

## РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЭНТЕРОКОККОЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ

Д.Д. СМИРНОВ, А.В. КАПУСТИН, П.Н. ШАСТИН, М.И. ГУЛЮКИН,  
А.И. ЛАИШЕВЦЕВ

Энтерококкоз птиц — заболевание, которое проявляется поражением органов опорно-двигательной системы и сопровождается хромотой, атаксией, спондилитом, некрозом головки бедренной кости, бактериальным хондронекрозом. Его превалирующий возбудитель на территории Российской Федерации — бактерия *Enterococcus cecorum* (EC). Заболевание может возникать среди ремонтного молодняка (преимущественно петушков) в возрасте 1-7 нед, товарных бройлеров в возрасте 3-5 нед и у родительского поголовья в период пика продуктивности. В настоящей работе на основании результатов изучения патогенных, антигенных и иммуногенных свойств культур *Enterococcus cecorum* впервые разработана и апробирована отечественная вакцина против энтерококкоза. В условиях промышленного птицеводческого предприятия было доказано, что разработанное средство безвредно для птицы различных возрастных групп и обладает необходимой протективной эффективностью. Цель исследования — разработка средства специфической профилактики энтерококкоза сельскохозяйственной птицы и оценка эффективности полученного препарата. При изучении эпизоотической обстановки по энтерококкозу птицы в 2017-2018 годах на территории Российской Федерации было установлено неблагополучие на 11 птицеводческих предприятиях в Белгородской, Владимирской, Ярославской, Калужской, Челябинской, Тверской и Пензенской областях, а также в Республиках Мари-Эл и Удмуртия. Всего исследовали 647 проб паренхиматозных органов и тканей, полученных от птицы кросса Cobb 500 с типичным клинико-морфологическим проявлением энтерококкоза. Штаммы *E. cecorum* №№ 414, 425, 426, 837, 838, 839, 1096, 1481, 1517, 1647, 1865 выделили при комплексной бактериологической диагностике секционного материала. Установлено, что 72,73 % энтерококков были резистентны к ампициллину и пенициллину, 45,45 % — к ванкомицину, 27,27 % — к левофлоксацину, линезолиду, тетрациклину, 18,18 % — к норфлоксацину, рифампицину, хлорамфениколу и ципрофлоксацину, 9,09 % — к доксициклину. Наибольшее число культур оказались чувствительны к гентамицину и левофлоксацину (72,73 %), а также к доксициклину, линезолиду, рифампицину и хлорамфениколу (54,55 %). Все изученные штаммы вызывали гибель 100 % лабораторных белых мышей в течение 24-96 ч после внутрибрюшинного инфицирования. LD<sub>50</sub> культур энтерококков составляла  $1,7 \times 10^7$ - $9,4 \times 10^8$  мкр кл. При определении антигенных свойств культур в реакции агглютинации было установлено, что они гомологичны друг к другу, то есть относятся к одному серотипу. Определение количества антител у белых мышей, 2-кратно иммунизированных вакцинами из штаммов № 414 и № 1517, показало, что они обладают наибольшей антигенностью, индуцируя иммунитет (титр специфических антител  $1:26,66 \pm 9,23$ ), в то время как антигенность других штаммов была ниже (титр антител  $1:21,33 \pm 9,23$  и менее). На основании этого результата штаммы № 414 и № 1517 в последующем использовались как контрольно-производственные. Оценка иммуногенной активности экспериментального препарата на белых мышах показала, что вакцинация обеспечивала сохранность 90 % инфицированных животных, тогда как смертность в контроле составила 100 %. Для обеспечения высокой эффективности разрабатываемого средства необходимо введение 1,5 млрд мкр кл. EC, при этом оптимальный объем однократной дозы равен 0,2 см<sup>3</sup>. В качестве инактиванта при получении вакцинного препарата использовался формалин (0,3 %), в качестве адьюванта — полиэтиленгликоль 6000 (ПЭГ-6000) из расчета 10 % от объема. Разбавителем служил фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), значение pH вакцины регулировали с помощью 20 % раствора едкого натра до 7,2. Вакцина вызывала формирование иммунитета через 12-14 сут после 2-кратного внутримышечного введения, который сохранялся не менее 4 мес. При проведении клинических испытаний на курах кросса Cobb 500 была установлена безвредность и высокая специфическая эффективность вакцины для птицы. Двукратная вакцинация ремонтного молодняка обеспечивала повышение однородности стада на 4,6 % и снижение общего отхода на 0,13 %. Анализ производственных показателей вакцинированных кур-несушек показал снижение общего отхода на 1,81 % и повышение яичной продуктивности на 1,7 %. После первой вакцинации родительского поголовья титр антител у птицы составил в среднем  $1:5,60 \pm 2,00$  ( $n = 25$ ), а через 14 сут после второй вакцинации он увеличивался до  $1:43,52 \pm 15,67$ , что превышало значение защитного титра антител ( $1:26,66 \pm 9,23$ ). Полученные результаты позволяют обсуждать возможность практического использования разрабатываемого средства на основе штаммов *Enterococcus cecorum*.

Ключевые слова: *Enterococcus cecorum*, остеомиелиты, некроз головки бедренной кости,

энтерококкозы, клинические признаки, профилактические мероприятия, вакцина, болезни кур.

*Enterococcus cecorum* (ЕС) — превалирующий возбудитель энтерококкоза птиц на территории Российской Федерации. Заболевание, которое он вызывает, проявляется поражением органов опорно-двигательной системы. Возбудитель широко распространен не только в России, но и во многих европейских странах (1-3). Длительное время ЕС рассматривался как комменсал, но такая оценка его патогенетического потенциала оказалась неверной. Первые сигналы о роли ЕС в развитии инфекционных патологий были представлены медицинскими микробиологами, которые выделили его из патологического материала от людей при инфекционных патологиях респираторных органов, ротовой полости, желче- и мочевыводящих путей, влагалища (4, 5). Помимо этого, были зарегистрированы многочисленные случаи энтеритов, перитонитов, септицемии, локальных и массовых абсцессов, вызванных ЕС (6). Эпидемиологи отмечали увеличение числа случаев инфекций системы кровообращения, в том числе у детей, спровоцированных полирезистентными изолятами возбудителя (7). Так было доказано, что *E. cecorum* играет важную роль в развитии различных инфекционных патологий у людей (8, 9).

Ветеринарные специалисты также длительное время считали ЕС бактериальным агентом, не имеющим этиологического значения, но сейчас установлена его роль в возникновении инфекционной патологии у птицы (10). Возбудитель встречается в составе естественной микрофлоры желудочно-кишечного тракта цыплят, преимущественно в слепой кишке (11). Помимо кур, ЕС обнаруживают при патологиях желудочно-кишечного тракта у многих видов птиц и млекопитающих — индеек, уток, свиней, телят, лошадей, кошек, собак (12-15).

Причины роста заболеваемости энтерококкозом в мясном птицеводстве в настоящее время окончательно не ясны, но можно выделять несколько основных группы предрасполагающих факторов. К первой группе следует отнести снижение общего иммунного статуса и естественной резистентности организма вследствие воздействия первичных инфекций, дисбиоз кишечника, связанный с нарушением или сменой рациона, а также с применением антибиотиков, и другие изменения в организме животного. Ко второй группе факторов относятся перемены во внешней среде, в частности влияющие на зооигиенические параметры (16, 17). Некоторые специалисты отмечают, что увеличение числа случаев энтерококкоза в мире стоит ассоциировать с уменьшением объемов использования антибиотиков (например, запрет с января 2014 года в Европе на применение линкомицина и спектиномицина в первые дни жизни птицы) в качестве превентивной терапии патологий конечностей, вызванных ЕС (18).

В патогенезе инфекции следует отметить особое значение технологических факторов, провоцирующих ЕС. К ним относятся закладка на инкубацию загрязненного яйца; несоблюдение режимов санации и дезинфекции инкубационного яйца и производственных корпусов; заражение цыплят в инкубаторе; выращивание в одних корпусах цыплят, вылупившихся из грязного и чистого инкубационного яйца; несоблюдение дозировок антибиотиков ремонтному молодняку и бройлерам при посадке; недостаточный лабораторный контроль качества санации птичников по кокковой инфекции.

При благоприятных условиях и влиянии предрасполагающих факторов ЕС может перемещаться из пищеварительной системы в различные органы и ткани восприимчивого организма, приводя к сепсису, остеоартриту, остеомиелиту (19, 20). Заболевание возникает среди ремонтного мо-

лодняка (преимущественно петушков) в возрасте 1–7 нед, товарного бройлера в возрасте 3–5 нед и родительского поголовья в период пика продуктивности. Оно сопровождается типичными локомоторными поражениями — хромотой и атаксией (21). Вирулентные изоляты ЕС могут приводить к развитию серьезного заболевания — спондилиту, который возникает при локализации возбудителя в грудном отделе позвоночника, вследствие чего вначале развивается хромота и парез конечностей, а затем некроз головки бедренной кости и бактериальный хондронекроз. Смертность при этом достигает 5–15 % (22).

При патологоанатомическом исследовании птицы, инфицированной ЕС, выявляют дегенеративные изменения в подвижном сегменте позвоночника грудного отдела (3). В результате механического воздействия на брюшной поверхности грудных позвонков образуется микротравма с последующим воспалением и кровоизлиянием. Скапливающийся экссудат твердеет, деформируя и сжимая спинной мозг (23).

Борьба с энтерококкозом птицы с помощью антибиотикотерапии бывает неэффективна ввиду распространения антибиотикорезистентности, а также особенностей биодоступности антибактериальных препаратов и высокого тропизма возбудителя. Кроме того, в промышленном птицеводстве антибиотики не всегда можно использовать, поскольку они попадают в производимую продукцию (23).

В настоящей работе на основании результатов изучения патогенных, антигенных и иммуногенных свойств культур *Enterococcus cecorum* впервые разработана и апробирована отечественная вакцина против энтерококкоза. В условиях промышленного птицеводческого предприятия доказано, что разработанное средство безвредно для птицы различных возрастных групп и обладает необходимой протективной эффективностью.

Цель работы — разработка и оценка эффективности средства специфической профилактики энтерококкоза сельскохозяйственной птицы.

*Методика.* Эпизоотическую ситуацию по энтерококкозу птицы оценивали при обследовании птицеводческих хозяйств в ряде регионов России (Белгородская, Владимирская, Ярославская, Калужская, Челябинская, Тверская, Пензенская области, Республика Мари-Эл, Республика Удмуртия; 2017–2018 годы). Всего исследовали 647 проб материала, поступивших из 11 птицеводческих предприятий: легкие — 92, сердце — 102, селезенка — 43, печень — 159, кишечник — 57, пораженные бедренные суставы — 118, участок пораженного позвоночника — 76 образцов. Образцы паренхиматозных органов и тканей были получены от птицы кросса Cobb 500 различных возрастных и физиологических групп (бройлеры, ремонтное и родительское поголовье, петушки и курочки) с типичными для энтерококкоза клинико-морфологическими проявлениями инфекции.

Макроскопическое исследование органов и тканей птицы, а также лабораторных животных проводили в соответствии с общепринятыми рекомендациями (24). Вскрытие трупов, павших и вынужденно убитых животных осуществляли с полной эвисцерацией.

Лабораторно-диагностические исследования секционного материала с целью выделения штаммов *E. cecorum* осуществляли рутинными бактериологическими методами. Для первичного выделения микроорганизмов были использованы модифицированный эскулиновый агар, бульон с бромкрезоловым пурпурным, триптон-соевый бульон («HiMedia Laboratories Pvt Ltd», Индия) и колумбийский агар («Oxoid Ltd», Великобритания). Дефибрированную кровь, необходимую для приготовления питательных сред, получали от барана-донора согласно ГОСТ 31746–2012 (25).

Для видовой идентификации бактерий применяли метод времяпролетной масс-спектрометрии MALDI-ToF с использованием оборудования Maldi Biotyper («Bruker Daltonics, Inc.», США) согласно МР 4.2.0089-14 (26). Чувствительность культур микроорганизмов к различным антибиотикам определяли в соответствии с МУК 4.2.1890-04 (27).

Доклинические исследования препарата проводили на опытной базе Вышневолоцкого филиала ФГБНУ ФНЦ Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН (остров Лисий, Тверская обл.).

Патогенность изолятов энтерококков определяли на беспородных белых мышах массой 16-18 г (без деления по полу) ( $n = 3$  на каждый штамм), которым внутривентрально вводили 1-суточную культуру в объеме  $0,5 \text{ см}^3$ , содержащую 1,5 млрд микробных клеток (мкр кл.) ЕС. Вирулентность культур оценивали посредством внутривентрального инфицирования групп белых мышей ( $n = 5$  в каждой группе) 10-кратными разведениями бактериальной суспензии каждого штамма ( $1,5 \times 10^9$ ,  $1,5 \times 10^8$ ,  $1,5 \times 10^7$  и  $1,5 \times 10^6$  кл.) в объеме  $0,5 \text{ см}^3$ . Срок наблюдения за белыми мышами составлял 10 сут или до момента гибели. Для подтверждения причин гибели животных после вскрытия отбирали органы для бактериологического исследования (триада Коха). Культуру признавали патогенной в случае гибели всех особей в инфицированной группе с последующим выделением инфицирующей культуры.

В соответствии с этапами исследования (идентификация и серотипирование полевых изолятов ЕС с оценкой антигенных и иммуногенных свойств штаммов; отработка иммунизирующей дозы вакцины и адьюванта, доклинические испытания; клинические испытания в производственных условиях) на основе получаемых данных последовательно разрабатывали по несколько серий вакцины в вариантах, различающихся по концентрации бактериальных клеток и адьюванта. Для этих целей бактериальную массу ЕС накапливали методом глубинного культивирования в ферментере BIOSTAT-A («Sartorius AG», Германия) на триптон-соевом бульоне при  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  и рН 7,2-7,8 в течение 16-18 ч. В процессе культивирования регулировали рН питательной среды добавлением 20 % раствора щелочи; расход глюкозы восполняли внесением 40 % раствора глюкозы. Бактериальные антигены инактивировали добавлением формалина (0,3 % от объема бульонной культуры), продолжительность инактивации составляла 3 сут при  $21 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Бактериальную массу концентрировали центрифугированием на установке MPW-380R («MPW Med. Instruments», Польша) в течение 1 ч при 3 тыс. об/мин и относительном центробежном ускорении (relative centrifugal field, RCF) 1861. При составлении серий препарата использовали следующие адьюванты: гидроксид алюминия (ГОА, ФКП «Армавирская биофабрика», Россия) — 15 %, полиэтиленгликоль (ПЭГ-6000, ООО «Норкем», Россия) — 10 %, Асгупол®971Р («Corel Pharma Chem», Индия) — 10 %; консервант — мертиолят натрия (из расчета 1:10000 v/v); концентрацию водородных ионов регулировали с использованием раствора щелочи до значения 7,2-7,6.

Полноту инактивации культур ЕС определяли по отсутствию жизнеспособных клеток в концентрате, используемом в качестве антигена, и скомпонованном препарате, а также по безвредности инактивированной бактериальной массы в биопробе на белых мышах ( $n = 5$  для каждого антигена) при подкожном введении в дозе, 2-кратно превышающей рекомендованную. Стерильность вакцин контролировали в соответствии с ГОСТ 28085-2013 (28).

Серотипизацию штаммов энтерококков, а также определение количества антител к возбудителю у вакцинированных животных и птиц проводили в развернутой пробирочной реакции агглютинации (РА). Для этого на основе каждой культуры энтерококка изготовили моновакцины (с ГОА в качестве адьюванта) с концентрацией 3 млрд мкр кл/см<sup>3</sup>. Полученными моновакцинами иммунизировали кроликов породы Советская шиншилла массой 2,5-3 кг ( $n = 3$  на каждый вариант вакцины). Препараты вводили 2-кратно внутримышечно в дозе 0,5 см<sup>3</sup> с интервалом 14 сут. Перед каждой вакцинацией, а также через 14 сут после повторного введения вакцины от животных получали сыворотку крови для исследования в РА.

При серотипизации энтерококков каждый штамм исследовали в РА с каждой сывороткой, полученной от ранее вакцинированных кроликов. Контроли — испытуемая культура, смешанная с каплей физиологического раствора (рН 7,2) и с каплей нормальной кроличьей сыворотки, разведенной 1:10 для исключения самоагглютинации культуры. Положительная реакция характеризовалась склеиванием микробных клеток в зерна или хлопья различной величины и полным или частичным просветлением жидкости при отсутствии агглютинации в контроле.

Иммуногенную активность вакцины оценивали на двух группах белых мышей массой 16-18 г по 10 гол. в каждой. Животных размещали в поликарбонатных клетках-изоляторах по 10 особей. Все клетки были накрыты стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением и местом для поилки. В виварии поддерживались стандартные условия микроклимата: относительная влажность воздуха — 30-70 %, температура — 22-24 °С, освещенность — 110 лк на расстоянии 1 м от пола. Животных кормили гранулированным экструдированным комбикормом для грызунов, соответствующим ГОСТ Р 50258-92 (29). Вода для поения соответствовала СанПиН 2.1.4.1074-01 (30). Корм и воду давали *ad libitum*. В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки. Перед проведением опыта мышей содержали в карантине в течение 14 сут в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 (31). Опытную группу вакцинировали 2-кратно (с интервалом 14 сут) введением 0,5 см<sup>3</sup> монопрепарата из штамма ЕС № 414, для которого в РА с сыворотками кроликов была подтверждена выработка антител в максимальном титре. Контрольную группу мышей не вакцинировали. Через 14 сут после повторного введения мышам обеих групп заражали патогенным штаммом ЕС № 1517 в дозе 5 LD<sub>50</sub> в объеме 0,5 см<sup>3</sup>. Период наблюдения за животными составлял 14 сут. Вакцина признавалась иммуногенной, если сохранность животных опытной группы после заражения составляла не менее 80 % при смертности в контроле 80-100 %.

Иммунизирующую дозу и адьювант подбирали в опытах на цыплятах кросса Cobb 500. Птицу содержали в клетках по 5 гол. Условия микроклимата в виварии были следующими: относительная влажность воздуха — 30-70 %, температура — 27-28 °С, освещенность — 70 лк на расстоянии 1 м от пола. Использовали комбикорм ПК-5 (Россия) согласно ГОСТ 18221-2018 (32), вода для поения соответствовала СанПиН 2.1.4.1074-01 (30). Корм и воду давали *ad libitum*. Были сформированы девять групп 10-суточных цыплят (по 5 гол. в каждой). Птицу вакцинировали монопрепаратами, содержащими разное количество антигена — 1,0×10<sup>9</sup>, 1,5×10<sup>9</sup> и 2,0×10<sup>9</sup> мкр кл., адсорбированных на трех адьювантах — ГОА, ПЭГ-6000, Асгупол®971Р. Варианты составления серий вакцин были следующими: 1 — 1,0×10<sup>9</sup> мкр кл. + ГОА; 2 — 1,5×10<sup>9</sup> мкр кл. + ГОА; 3 — 2,0×10<sup>9</sup> мкр кл. + ГОА; 4 — 1,0×10<sup>9</sup> мкр кл. + ПЭГ-6000; 5 — 1,5×10<sup>9</sup> мкр кл. + ПЭГ-6000; 6 — 2,0×10<sup>9</sup> мкр кл. + ПЭГ-6000; 7 — 1,0×10<sup>9</sup> мкр кл. + Асгупол®971Р.

pol®971P; 8 —  $1,5 \times 10^9$  мкр кл. + Асгупол®971P; 9 —  $2,0 \times 10^9$  мкр кл. + Асгупол®971P. Для удобства использования препарата объем однократной дозы для птицы составлял 0,2 см<sup>3</sup>. Критерием оценки результатов была выраженность местных и системных побочных реакций у птицы, а также титр образовавшихся антител.

Клинические испытания препарата проводили на птицеводческом предприятии ООО «Ровеньский бройлер» (Белгородской обл., Ровеньский р-н) в 2018 году. Племенных цыплят кросса Cobb 500 вакцинировали в возрасте 12 и 26 сут (опыт — 7019 гол., контроль — 7020 гол.), племенной ремонтный молодняк — в возрасте 121 и 135 сут (опыт — 9030 гол., контроль — 8821 гол.). Опытные и контрольные группы птицы формировали по принципу аналогов. Препарат вводили в область грудных мышц. Цыплят и молодняк содержали напольным способом на опилках. Цыплят выращивали при температуре 26,7 °С и влажности 60 %, ремонтный молодняк — при 20 °С и 50-60 %. Освещенность для цыплят составляла 80-100 лк в брудерной зоне и 10-20 лк в птичнике, для ремонтного молодняка — 10-20 лк. Продолжительность светового дня для всех групп и возрастов равнялась 8 ч. Кормление осуществляли гранулированным комбикормом ПК-3 с фронтом кормления для цыплят 5 см/гол., для ремонтного молодняка — 15 см/гол. Поение проводили ad libitum с использованием nippleных поилок при фронте поения 8-12 гол/ниппель. Плотность посадки петушков составляла 3-4 гол/м<sup>2</sup>, курочек — 4-7 гол/м<sup>2</sup>. Испытания соответствовали требованиям Федерального закона «Об обращении лекарственных средств» № Ф3-61 и включали оценку качества препарата после первого и второго введения в рекомендованной дозе. Критерии оценки были следующими: отсутствие побочных эффектов, снижение падежа и вынужденной выбраковки, процент общего отхода, однородность и яичная продуктивность поголовья. Длительность наблюдения за вакцинированной птицей составляла 28 сут (14 сут после первой вакцинации и 14 сут — после второй), в течение которых проводился их клинический осмотр, в том числе осмотр места инъекции, термометрия, а также патологоанатомическое вскрытие в конце периода наблюдения с целью фиксации возможных изменений в месте инъекции препарата. Эффективность применения препарата на цыплятах оценивали по производственным показателям при переводе ремонтного молодняка в родительское поголовье на 140-е сут жизни. С целью обеспечения сохранности и минимизации выбраковки цыплят контрольной группы использовали антибактериальные препараты на основе амоксициллина и тетрациклина; в опытной группе птицы антибактериальные препараты против инфекций опорно-двигательной системы в течение всего выращивания не применяли. Эффективность вакцинации ремонтного молодняка оценивали на период достижения пика яйценоскости — на 239-е сут жизни.

Для анализа антигенной активности вакцины в промышленных условиях получали сыворотку крови от птицы ремонтного поголовья (25 гол.) перед первой вакцинацией, перед второй вакцинацией и спустя 14 сут после второй вакцинации. В сыворотках определяли титры антител к ЕС в развернутой РА.

Статистическую обработку результатов осуществляли в программах BioStat 2009 («AnalystSoft, Inc.», США) и Microsoft Excel. Определяли вирулентность бактериальных культур LD<sub>50</sub> посредством пробит-анализа, рассчитывали средние арифметические (*M*) и стандартные ошибки средних ( $\pm$ SEM). Для оценки статистической значимости различий использовали *t*-критерий соответствия Стьюдента при  $p = 0,05$ .

**Результаты.** При изучении эпизоотической ситуации по энтерококкозу птиц было установлено, что инфекция распространена в Белгородской, Владимирской, Ярославской, Калужской, Челябинской, Тверской и Пензенской областях, а также в Республиках Мари-Эл и Удмуртия. Изоляты *Enterococcus cecorum* выявляли с разной инцидентностью во всех паренхиматозных органах и тканях от птицы, содержащейся на 11 птицеводческих предприятиях в этих регионах. Так, у особей с клинико-морфологическими признаками инфекции ЕС был выделен из легких в 4,34 %, из сердца — в 24,51 %, селезенки — 27,9 %, печени — 44,65 %, кишечника — 15,79 %, суставов — 81,36 %, позвоночника — 76,31 % случаев.

Анализ полученных эпизоотических данных позволяет говорить о широком распространении энтерококкоза у сельскохозяйственной птицы на территории ряда регионов Российской Федерации, на основании чего инфекцию можно отнести к эпизоотии. Вероятно, это объясняется тем, что прародительское и родительское поголовье птицы в России поставляла одна группа предприятий, а основной путь распространения заболевания — вертикальный. Стоит отметить, что изоляты ЕС выделяли от цыплят и кур разных кроссов, но типичное клинико-морфологическое проявление инфекции фиксировалось исключительно у птицы кросса Cobb 500.

В результате лабораторно-диагностических исследований было получено 11 штаммов ЕС: № 414, 425, 426 (Белгородская обл.), № 837 (Владимирская обл.), № 838 (Ярославская обл.), № 839 (Калужская обл.), № 1096 (Челябинская обл.), № 1481 (Республика Мари-Эл), № 1517 (Тверская обл.), № 1647 (Республика Удмуртия), № 1865 (Пензенская обл.). Все изоляты энтерококков имели типичные для вида морфологические, тинкториальные, культуральные и биохимические свойства.

С точки зрения производственной практики единственный способ борьбы с инфекцией в настоящее время — антибактериальная терапия. Для прогнозирования эффективности антибиотиков при лечении птицы с клинико-морфологическими проявлениями инфекции ЕС мы определили чувствительность эпизоотических культур ЕС к различным антимикробным препаратам (табл. 1).

### 1. Чувствительность штаммов *Enterococcus cecorum*, выделенных из материала, поступившего из птицеводческих предприятий девяти регионов Российской Федерации, к различным антимикробным препаратам

Антибиотик, концентрация	Стандарт, мм			Зоны задержки роста штаммов, мм											
	S	I	R	414	425	426	837	838	839	1096	1481	1517	1647	1865	
Ампициллин, 10 мкг	≥17	–	≤16	13	17	14	11	19	15	14	9	18	16	13	
Ванкомицин, 30 мкг	≥17	15-16	≤14	16	14	17	22	13	11	14	19	15	12	24	
Гентамицин, 120 мкг	≥10	7-9	≤6	12	15	8	14	16	9	18	11	8	15	12	
Доксициклин, 30 мкг	≥16	13-15	≤12	17	14	20	18	14	11	18	15	13	19	22	
Левофлоксацин, 5 мкг	≥17	14-16	≤3	19	22	17	18	13	18	11	24	19	13	18	
Линезолид, 30 мкг	≥23	21-22	≤20	26	28	23	26	18	22	17	27	19	26	22	
Норфлоксацин, 10 мкг	≥17	13-16	≤12	16	9	17	14	15	18	13	21	16	10	19	
Пенициллин, 10 ед.	≥15	–	≤14	13	8	11	15	17	14	9	18	13	8	10	
Рифампицин, 5 мкг	≥20	17-19	≤16	15	18	22	17	20	13	24	23	19	24	28	
Тетрациклин, 30 мкг	≥19	15-18	≤14	13	24	25	17	20	14	15	28	13	19	17	
Фосфомицин, 200 мкг	≥16	13-15	≤12	19	22	18	14	20	16	18	18	24	20	19	
Хлорамфеникол, 30 мкг	≥18	13-17	≤12	14	21	19	18	15	8	15	21	11	18	20	
Ципрофлоксацин, 5 мкг	≥21	16-20	≤15	18	27	14	19	25	23	18	20	15	19	17	
Эритромицин, 15 мкг	≥23	14-22	≤3	17	14	20	26	18	14	22	29	25	21	14	

Примечание. S — чувствительная группа, I — промежуточное положение по чувствительности к антибиотику, R — устойчивая группа, «-» — не нормируется.

Все штаммы ЕС имели разный антибактериальный профиль. Большинство выделенных энтерококков (72,73 %) оказались резистентными к

ампициллину и пенициллину, к ванкомицину были устойчивы 45,45 % изолятов, к левофлоксацину, линезолиду, тетрациклину — 27,27 %, к норфлоксацину, рифампицину, хлорамфениколу и ципрофлоксацину — 18,18 %, а доксициклину — 9,09 %. Гентамицин и левофлоксацин показали эффективность в отношении 72,73 % изолятов энтерококков, доксициклин, линезолид, рифампицин, хлорамфеникол — 54,55 %, тетрациклин — 45,45 %, ванкомицин и норфлоксацин — 36,36 %, ампициллин, пенициллин, ципрофлоксацин, эритромицин — 27,27 % изолятов. Доля штаммов ЕС, чувствительных к фосфомицину, составила 90,91 %.

Несмотря на то, что к некоторым антибиотикам в лабораторных условиях чувствительность культур ЕС была высокой или средней, терапевтическая эффективность в условиях птицеводческих предприятий могла быть существенно ниже. В первую очередь это связано с высоким тропизмом возбудителя, который способен проникать в суставы и позвоночный канал, а также с особенностями биодоступности самих антибиотиков, которые не всегда достигают очага инфекции.

Оценка патогенности энтерококков показала, что все изученные штаммы вызывали гибель 100 % лабораторных мышей в течение 24-96 ч после внутрибрюшинного инфицирования. Культуры ЕС выделялись из печени и селезенки, а также из крови, полученной непосредственно из сердца погибших животных. Определение вирулентности исследуемых культур дало следующие результаты: LD<sub>50</sub> ЕС № 414 —  $8,1 \times 10^7$ , № 425 —  $1,1 \times 10^8$ , № 426 —  $7,8 \times 10^7$ , № 837 —  $2,9 \times 10^7$ , № 838 —  $2,6 \times 10^8$ , № 839 —  $1,8 \times 10^8$ , № 1096 —  $8,0 \times 10^7$ , № 1481 —  $2,1 \times 10^8$ , № 1517 —  $1,7 \times 10^7$ , № 1647 —  $2,3 \times 10^8$ , № 1865 —  $9,4 \times 10^8$  мкр кл. Патогенность исследуемых изолятов ЕС для лабораторных животных объясняет массовую заболеваемость у птицы на предприятиях, где были взяты образцы. При лабораторной диагностике следует учитывать, что в сельскохозяйственной отрасли также широко распространены комменсальные изоляты ЕС (выделенные от свиней, телят, гусей, уток, индеек, цыплят), не участвующие в развитии каких-либо заболеваний (33). Поэтому биопроба — важный этап при подтверждении окончательного диагноза.

При определении серологических характеристик возбудителя в РА культуры ЕС демонстрировали высокую антигенную активность (от «++» до «++++») со всеми сыворотками, следовательно, все штаммы относились к одному серотипу. Зафиксировать циркуляцию на территории РФ иных серотипов ЕС в рамках проведенной работы не удалось, несмотря на то, что известны как минимум два серотипа *E. cecorum* (33). Выделение второго серотипа ЕС возможно при расширении зоны проведения эпизоотического мониторинга.

Полученные результаты позволяют использовать при конструировании разрабатываемого средства один штамм *E. cecorum*, поскольку при идентичных антигенных свойствах изолятов возбудителей, циркулирующих на территории страны, вакцина будет индуцировать выраженный перекрестный иммунитет.

При определении антигенной активности выделенных штаммов энтерококков посредством предварительной вакцинации кроликов и исследования сыворотки крови было установлено, что после 2-кратной вакцинации титр антител у кроликов находился в пределах 1:8-1:32, с агглютинацией «+++» и более. Наибольшее среднее количество антител зафиксировали у кроликов, вакцинированных препаратами из штаммов № 414 и № 1517 — титры  $1:26,66 \pm 9,23$ ; вакцинация препаратами из культур № 426, № 1096 и № 1865 позволила получить среднее значение титра антител



1:21,33±9,23; из штаммов № 425, № 838, № 839 и № 1647 — 1:13,33±4,61; из штаммов № 837 и № 1481 — 1:10,66±4,61.

Статистически достоверной разницы между титрами антител у кроликов после вакцинации различными вариантами препаратов зафиксировать не удалось. Это можно объяснить тем, что все используемые культуры ЕС обладали схожей антигенностью. Также нельзя исключить вариант, что при увеличении выборки животных или при проведении идентичного исследования на естественно восприимчивой птице статистическая достоверность будет значимой.

Поскольку наибольший титр антител отмечали при вакцинации препаратами на основе штаммов ЕС № 414 и № 1517, в дальнейшем эксперименты проводили именно с этими культурами. Штамм № 414 использовался в качестве производственного, поскольку обладал более стабильными ростовыми свойствами, а штамм № 1517 служил контролем для определения иммуногенной активности разработанного средства. При культивировании ЕС № 414 удавалось достичь концентрации бактериальной массы на 2-3 млрд мкр кл/см<sup>3</sup> больше, чем в случае других штаммов при идентичных условиях. Кроме того, у этого штамма (в отличие от ЕС № 837, № 1096 и № 1865) не происходило спонтанного формирования плотного осадка при культивировании. В эксперименте на белых мышах было установлено, что выживаемость животных в опытной группе после заражения составила 90 % (одна мышь погибла на 6-е сут после инфицирования), в то время как гибель мышей из контрольной группы составила 100 % в течение 96 ч. Полученные результаты позволили использовать штаммы *Enterococcus cecorum* № 414 и № 1517 в качестве контрольно-производственных культур при изготовлении и контроле средств специфической профилактики энтерококкоза птицы, а также свидетельствовали, что титр антител 1:26 способен обеспечить защиту лабораторных животных от заражения и гибели.

При подборе иммунизирующей дозы и адьюванта использование девяти вариантов вакцины не вызвало у подопытных цыплят каких-либо системных и местных побочных эффектов, ввиду чего окончательный выбор дозы и адьюванта был обусловлен титром образовавшихся антител (табл. 2).

**2. Титр антител у цыплят кросса Cobb 500 при вакцинации монопрепаратами на основе штамма *Enterococcus cecorum* № 414 в зависимости от концентрации бактериальных клеток в препарате и используемых адьювантов ( $M \pm SEM$ , условия вивария)**

Микробных клеток в дозе 0,2 см <sup>3</sup>	Адьювант		
	гидроксид алюминия	ПЭГ-6000	Асгупол®971Р
1,0×10 <sup>9</sup>	1:25,60±8,76 (1-я группа)	1:38,40±14,31 (4-я группа)	1:25,60±8,76 (7-я группа)
1,5×10 <sup>9</sup>	1:28,80±7,15 (2-я группа)	1:44,80±17,52 (5-я группа)	1:25,60±8,76 (8-я группа)
2,0×10 <sup>9</sup>	1:35,20±17,52 (3-я группа)	1:44,80±17,52 (6-я группа)	1:28,80±7,15 (9-я группа)

Максимальный титр антител получили у птицы, которую 2-кратно вакцинировали препаратом, изготовленным с добавлением в качестве адьюванта ПЭГ-6000 (1:44,80±17,52). Важно отметить, что зафиксировать статистически достоверные различия между опытными группами по титру антител (согласно *t*-критерию Стьюдента) не удалось, что подтверждает одинаковую способность изученных штаммов патогенных энтерококков индуцировать антитела. Несмотря на отсутствие статистически достоверной разницы между полученными результатами, оптимальной концентрацией протективного антигена можно считать 1,5×10<sup>9</sup> мкр кл. в объеме 0,2 см<sup>3</sup>, поскольку дальнейшее повышение концентрации не привело к увеличению содержания антител. Выбор ПЭГ-6000 в качестве адьюванта для про-

ведения дальнейших испытаний также был обусловлен простотой его технологического производства в сравнении с ГОА и Acrypol®971P.

Результаты клинического исследования цыплят после первой и второй вакцинации свидетельствовали о безвредности испытуемого средства. Цыплята в опыте не отличались от цыплят контрольной группы по подвижности, потреблению воды и корма. Каких-либо системных и местных реакций при введении препарата не зафиксировали.

По достижении 140-суточного возраста число павших цыплят в опытной группе оказалось на 1,31 % меньше, чем в контрольной (табл. 3). При этом отмечалось повышение выбраковки в опытной группе на 1,00 % по сравнению с контрольной, ввиду чего суммарный отход в опытной группе был на 0,13 % ниже, чем в контроле. Дополнительно отмечали повышение однородности поголовья в опытной группе на 4,6 %.

**3. Производственные показатели у 140-суточных цыплят кросса Cobb 500 при 2-кратной вакцинации в возрасте 12 и 26 сут экспериментальной вакциной из штамма *Enterococcus cecorum* № 414 (клинические испытания, ООО «Ровеньский бройлер», Белгородской обл., Ровеньский р-н, 2018 год)**

Группа	n	Падёж, гол./%	Выбраковка, гол./%	Общий отход, гол./%	Однородность, %
Опыт	7019	199/2,84	144/2,05	343/4,89	93,7
Контроль	7020	291/4,15	74/1,05	365/5,02	89,1
Отклонение от контроля	+1	-92/-1,31	+70/+1,0	-22/-0,13	+4,6

Испытание вакцины на ремонтном молодняке при 2-кратном введении показало ее безвредность. Системные и местные реакции отсутствовали, потребление корма и воды, а также подвижность птицы опытной и контрольной групп не различалось. В среднем в опытной группе падёж был на 0,69 % ниже, чем в контрольной (табл. 4). Количество выбракованной птицы в опытной группе оказалось на 1,11 % меньше аналогичного показателя в контроле, а общий отход — на 1,81 % ниже. Средняя продуктивность вакцинированной птицы была на 1,7 % выше, чем в контрольной группе.

**4. Производственные показатели у 239-суточного ремонтного молодняка кросса Cobb 500 при 2-кратной вакцинации в возрасте 121 и 135 сут экспериментальной вакциной из штамма *Enterococcus cecorum* № 414 (клинические испытания, ООО «Ровеньский бройлер», Белгородской обл., Ровеньский р-н, 2018 год)**

Группа	n	Падёж, гол./%	Выбраковка, гол./%	Общий отход, гол./%	Яичная продуктивность, %
Опыт	9030	182/2,01	281/3,11	463/5,12	82,9
Контроль	8821	239/2,70	373/4,22	612/6,93	81,2
Отклонение от контроля	-209	-57/-0,69	-92/-1,11	-149/-1,81	+1,7

Примечание. Яичная продуктивность: валовое производство яйца × 100/поголовье птицы.

Оценка антигенной активности препарата позволила установить, что после первой вакцинации ремонтного поголовья средний титр антител у птицы составлял 1:5,60±2,00 (n = 25), а через 14 сут после второй вакцинации он увеличился до 1:43,52±15,67 (p = 0,05) и превышал значение защитного уровня антител.

Инфекционное заболевание промышленной птицы, вызываемое *Enterococcus cecorum*, широко распространено во всем мире и провоцирует массовые патологии опорно-двигательной системы (2, 3, 11). В свою очередь, это ведет к повышению падежа и выбраковке, а следовательно, к снижению производственных показателей (34). Согласно литературным источникам, возбудитель заболевания обладает высоким тропизмом, позво-

ляющим ему проникать в суставы и позвоночный столб, откуда его выделяют с использованием рутинных бактериологических методов (10, 35, 36). При этом специалисты также акцентируют внимание на возможности выделения ЕС не только из пораженных суставов и позвоночника, но и из кишечника 7-10-суточных цыплят (11, 37). Помимо обозначенной локализации, нами при выполнении настоящей работы была установлена возможность индикации микроорганизма в сердце, селезенке, печени и легких. Следовательно, микробиологическое исследование секционного материала от птицы позволяет не только оценить степень тяжести инфекционного процесса, но определить риски возникновения патологий опорно-двигательной системы до их фактического проявления. Кроме того, ранее не были описаны случаи выделения возбудителя из легких птицы, а основными путями инфицирования считали алиментарный и контактный (37), но наши результаты позволяют говорить о возможности аэрогенной передачи инфекции. Высокий тропизм возбудителя стоит связывать с его вирулентными свойствами, которые мы подтвердили в лабораторных условиях (35). Так, внутрибрюшинное введение культуры ЕС беспородным белым мышам провоцировало их гибель в течение 24-96 ч. Эти данные подтверждают возможность использовать указанную лабораторную модель при постановке биопробы, необходимой для установления окончательного диагноза. Приведенная модель может служить альтернативой методу с использованием куриных эмбрионов, описанному в работе А. Jung с соавт. (38). Авторы предлагают воспроизводить инфекцию на 11-суточных куриных эмбрионах для определения патогенности культур *Enterococcus cecorum*. Для этого испытываемый штамм ( $10^2$  мкр кл.) вводится в аллантоисную полость. При наличии патогенности у культур микроорганизмов гибель эмбрионов должна произойти в течение 5-7 сут. Использование белых мышей при изучении патогенных и вирулентных свойств ЕС, на наш взгляд, имеет свои преимущества. Во-первых, это связано с простотой воспроизведения манипуляции, а также с меньшими сроками гибели мышей по сравнению с куриными эмбрионами. Во-вторых, использование мышей, позволит более точно определить значения  $LD_{50}$  у испытываемых штаммов, что, в свою очередь, необходимо для контроля иммуногенной активности разрабатываемого средства. Кроме того, сам контроль иммуногенной активности средства также можно проводить на мышах, а не на куриных эмбрионах.

Серотипизация полученных нами штаммов энтерококков подтвердила их гомологичность, что, по нашему мнению, можно ассоциировать с единым источником происхождения прародительского и родительского поголовья птицы. Это предположение можно подтвердить или опровергнуть при генотипировании культур.

В связи с широким распространением энтерококкоза в различных регионах страны, патогенностью и высоким тропизмом его возбудителя (35), а также развитием и распространением антибиотикорезистентности (39, 40) разработка вакцины — наиболее перспективный способ борьбы с заболеванием. Л.В. Vorst с соавт. (33) также доказали возможность эффективной борьбы с энтерококкозом посредством использования инактивированных вакцин на поголовье товарного бройлера. При этом авторы отмечают, что антигенный состав ЕС может быть представлен несколькими гетерологичными серотипами, не проявляющими перекрестную антигенную активность, ввиду чего эффективность вакцинного препарата из одного серотипа оказалась низкой (33). В других работах было установлено существование как минимум семи групп генотипов ЕС и их разделение на две

серологические группы (38, 41), для борьбы с которыми предложены инактивированные поливалентные вакцины из двух штаммов *Enterococcus cecorum* (33). Эта комбинация показала высокую протективную эффективность в отношении всех 7 генотипов. Отличием этого средства от испытанной нами вакцины был используемый штамм и адъювант. Зарубежные специалисты применили масляный адъювант, в то время как мы — ПЭГ-6000, но, несмотря на это, полученные результаты можно считать сопоставимыми.

Таким образом, инфекция опорно-двигательной системы, вызванная *Enterococcus cecorum* (ЕС), широко распространена на птицеводческих предприятиях в различных регионах Российской Федерации, что свидетельствует об эпизоотии энтерококкоза. Результаты бактериологических исследований секционного материала, полученного от птицы с типичными клинико-морфологическими проявлениями инфекции, свидетельствуют о высоком тропизме возбудителя, способствующем его проникновению в различные паренхиматозные органы и ткани. Максимальная инцидентность выделения ЕС — из пораженных суставов и фрагментов позвоночника (соответственно 81,36 и 76,31 %). У большинства изолятов возбудителя (72,73 %) зафиксирована резистентность к ампициллину и пенициллину, в то время как максимальной антибактериальной эффективностью обладали фосфомицин (90,91 %), гентамицин (72,73 %) и левофлоксацин (72,73 %). Установлена антигенная гомологичность всех исследуемых культур энтерококков (их принадлежность к одному серотипу) и высокая степень патогенности для лабораторных животных при внутрибрюшинном введении ( $LD_{50}$  —  $1,7 \times 10^7$ – $9,4 \times 10^8$  мкр кл.). Двукратная иммунизация кроликов моновариантными вакцинами, изготовленными из каждой культуры энтерококка, способствовала формированию титра антител в диапазоне 1:8–1:32. При этом по результатам испытания иммуногенной активности разрабатываемого средства на белых мышах защитный титр антител против ЕС в среднем был равен 1:26. Подбор иммунизирующей дозы и адъюванта показал, что  $1,5 \times 10^9$  мкр кл. бактериального антигена в сочетании с ПЭГ-6000 обеспечивают выработку у птицы максимального титра антител. Клинические испытания на цыплятах и ремонтном молодняке кросса Cobb 500 подтвердили безвредность биопрепарата в сочетании с высокой эффективностью. Так, при использовании экспериментальной вакцины в промышленных условиях было зафиксировано снижение отхода поголовья цыплят и ремонтного молодняка соответственно на 0,13 и 1,81 %, а также повышение однородности на 4,6 % и яичной продуктивности на 1,7 %. Представленные результаты клинических испытаний экспериментальной серии свидетельствуют о высокой протективной эффективности препарата против энтерококковой инфекции у кур.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mazur-Gonkowska B., Krasnodębska-Dępta A., Koncicki A. Enterococci in the pathology of poultry. *Medycyna weterynaryjna*, 2006, 62(10): 1108–1112.
2. Braga J.F.V., Martins N.R.S., Ecco R. Vertebral osteomyelitis in broilers: a review. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 2018, 20(3): 605–616 (doi: 10.1590/1806-9061-2017-0690).
3. De Herdt P., Defoort P., Van Steelant J., Swam H., Tanghe L., Van Goethem S., Vanrobaeys M. *Enterococcus cecorum* osteomyelitis and arthritis in broiler chickens. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 2009, 78(1): 44–48.
4. Delaunay E., Abat C., Rolain J.-M. *Enterococcus cecorum* human infection, France. *New Microbes and New Infections*, 2015, 7: 50–51 (doi: 10.1016/j.nmni.2015.06.004).
5. Flannagan S.E., Chow J.W., Donabedian S.M., Brown W.J., Perri M.B., Zervos M.J., Oza-

- wa Y., Clewell D.B. Plasmid content of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolate from a patient also colonized by *Staphylococcus aureus* with a VanA phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(12): 3954-3959 (doi: 10.1128/aac.47.12.3954-3959.2003).
6. De Baere T., Claeys G., Verschraegen G., Devriese L., Baele M., Van Vlem B., Vanholder R., Dequidt C., Vaneechoutte M. Continuous ambulatory peritoneal dialysis peritonitis due to *Enterococcus cecorum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(9): 3511-3512.
  7. Ahmed F.Z., Baig M.W., Gascoyne-Binzi D., Sandoe J.A.T. *Enterococcus cecorum* aortic valve endocarditis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2011, 70(4): 525-527 (doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.04.001).
  8. Stubljar D., Skvarc M. Enterococcus cecorum infection in two critically ill children and in two adult septic patients. *Slovenian Veterinary Research*, 2015, 52(1): 39-44.
  9. Mussap M., Noto A., Fravega M., Fanos V. Soluble CD14 subtype prepsin (sCD14-ST) and lipopolysaccharide binding protein (LBP) in neonatal sepsis: new clinical and analytical perspectives for two old biomarkers. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2011, 24(sup2): 12-14 (doi: 10.3109/14767058.2011.601923).
  10. Stalker M.J., Brash M.L., Weisz A., Ouckama R.M., Slavic D. Arthritis and osteomyelitis associated with *Enterococcus cecorum* infection in broiler and broiler breeder chickens in Ontario, Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2010, 22(4): 643-645 (doi: 10.1177/104063871002200426).
  11. Aitchison H., Poolman P., Coetzer M., Griffiths C., Jacobs J., Meyer M., Bisschop S. Enterococcal-related vertebral osteoarthritis in South African broiler breeders: A case report. *Journal of the South African Veterinary Association*, 2014, 85(1): 1-5 (doi: 10.4102/jsava.v85i1.1077).
  12. Devriese L.A., Hommez J., Wijfels R., Haesebrouck F. Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1991, 71(1): 46-50.
  13. Baele M., Devriese L.A., Butaye P., Haesebrouck F. Composition of enterococcal and streptococcal flora from pigeon intestines. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92(2): 348-351 (doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01537.x).
  14. Devriese L.A., Ceysens K., Haesebrouck F. Characteristics of *Enterococcus cecorum* strains from the intestines of different animal species. *Letters in Applied Microbiology*, 1991, 12(4): 137-139 (doi: 10.1111/j.1472-765x.1991.tb00524.x).
  15. Devriese L.A., Colque J.I.C., De Herdt P., Haesebrouck F. Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats. *Journal of Applied Bacteriology*, 1992, 73(5): 421-425 (doi: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04998.x).
  16. Boerlin P., Nicholson V., Brash M., Slavic D., Boyen F., Sanei B., Butaye P. Diversity of *Enterococcus cecorum* from chickens. *Veterinary Microbiology*, 2012, 157(3-4): 405-411 (doi: 10.1016/j.vetmic.2012.01.001).
  17. Kuznetsova M.V., Afanasievskaya E.V., Pokatilova M.O., Kruglova A.A., Gorovitz E.S. Diversity and antibiotic resistance of enterobacteria isolated from broilers in a poultry farm of Perm Krai: a 14-year study. *Agricultural Biology*, 2019, 54(4): 754-766 (doi: 10.15389/agrobiol.2019.4.754eng).
  18. Jung A., Rautenschlein S. Comprehensive report of an *Enterococcus cecorum* infection in a broiler flock in Northern Germany. *BMC Veterinary Research*, 2014, 10: 311-319 (doi: 10.1186/s12917-014-0311-7).
  19. Chadfield M.S., Christensen J.P., Christensen H., Bisgaard M. Characterization of streptococci and enterococci associated with septicemia in broiler parents with a high prevalence of endocarditis. *Avian Pathology*, 2004, 33(6): 610-617 (doi: 10.1080/03079450400013089).
  20. Devriese L.A., Cauwerts K., Hernans K., Wood A.M. *Enterococcus cecorum* septicemia as a cause of bone and joint lesions resulting in lameness in broiler chickens. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 2002, 71(3): 219-221.
  21. Talebi A., Taifebagherlu J., Sharifi A., Delkhosh-Kasmaie F. Spondylitis in broiler breeder farms in West-Azerbaijan province, Iran: clinical report. *Veterinary Research Forum*, 2016, 7(4): 353-355.
  22. Creti R., Imperi M., Bertuccini L., Fabretti F., Orefici G., Di Rosa R., Baldassarri L. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *Journal of Medical Microbiology*, 2004, 53(1): 13-20 (doi: 10.1099/jmm.0.05353-0).
  23. Kense M.J., Landman J.M. *Enterococcus cecorum* infections in broiler breeders and their offspring: molecular epidemiology. *Avian Pathology*, 2011, 40(6): 603-612 (doi: 10.1080/03079457.2011.619165).
  24. Методические указания по патоморфологической диагностике болезней животных, птиц и рыб в ветеринарных лабораториях. М., 2000.
  25. ГОСТ 31746-2012. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*. М., 2013.
  26. МР 4.2.0089-14. Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I-II групп патогенности. М., 2015.

27. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М., 2004.
28. ГОСТ 28085-2013. Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. М., 2014.
29. ГОСТ Р 50258-92. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия. М., 1994.
30. СанПиН 2.1.4.1074-01. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. М., 2001.
31. СП 2.2.1.3218-14. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вывариев). М., 2014.
32. ГОСТ 18221-2018. Комбикорма полнорационные для сельскохозяйственной птицы. Общие технические условия. М., 2018.
33. Borst L.B., Suyemoto M.M., Chen L.R., John Barnes H. Vaccination of breeder hens with a polyvalent killed vaccine for pathogenic *Enterococcus cecorum* does not protect offspring from enterococcal spondylitis. *Avian Pathology*, 2018, 48(33): 17-24 (doi: 10.1080/03079457.2018.1536819).
34. Robbins K.M., Suyemoto M.M., Lyman R.L., Martin M.P., Barnes H.J., Borst L.B. An outbreak and source investigation of enterococcal spondylitis in broilers caused by *Enterococcus cecorum*. *Avian Diseases*, 2012, 56(4): 768-773 (doi: 10.1637/10253-052412-case.1).
35. Dolka B., Chrobak-Chmiel D., Makrai L., Szeleszczuk P. Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus cecorum* strains associated with infections in poultry. *BMC Veterinary Research*, 2016, 12(1): 129 (doi: 10.1186/s12917-016-0761-1).
36. Devriese L.A., Pot B., Collins M.D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Bacteriology*, 1993, 75(5): 399-408 (doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb02794.x).
37. Borst L.B., Suyemoto M.M., Sarsour A.H., Harris M.C., Martin M.P., Strickland J.D., Oviedo E.O., Barnes H.J. Pathogenesis of Enterococcal spondylitis caused by *Enterococcus cecorum* in broiler chickens. *Veterinary Pathology*, 2016, 54(1): 61-73 (doi: 10.1177/0300985816658098).
38. Jung A., Metzner M., Ryll M. Comparison of pathogenic and non-pathogenic *Enterococcus cecorum* strains from different animal species. *BMC Microbiology*, 2017, 17(1): 33 (doi: 10.1186/s12866-017-0949-y).
39. Hollenbeck B.L., Rice L.B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, 2012, 3(5): 421-569 (doi: 10.4161/viru.21282).
40. Suyemoto M.M., Barnes H.J., Borst L.B. Culture methods impact recovery of antibiotic-resistant Enterococci including *Enterococcus cecorum* from pre- and postharvest chicken. *Letters in Applied Microbiology*, 2017, 64(3): 210-216 (doi: 10.1111/lam.12705).
41. Borst L.B., Suyemoto M.M., Scholl E.H., Fuller F.J., Barnes H.J. Comparative genomic analysis identifies divergent genomic features of pathogenic *Enterococcus cecorum* including a type IC CRISPR-Cas system, a capsule locus, an *epa*-like locus, and putative host tissue binding proteins. *PLoS ONE*, 2015, 10(4): e0121294 (doi: 10.1371/journal.pone.0121294).

ФГБНУ ФНЦ Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН,  
109428 Россия, г. Москва, Рязанский просп., 24, к. 1,  
e-mail: ddsmirnov2010@mail.ru, kapustin\_andrei@mail.ru,  
shastin.pasha@yandex.ru, admin@viev.ru, a-laishevtsev@bk.ru ✉

Поступила в редакцию  
28 января 2020 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2020, V. 55, № 2, pp. 328-342

## DEVELOPMENT OF A VACCINE AGAINST ENTEROCOCCOSIS FOR FARM BIRDS AND ASSESSMENT OF ITS SPECIFIC EFFECTIVENESS

D.D. Smirnov, A.V. Kapustin, P.N. Shastin, M.I. Gulyukin, A.I. Laishevtsev

Federal Scientific Centre Skryabin and Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary RAS, 24/1, Ryzanskii Prospekt, Moscow, 109428 Russia, e-mail ddsmirnov2010@mail.ru, kapustin\_andrei@mail.ru, shastin.pasha@yandex.ru, admin@viev.ru, a-laishevtsev@bk.ru (✉ corresponding author)

ORCID:

Smirnov D.D. orcid.org/0000-0003-23-44-3755

Gulyukin M.I. orcid.org/0000-0002-7489-6175

Kapustin A.V. orcid.org/0000-0003-0136-2487

Laishevtsev A.I., orcid.org/0000-0002-5050-2274

Shastin P.N. orcid.org/0000-0001-7360-927X

The authors declare no conflict of interests

Received January 28, 2020

doi: 10.15389/agrobiol.2020.2.328eng

### Abstract

Enterococcosis in poultry is a disease which affects the organs of locomotor system and is

accompanied by lameness, ataxia, spondylitis, necrosis of the femoral head and bacterial chondronecrosis. The main pathogen of this disease on the territory of the Russian Federation is bacteria of the species *Enterococcus cecorum* (EC). The disease can occur among young herds for replacement (mainly cockerels) at the age from 1 to 7 weeks; commodity broiler aged 3-5 weeks; and parent stock during peak production. In this work we represent for the first time the results of the development and tests of the domestic means of specific prevention from enterococcosis in poultry. The experimental series of vaccine, tested in industrial environment on poultry, was produced on the basis of the selection of production-control enterococcus species and the measurement of the optimal immunizing dose and adjuvant. The proposed medicine possesses areactogenicity and high specific effectiveness when used for poultry of different age groups. The aim of the work is the development of means of specific prevention from enterococcosis of poultry and evaluation of its effectiveness. The study of the epizootic situation on enterococcosis in poultry on the territory of the Russian Federation in 2017-2018 showed that 11 poultry enterprises in the Belgorod, Vladimir, Yaroslavl, Kaluga, Chelyabinsk, Tver and Penza regions, as well as in the Republics of Mari El and Udmurtia, were enterococcosis positive. All in all, 647 samples of parenchymal organs and tissues obtained from birds of Cobb 500 cross with typical clinical morphological manifestation of enterococcosis were examined. Strains *E. cecorum* Nos. 414, 425, 426, 837, 838, 839, 1096, 1481, 1517, 1647, 1865 were selected during the complex bacteriological diagnosis of breeding material. It was determined that 72.73 % of enterococci are resistant to ampicillin and penicillin, 45.45 % to vancomycin, 27.27 % to levofloxacin, linezolid, tetracycline, 18.18% to norfloxacin, rifampicin, chloramphenicol and ciprofloxacin, and 9.09% to doxycycline. The largest number of species are sensitive to gentamicin and levofloxacin (72.73 %); doxycycline, linezolid, rifampicin, chloramphenicol (54.55 %), respectively. All the studied strains led to the death of 100 % of laboratory mice within 24-96 hours after intraperitoneal infection. The LD<sub>50</sub> of enterococcal cultures was in the range of  $1.7 \times 10^7$ - $9.4 \times 10^8$  microbial cells. When determining the antigenic properties of EC species in the agglutination reaction, it was confirmed that they are all homologous to each other, i.e. belong to the same serotype. Evaluation of the level of antibodies in doubly immunized white mice with vaccines from strains No. 414 and No. 1517 showed that they have the highest antigenicity, inducing immunity in the titer of  $1:26.66 \pm 9.23$ , while the antigenicity of other strains was  $1:21.33 \pm 9.23$  and less. Based on this result, strains No. 414 and No. 1517 were subsequently used for control and production. Evaluation of the immunogenic activity of the experimental medicine on white mice showed that the vaccine ensures the safety of 90 % of infected animals, while mortality among the mice of the control group was 100 %. To ensure high efficiency of the developed means, 1.5 billion microbe cells EC are needed, and the optimal amount of a single dose is 0.2 cm<sup>3</sup>. Formalin (0.3%) was used as an inactivant and polyethylene glycol 6000 (PEG-6000) as an adjuvant at the rate of 10 % v/v. Phosphate-buffered saline (PBS) was used as diluent, the pH level was set to 7.2 with a 20 % sodium hydroxide solution. The vaccine provoked the formation of immunity 12-14 days after a double intramuscular injection, which lasts at least 4 months. Clinical trials on chickens of Cobb 500 cross proved the safety and the high specific effectiveness of the vaccine for poultry. Double vaccination of replacement herds in poultry led to a 4.6 % increase in uniformity and a 0.13 % decrease in total waste. The analysis of production indicators of vaccinated laying hens showed a 1.81 % decrease in total mortality and a 1.7 % increase in egg productivity of. After the first vaccination of the parent livestock, the average antibody level in the bird was  $1:5.60 \pm 2.00$  ( $n = 25$ ), and 14 days after the second vaccination, the titer reaches  $1:43.52 \pm 15.67$ , which exceeds the value of the protective level of antibodies ( $1:26.66 \pm 9.23$ ). The results obtained allow us to talk about the possibility of further implementation of the medicine developed on the basis on *Enterococcus cecorum* strains in practical use.

Keywords: *Enterococcus cecorum*, EC, osteomyelitis, femoral head necrosis, enterococcosis, clinical signs, preventive measures, vaccination.