная инфекция была связана с иммуносупрессивным состоянием.

Как показал NGS-анализ полученного с фабрики патологического материала (7 образцов печени, сердца, яйцевода и тонкого кишечника), отобранного от боль-





Рисунок 1. Центр молекулярно-генетических исследований НПК «БИОТРОФ»

ных бройлеров, причиной внезапной гибели птиц явилось развитие на фоне вирусных инфекций вторичных осложнений, вызванных бурным преимущественным ростом микроорганизма *Acinetobacter radioresistens* (рис. 2). Инфекция привела к заболеванию, которое вызвало системные изменения в организме птицы.

На сегодняшний день метод NGS-секвенирования - единственный метод точной идентификации *Acinetobacter radioresistens* до вида. Другие современные системы идентификации, такие как масс-спектрометрия MALDI-TOF, не получили признания для типирования видов *Acinetobacter*.

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 их идентификации.

О биологии рода *Acinetobacter* известно, что это Грам-отрицательные аэробные немотильные бактерии, имеющие характерную коккобациллярную морфологию (рис. 3). Оптимальная температура роста обычно составляет 37°C.

Принято считать, что среди различных видов данного рода наиболее распространенный патоген - это *A. baumannii*, вызывающий широкий спектр инфекций, но изучается он, в основном, в связи с заболеваниями человека. Пневмония и бактериемия у лю-

дей с ослабленным иммунитетом являются наиболее распространенными проявлениями заражения *A. baumannii* в отделениях интенсивной терапии. Действительно, Американское общество инфекционных заболеваний (IDSA) классифицировало *A. baumannii* как один из шести бактериальных патогенов (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.), которые представляют непосредственную угрозу для здравоохранения США, поскольку они в совокупности вызывают большинство внутрибольничных инфекций и проявляют устойчивость ко многим доступным в настоящее время антибиотикам.

Однако к 2013 г. 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 г. применение секвенирования гена 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 данным штаммом, которые включали спастичность и ригидность конечностей (рис. 4А), оральное кровотечение (рис. 4Б) и отеки желчного пузыря (рис. 4В).

Коллективом ученых был описан также факт инфицирования цыплят-бройлеров другим видом ацинетобактерий - *A. iwoffii*, который вызывал респираторный дистресс, диарею и поражение конечностей, что приводило к гибели птиц. Исследователями был сделан вывод, что употребление недоваренного мяса от поражен-

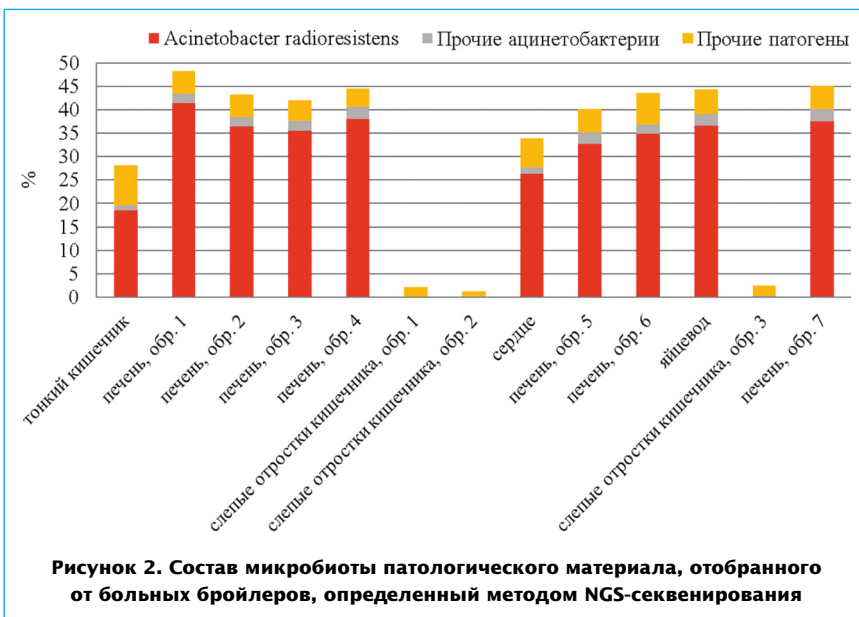


Рисунок 2. Состав микробиоты патологического материала, отобранного от больных бройлеров, определенный методом NGS-секвенирования



Рисунок 3. Бактерии рода *Acinetobacter* (сканирующая электронная микроскопия)

ной птицы может привести к заражению человека [2].

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 невозможна. Вероятность ошибочной идентификации *A. radioresistens* с помощью таких методов ставит вопрос об истинной эпидемиологии этого вида. Вполне возможно, что некоторые из ранее зарегистрированных инфекций сельскохозяйственных животных и птиц, которые, как считалось, были вызваны другими видами *Acinetobacter* или микроорганизмами из родственных таксонов, на самом деле были вызваны *A. radioresistens*.

На современном этапе применение NGS-секвенирования гена 16S рНК будет способствовать повышению точности идентификации и эпидемиологического надзора за этим патогеном.

Источники инфекции. 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 нор-

мофлоры. Тем не менее, результаты полногеномного секвенирования *A. radioresistens*, выделенного из кишечника бройлеров, показали, что в геноме данного вида присутствует значительное количество белков, связанных с вирулентностью [3].

Хорошо известно, что кишечные капилляры могут транспортировать бактерии и их токсины в печень через систему воротной вены, и что бактерии и эндотоксины являются нормальным компонентом крови в этой вене. В норме кишечные токсины и бактерии, попадающие в печень, выводятся клетками Купфера и ретикулоэндотелиальными клетками печени. Однако на фоне иммуносупрессии у птиц бактерии, в частности, *A. radioresistens*, и эндотоксины, содержащиеся в крови воротной вены, 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 пневмококкулит, токсикоз, перикардиты и др.

Мы предположили, что в нашем исследовании на фоне снижения иммунитета у птиц вследствие вирусной инфекции 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 птицефабри-

ке 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 оральным путем.

Дело в том, что производителем заявлен следующий состав пробиотика: *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus salivarius*. Реальный

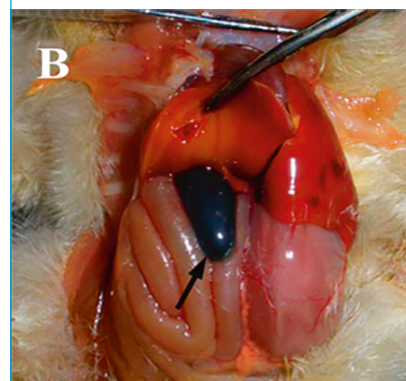
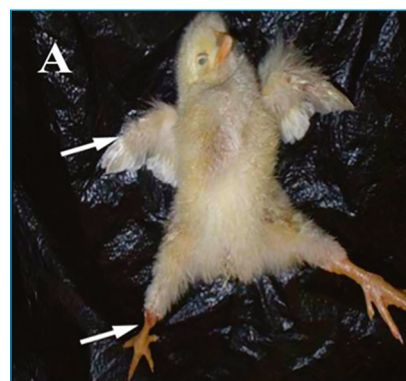


Рисунок 4. Патологоанатомическая картина поражений бройлеров *Acinetobacter baumannii*: А - спастичность и ригидность конечностей (белые стрелки), Б - оральное кровотечение (черная стрелка), В - отек желчного пузыря (черная стрелка)





же состав препарата практически не соответствовал заявленному (рис. 5). Более того, в составе пробиотика в значительном количестве (10,5% !) выявлялись патогенные бактерии того самого вида, который был связан с падежом птицы - *Acinetobacter radioresistens*.

Выпуск таких биопрепаратов – это лишь результат работы рынка и спроса со стороны потребителя. В чем же причина несоответствия пробиотика его спецификации и требованиям ветеринарной безопасности?

Дело в том, что в погоне за удовлетворением потребительского спроса практически никто из производителей пробиотиков не желает потратить время и понести колоссальные финансовые затраты, чтобы грамотно заниматься разработкой пробиотика с нуля до финального продукта - в таком случае это занимает порядка 20 лет. Такие пробиотики, возникшие ниоткуда, - это своего рода рулетка, 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. Дело в том,

что эксплуатация ферментеров, необходимых при производстве пробиотических бактерий, связана со многими факторами риска.

К первой группе таких факторов относятся риски, связанные с необходимостью защиты культивируемых микроорганизмов от заражения посторонней микрофлорой. Дело в том, что в производствах промышленного масштаба существует множество источников заражения культуры, в том числе нестерильные воздушные фильтры, контаминация при внесении посевной культуры, упаковка в загрязненную тару и др. Поскольку в ферментере находится богатая питательная среда, благоприятная для развития микроорганизмов различных физиологических групп, при несоблюдении хотя бы одного из пунктов технологии, а также использовании устаревшего оборудования контаминация и бурное размножение посторонней микрофлоры практически неизбежны. Ко второй группе относятся риски, связанные с управлением процессами ферментации. Так, например, есть микроорганизмы, которые относятся к категории труднокультивируемых даже в условиях лаборатории, не говоря уже о производстве. К третьей группе риска относятся бактериофаги - вирусы бактерий, которые поражают це-

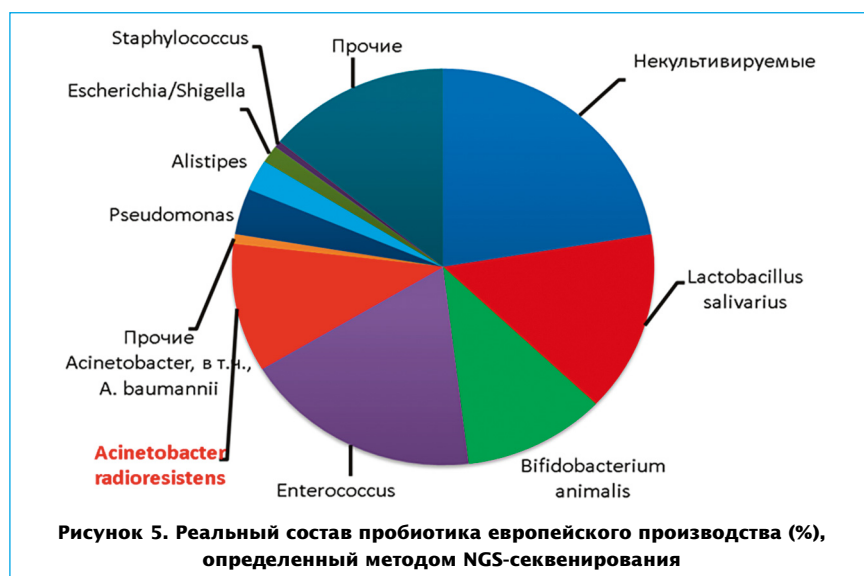
левую бактериальную культуру, в результате чего в ферментере «освобождается» место для нежелательной микрофлоры.

Качество препаратов обеспечивается не только соблюдением требований надлежащей производственной практики, но и системой контроля на этапах производства и проверки готовой продукции. На большинстве предприятий отсутствуют молекулярно-биологические лаборатории, способные точно оценить полный состав и количество микроорганизмов в препаратах.

Нужно также учитывать тот факт, что производство многих препаратов импортными компаниями 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, и т.д.; в отношении зарубежных производителей такой возможности нет.

Сложности тактики лечения. Многие штаммы ацинетобактерий обладают полисахаридной капсулой, которая, как правило, является показателем высокой вирулентности. Капсула состоит из полисахаридов и полипептидов, которые защищают клетки бактерий от фагоцитоза иммунной системой хозяина. Кроме того, она позволяет бактериям легко прикрепляться к поверхностям различных органов и тканей организма-хозяина и предохраняет клетки от обезвоживания. Поэтому ацинетобактерии часто устойчивы к высыханию и дезинфицирующим средствам, успешно сохраняются в окружающей среде в течение длительного времени.





Имеющиеся у ацинетобактерий пили представляет собой многофункциональную поверхностную структуру, которая способствует адгезии патогена к клеткам-хозяевам и другим поверхностям, участвует в инвазии клеток-мишеней, колонизации в процессе инфицирования, инициирует образование биопленок, участвует в переносе электронов, поглощении ДНК, а также рассматривается как внешний токсин.

С другой стороны, устойчивость бактерий к антибиотикам растет значительными темпами, вызывая тревогу как у медиков, так и у ветеринаров. Как оказалось, ацинетобактерии обладают высокой способностью приобретать широкий спектр генов устойчивости к антибиотикам. В частности, вид *A. baumannii* входит в список патогенов ВОЗ с критически высоким уровнем приоритетности для НИОКР в области создания новых антибиотиков.

При исследовании генома *A. radioresistens* [3] были идентифицированы несколько систем множественного лекарственного оттока и другие гены (хлорамфениколацетилтрансфераза, ферменты β -лактамазы, пути резистентности к фторхинолонам), имеющие отношение к устойчивости к противомикробным препаратам. Кроме того, были найдены гены белков, участвующих в резистентности к окислительному стрессу, углеродному голоданию, детоксикации радикальных форм кислорода, осмотической толерантности к стрессу, секреции и экспорту колицина V.

Известно, что ацинетобактерии сами являются продуцентами антибиотиков, что подразумевает их устойчивость к антимикробным препаратам. Например, *A. baumannii* - продуцент нозигептида, используемого в качестве кормового антибиотика [4]. Таким образом, включение в рецепт кормового антибиотика не

является действенной мерой в отношении этого патогена.

Все эти особенности указывают на то, что ацинетобактерии являются мультирезистентными к лекарственным препаратам, экологически устойчивыми и способными к множественным механизмам генетического обмена, что делает их идеальным резервуаром для распространения устойчивости к противомикробным препаратам.

Поэтому тактика лечения при инфицировании ацинетобактериями должна включать применение комбинаций антибиотиков. Схема лечения обычно включает два или три класса следующих антибиотиков: полимиксины, рифампицин, тигециклин, сульбактам, аминогликозиды или β -лактамы широкого спектра действия). Фосфомицин, ингибитор биосинтеза пептидогликана, хотя и не обладает активностью против ацинетобактерий, проявляет *in vitro* синергизм с колистином и сульбактамом для лечения устойчивых к карбапенемам ацинетобактерий. Антимикробный пептид ликозин-I проявляет выраженную антибактериальную активность *in vitro* в отношении мультирезистентных ацинетобактерий.

Особенности развития антибиотикорезистентности ацинетобактерий в России и подходы к лечению инфекций, вызванных этим патогеном, представлены в системе amrmap.ru. За последние 20 лет наблюдается рост относительного числа изолятов (из более чем 3,7 тысяч исследованных образцов), обладающих полирезистентностью, причем наблюдается тенденция к увеличению числа генетических маркеров, кодирующих устойчивость ацинетобактерий, а также рост минимальных подавляющих концентраций антибиотиков. Около половины изолятов резистентны к сульфониламидам, аминогликозидам, карбапенемам; более 90% изолятов устойчивы к ципроф-

локсацину. Исходя из представленных в системе данных, единственным антимикробным препаратом, активным в отношении ацинетобактерий, является колистин, и тот факт, что он используется и в ветеринарии и в медицине, внушает опасения: при его активном применении в птицеводстве вероятно распространение резистентности к этому препарату, после чего у врачей не окажется средств для лечения людей.

Ацинетобактерии в продукции птицеводства. В последние 10-15 лет в мировой медицине наметилась тенденция к увеличению в общей структуре кишечных инфекций и бактериальных отравлений удельного веса заболеваний, связанных с пищевым путем передачи инфекций.

Нарастающая озабоченность мировой общественности проблемой микробиологической безопасности продуктов питания обусловила появление концепции «эмерджентных пищевых инфекций». По определению ВОЗ, эмерджентные инфекции - это болезни (и возбудители), возникающие или появляющиеся внезапно и этим обуславливающие чрезвычайные эпидемиологические ситуации, как правило, очень напряженные.

Согласно исследованиям, ацинетобактерии относятся к возбудителям эмерджентных пищевых зоонозов, поскольку для них характерна широкая распространенность в природе, а также способность не только выживать, но и размножаться во внешней среде и пищевых продуктах. *Acinetobacter* sp. довольно толерантны к некоторым консервирующим факторам. Они могут расти при низких температурах и при низком уровне pH (до 3,3), способны выдерживать воздействие 0,7% перекиси водорода и 10 ч./млн. озона. Несмотря на строгую аэробность, виды рода *Acinetobacter* были выделены из говядины в вакуумной упаков-



ке после 6-недельного хранения при температуре 2°C. В промышленно обработанных продуктах птицеводства также были идентифицированы изоляты рода *Acinetobacter*: наиболее часто выделялись виды *A. radioresistens* и *A. baumannii* [5]. При хранении в холодильнике данной продукции наблюдалось значительное увеличение популяции бактерий.

Следует отметить высокую способность ацинетобактерий в короткие сроки превращаться в возбудителей острых пищевых инфекций с тяжелым течением и высоким процентом летальных исходов. Симптомы инфекции у людей могут появиться в период от 4 до 40 дней после инфицирования, но в среднем они возникают в течение 10-12 дней.

Вывод. На наш взгляд, специалистам птицеводческих предприятий необходимо принять во внимание новую информацию об опасности *Acinetobacter 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. Поскольку заражение птиц *A. radioresistens* явилось нежелательным эффектом введения в рацион птиц с ослабленным иммунитетом пробиотиков низкого качества, 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 страна производства не так важна.

Литература

1. Liu D, Liu Z.S., Hu P., Hui Q., Fu B.Q. [et al.] Characterization of a highly virulent and antimicrobial-resistant *Acinetobacter baumannii* strain isolated from diseased chicks in China // Microbiol. Immunol. - 2016. - V. 60, No 8. - P. 533-539.
2. Wani S.A., Samanta I., Bandey M.T., Bhat M.A. Isolation of *Acinetobacter iwoffii* from broiler chicken with septicemia in Kashmir valley // Indian J. Anim. Res. - 2006. - V. 40, No 1. - P. 61-63.

3. Crippen C., Huynh S., Miller W.G., Parker C., Szymanski C.M. Complete genome sequence of *Acinetobacter radioresistens* strain LH6, a multidrug-resistant bacteriophage-propagating strain // Microbiol. Resour. Announc. - 2018. - V. 7, No 5. - P. e00929-18.
4. Iwari V., Meena K., Tiwari M. Differential anti-microbial secondary metabolites in different ESKAPE pathogens explain their adaptation in the hospital setup // Infect. Genet. Evol. - 2018. - V. 66. - P. 57-65.
5. Betts G. Food Spoilage Microorganisms. Woodhead Publ., 2006. - P. 736.

Для контакта с авторами:

Йылдырым Елена Александровна

E-mail: deniz@biotrof.ru

Лаптев Георгий Юрьевич

E-mail: laptev@biotrof.ru

Новикова Наталья Ивановна

E-mail: novikova@biotrof.ru

Тюрина Дарья Георгиевна

E-mail: tiurina@biotrof.ru

Ильина Лариса Александровна

E-mail: ilina@biotrof.ru

Дубровин Андрей Валерьевич

E-mail: dubrovin@biotrof.ru

Тарлавин Николай

Владимирович

E-mail: tarlav1995@biotrof.ru

Филиппова Валентина

Анатольевна

E-mail: filippova@biotrof.ru

New Pathogen *Acinetobacter radioresistens* as a Cause of Massive Mortality in Broilers

Yildyrym E.A., Laptev G.Yu., Novikova N.I., Tiurina D.G., Ilyina L.A., Dubrovin A.V., Tarlav N.V., Filippova V.A.

BIOTROF Co., St. Petersburg

Summary: Veterinarians from a poultry farm contacted BIOTROF Co. for the assistance in the identification of causative agent of a secondary bacterial infection in broilers resulted from the immunosuppression induced earlier by viral infectious bronchitis. The infection has become epizootic and led to massive mortality in broilers. On-farm postmortem examinations have revealed lesions in the liver, heart, oviduct as the symptoms of the acute phase and subsequent aerosacculitis. The farm's veterinarians interpreted it as a secondary bacterial infection with unknown etiology which evolved to the systemic septicemia in the immunosuppressed birds. The pathological material from the dead birds and samples of feeds and feed additives were analyzed in the company's laboratory using NGS (New Generation Sequencing) of microbial 16S rRNA genes; the pathogen was identified as *Acinetobacter radioresistens*. The characteristics and occurrence of the pathogen and its possible sources are discussed; the therapeutic strategies for this multidrug-resistant species are proposed.

Keywords: broilers, infectious bacterial diseases of poultry, molecular genetic methods of analysis, *Acinetobacter radioresistens*, resistance to antibiotics.