

Практическое применение онлайн-платформы AMRcloud для ветеринарного мониторинга антибиотикорезистентности возбудителей болезней зоонозного происхождения

*А. Л. КРОТОВА¹, С. А. МАКАВЧИК², А. А. СУХИНИН²

¹ Северо-Западная испытательная лаборатория ФГБУ «ВНИИЗЖ», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Practical Application of the AMRcloud Online Platform for Veterinary Monitoring of Antibiotic Resistance of Zoonotic Pathogens

*ANASTASIA L. KROTOVA¹, SVETLANA A. MAKAVCHIK², ALEKSANDR A. SUKHININ²

¹ North-West Testing Laboratory «ARRIAH», St. Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia

Резюме

Актуальность. Ветеринарный мониторинг антибиотикорезистентности возбудителей зоонозных болезней необходим для рационального использования антибиотиков. Интеграция и использование онлайн-платформы AMRcloud в ветеринарных учреждениях значительно упростит процесс обработки данных, повысит скорость анализа результатов мониторинга, поможет преодолеть межведомственный барьер в обмене информацией между медициной и ветеринарией. **Цель исследования** — практическое применение онлайн-платформы AMRcloud для ветеринарного мониторинга антибиотикорезистентности возбудителей болезней зоонозного происхождения. **Материал и методы.** В ходе ветеринарного мониторинга была определена чувствительность 275 изолятов (16 видов бактерий) к 13 антимикробным препаратам, наиболее часто используемым в животноводстве: амоксилав, ампициллин, бензилпенициллин, гентамицин, клиндамицин, стрептомицин, тетрациклин, тобрамицин, цефалексин, цефотаксим, цефтриаксон, эритромицин, колистин. Объединение полученных данных в единую систему осуществлялось с помощью онлайн-платформы AMRcloud. **Результаты.** Выявлены наиболее часто встречающиеся возбудители маститов: *Streptococcus agalactiae* (n=96), *Escherichia coli* (n=55), *Staphylococcus aureus* (n=33) и *Enterococcus faecalis* (n=31). Установлена продукция ESBL у 13 (19,7%) из 66 изолятов порядка Enterobacterales, выделенных из клинического материала крупного и мелкого рогатого скота, что ограничивает применение бета-лактамов антибиотиков для лечения маститов. **Заключение.** Использование онлайн-платформы AMRcloud в ветеринарных лабораториях значительно упрощает процесс обработки данных, повышает скорость анализа результатов, предоставляет возможность обмена информацией по антибиотикорезистентности между лабораториями.

Ключевые слова: механизмы резистентности; антибиотикорезистентность; антибиотикотерапия; сельскохозяйственные животные; AMRcloud

Для цитирования: Кротова А. Л., Макавчик С. А., Сухинин А. А. Практическое применение онлайн-платформы AMRcloud для ветеринарного мониторинга антибиотикорезистентности возбудителей зоонозного происхождения. Антибиотики и химиотер. 2023; 68 (5–6): 19–23. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-5-6-19-23>.

Abstract

Background. Veterinary monitoring of antibiotic resistance in pathogens of zoonotic diseases is necessary for the rational use of antibiotics. Integration and use of the AMRcloud online platform in veterinary institutions will significantly simplify data processing, increase the speed of data analysis of monitoring results, and help overcome the interagency barrier in the exchange of information between human medicine and veterinary medicine. The aim of the study is the practical application of the AMRcloud online platform for veterinary monitoring of antibiotic resistance in pathogens of zoonotic origin. **Material and methods.** In the course of veterinary monitoring, the susceptibility of 275 isolates (16 species of bacteria) to 13 antimicrobial drugs most commonly used in animal husbandry was determined. Among the antimicrobial drugs were: amoxiclav, ampicillin, benzylpenicillin, gentamicin, clindamycin, streptomycin, tetracycline, tobramycin, cephalexin, cefotaxime, ceftriaxone, erythromycin, and colistin. The data obtained were combined into a single system using the AMRcloud online platform. **Results.** The most common causative agents of mastitis were identified: *Streptococcus agalactiae* (n=96), *Escherichia coli* (n=55), *Staphylococcus aureus* (n=33) and *Enterococcus faecalis* (n=31). ESBL produc-

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: Московское шоссе, д. 15, ВНИИЗЖ, г. Санкт-Петербург, Россия, 196158.
E-mail: Sinnombre1099@gmail.com

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 15 Moskovskoye Highway, ARRIAH, St. Petersburg, 196158 Russia.
E-mail: Sinnombre1099@gmail.com

tion have been detected in 13 (19.7%) of 66 isolates of the order Enterobacterales, isolated from clinical material of cattle and small ruminants, which limits the use of beta-lactam antibiotics for the treatment of mastitis. **Conclusion.** The use of the AMRcloud online platform in veterinary laboratories greatly simplifies data processing, increases the result analysis speed, and provides an opportunity to exchange information on antibiotic resistance between laboratories.

Keywords: mechanisms of resistance; antibiotic resistance; antibiotic therapy; farm animals; AMRcloud

For citation: Krotova A.L., Makavchik S.A., Sukhinin A. A. Practical application of the amrcloud online platform for veterinary monitoring of antibiotic resistance of zoonotic pathogens. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68 (5–6): 19–23. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-5-6-19-23>.

Введение

Проблема лекарственной резистентности возбудителей болезней животных и человека к антибактериальным препаратам на сегодняшний день является общемировой. В нашей стране она приобрела особую актуальность в связи с утверждением в 2017 г. Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 г. (Распоряжение Правительства РФ от 25 сентября 2017 г. № 2045-р) [1].

Учёт спектра активности антимикробных препаратов и профиля антибиотикорезистентности основных возбудителей зоонозных болезней становится необходимым для рационального использования имеющихся в ветеринарной медицине антибиотиков.

Считается, что патогенные бактерии, вызывающие болезни животных, как правило, чувствительны к антибиотикам, но всё чаще встречаются «суперпатогены», обладающие комбинацией антибиотикорезистентных и вирулентных свойств, способные значительно осложнить терапию и усугубить тяжесть течения заболевания [2].

Широкое распространение бета-лактамаз расширенного спектра (ESBL) и появление карбапенемаз у возбудителей болезней животных вызывает потребность в быстром выявлении указанных механизмов устойчивости микроорганизмов фенотипическими и генотипическими методами [3–5].

Ветеринарный мониторинг антибиотикорезистентности должен осуществляться в виде систематического, непрерывного процесса сбора, анализа и представления данных по устойчивости бактерий, выделенных от животных, к антимикробным препаратам. Практические аспекты полученной в рамках мониторинга информации включают организацию лечебных мероприятий [6–8].

Для возможности сделать практические выводы и использовать результаты мониторинга в дальнейшей работе ветеринарной лаборатории, информация должна быть систематизирована и представлена в максимально удобном формате, учитывая значительный объём и разнородность данных (разные группы антибиотиков, бактерий, виды животных, регионы, типы образцов, методы и т. д.).

Цель работы — практическое применение онлайн-платформы AMRcloud для ветеринарного мониторинга антибиотикорезистентности возбудителей болезней зоонозного происхождения в целях комплексного анализа данных и оптимизации лечебных мероприятий.

Материал и методы

Сотрудники ФГБУ «Ленинградская межобластная ветеринарная лаборатория» совместно с ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» в период с 2017 по 2021 гг. проводили исследования по определению устойчивости этиологически значимых бактерий, выделенных от продуктивных животных, к основным группам и видам антибиотиков, применяемым в ветеринарии до введения ограничений (Приказ Министерства сельского хозяйства об утверждении перечня допустимых лекарственных препаратов, предназначенных для лечения инфекционных болезней животных от 18.11.2021 г.): пенициллины (амоксиклав, ампициллин, бензилпенициллин), аминогликозиды (гентамицин, стрептомицин, тобрамицин), линкозамиды (клиндамицин), тетрациклины (тетрациклин), цефалоспорины (цефалексин, цефотаксим, цефтриаксон), макролиды (эритромицин), полимиксины (колистин). Для удобства систематизации и анализа данных была применена онлайн-платформа AMRcloud.

Включение клинических изолятов в экспериментальную выборку проводили согласно следующим критериям: этиологическая роль в развитии патологии, положительная биопроба на лабораторных животных.

Антимикробные препараты были выбраны, исходя из сведений о регистрации и применении их в животноводстве, а также с учётом перечней критически важных антимикробных препаратов для медицинского и ветеринарного применения, опубликованных Всемирной организацией здравоохранения, Международным эпизоотическим бюро и Министерством сельского хозяйства Российской Федерации [9–11].

Впервые в ветеринарной практике для оценки биологической чувствительности бактерий и интерпретации результатов предложено использовать критерии ECOFF (epidemiological cutoff values) с целью выбора антимикробных препаратов для терапии инфекционных болезней животных [12]. Клинические рекомендации EUCAST в ветеринарии с этой целью использоваться не могут.

Первичные посевы секрета молочных желёз, полученного от крупного и мелкого рогатого скота с клиническим и субклиническим маститом, делали на колумбийский агар с кровью барана, МПБ, МПБ с 6,5% соли, среду Кода, среду Эндо, затем инкубировали при 37°C в течение 24 ч.

Подтверждали идентификацию выделенных культур с помощью тест-систем: Enterotest 24 N, Staphytest 24 («Erba Lachema», Чешская Республика), а также api 20 E, api 20 Strep, api Staph («BIOMERIEUX», Франция).

Окончательную идентификацию атипичных бактерий проводили методом масс-спектрометрии с использованием системы MALDI Biotyper Microflex.

Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотиков проводили с помощью планшетов Sensititre ESB1F, RUNAE, GPALL1F, RUSTEF («Trek Diagnostic Systems», Великобритания) по стандарту ISO 20776-1.

Чувствительность к антибиотикам диско-диффузионным методом определяли с использованием агара Мюллера-Хинтон без дополнительных добавок и с добавлением 5% дефибринированной крови лошади и β -НАД для микроорганизмов со сложными питательными потребностями.

Наличие β -лактамаз у выделенных энтеробактерий устанавливали с помощью планшета ESB1F («Trek Diagnostic Systems», Великобритания) и подтверждали методом двойных дисков на агаре Мюллера-Хинтон.

Для выявления генов приобретённых карбапенемаз групп KPC, OXA-48-подобных (типы OXA-48 и OXA-162) и металло- β -лактамаз групп VIM, IMP, NDM провели постановку ПЦР с наборами реагентов для амплификации в режиме реального времени. В ходе работы использовали наборы реагентов «АмплиСенс® MDR MBL-FL» и «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Таким образом, итоговые данные исследований включали в себя результаты видовой идентификации, фенотипической оценки чувствительности (значения МПК и диаметры задержки роста ДДМ), данные по генам резистентности к АМП, а также информацию об исследованном материале, виде животного, географическом регионе содержания животного. Собранные данные были внесены в таблицу Excel и загружены на платформу AMRcloud для последующего комплексного анализа и систематизации.

Результаты и обсуждение

Система параметров и критериев данных в AMRcloud, а также возможность интерпретации результатов фенотипического определения чувствительности по эпидемиологическим точкам отсечения удобны для визуализации и сравнения пользовательских данных с результатами исследований других ветеринарных лабораторий, которые могут значительно отличаться по параметрам эксперимента.

Анализ результатов полученных в ходе исследования данных подтверждает необходимость использования как минимум двух методов определения антибиотикочувствительности в рутинной практике ветеринарных лабораторий для корректной интерпретации результатов.

Наиболее часто встречающимися возбудителями маститов являются *Streptococcus agalactiae* (96 изолятов, 34,91%), *Escherichia coli* (55 изолятов, 20%), *Staphylococcus aureus* (33 изолята, 12%) и *Enterococcus faecalis* (31 изолят, 11,27%) (рис. 1).

Высокая доля штаммов, резистентных к цефалоспорином III поколения, а также растущая устойчивость к тобрамицину подтверждают не-

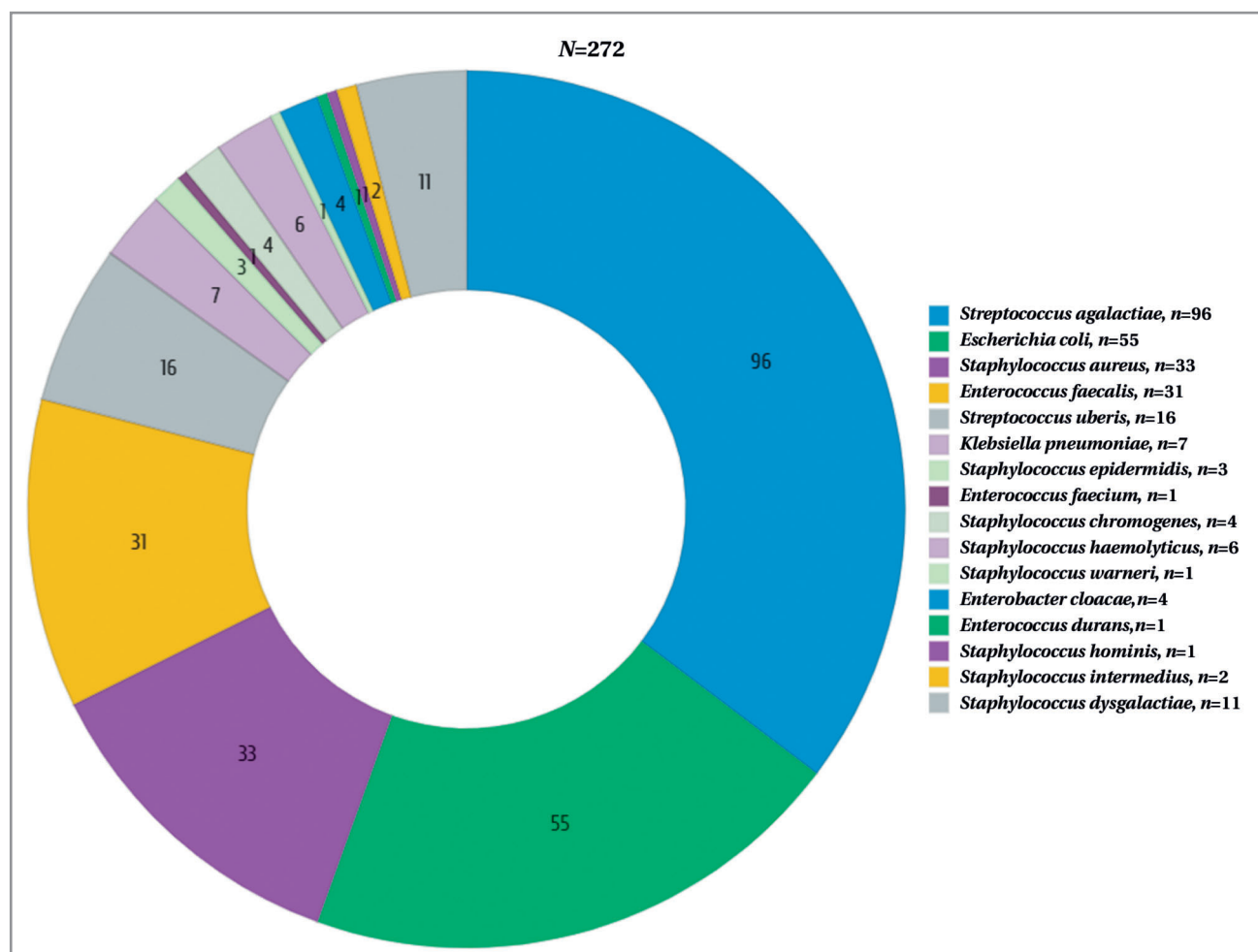


Рис. 1. Видовое разнообразие возбудителей маститов крупного и мелкого рогатого скота.

Fig. 1. Species diversity of mastitis causative agents in cattle and small ruminants.

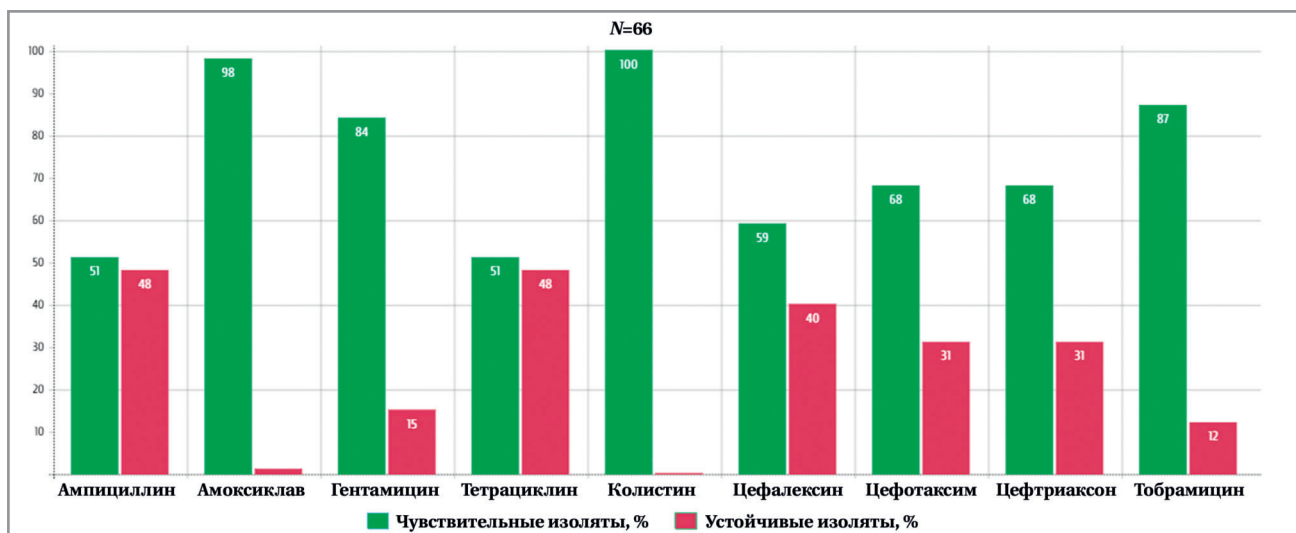


Рис. 2. Спектр устойчивых и чувствительных изолятов Enterobacteriales, выделенных от крупного и мелкого рогатого скота при маститах.

Fig. 2. Spectrum of resistant and susceptible Enterobacteriales isolated from cattle and small ruminants with mastitis.

обходимость прекратить их использование в профилактических целях и лечебных целях в животноводстве, для лечения использовать только разрешённые в ветеринарии виды и группы антибиотиков (рис. 2).

Установлена продукция ESBL у 13 (19,7%) из 66 изолятов порядка Enterobacteriales, выделенных из секрета молочных желез крупного и мелкого рогатого скота с клиническим и субклиническим маститом, что ограничивает применение бета-лактамов антибиотиков для лечения животных (рис. 3).

В результате проведения ПЦР-РВ генов приобретённых карбапенемаз группы KPC и OXA-48-подобных и металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM у выделенных культур обнаружено не было.

Полученные данные были систематизированы и представлены в совместном проекте ФГБУ «Ленинградская межобластная ветеринарная лаборатория» и ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» на платформе AMRcloud.

Заключение

На современном этапе сдерживание распространения устойчивости, преодоление резистентности к антимикробным препаратам, управление данными процессами возможны только при комплексном подходе к решению этой проблемы.

Интеграция и использование онлайн-платформы AMRcloud в ветеринарных учреждениях значительно упростит процесс обработки данных, повысит скорость анализа данных, поможет шаг

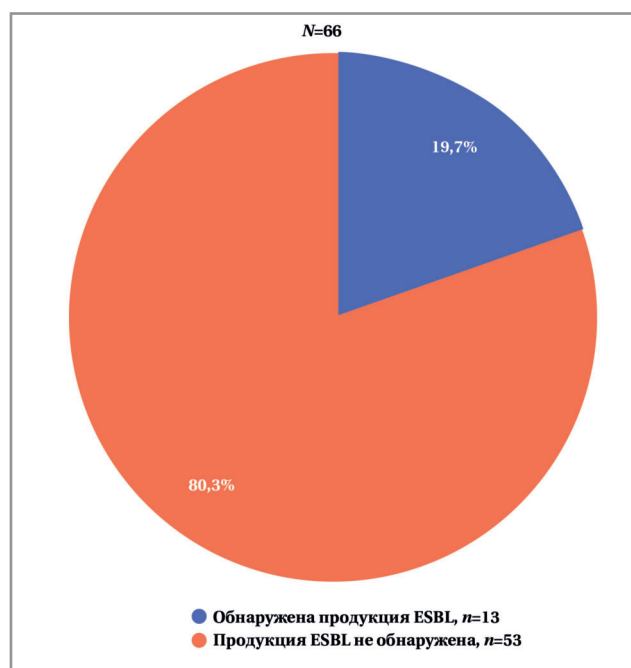


Рис. 3. Процентное соотношение выделенных изолятов с бета-лактамазной активностью к общему спектру изолятов порядка Enterobacteriales.

Fig. 3. Percentage of isolates with beta-lactamase activity compared to the total spectrum of Enterobacteriales isolates.

за шагом преодолевать межведомственный барьер в обмене информацией об антибиотикорезистентности между ветеринарией и медициной.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов

интересов, связанных с публикацией данной статьи.

Финансирование. Работа выполнена в соответствии с тематическим планом-заданием на выполнение НИР по заданию Минсельхоза России за счёт средств федерального бюджета в 2023 г.

Участие авторов. Кротова А. Л. — разработка концепции исследования, получение результатов

исследования, анализ и интерпретация данных, написание текста; Макавичик С. А. — разработка концепции исследования, написание текста, редактирование; Сухинин А. А. — редактирование, финальное утверждение для публикации.

Литература/References

1. План мероприятий на 2019–2024 годы по реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года. Утвержден распоряжением Правительства Российской Федерации от 30 марта 2019 г. № 604-р. Доступно по: <http://government.ru/docs/29477/>. Ссылка активна на: 27.02.2023 г. [Plan meropriyatiy na 2019–2024 gody po realizatsii Strategii preduprezhdeniya rasprostraneniya antimikrobnai rezistentnosti v Rossiiskoi Federatsii na period do 2030 goda. Utverzhden rasporyazheniem Pravitel'stva Rossiiskoi Federatsii ot 30 marta 2019 g. № 604-r. Dostupno po: <http://government.ru/docs/29477/>. Ssylka aktivna na: 27.02.2023 g. (in Russian)]
2. Макавичик С.А., Сухинин А.А., Енгашев С.В., Кротова А.Л. Лабораторные методы контроля полирезистентных возбудителей бактериальных болезней животных и рациональное применение антимикробных препаратов. СПб.: Издательство ВВМ, 2021. [Makavchik S.A., Sukhinin A.A., Engashev S.V., Krotova A.L. Laboratornye metody kontrolya polirezistentnykh vzbuditelei bakterial'nykh boleznei zhivotnykh i ratsional'noe primeneniye antimikrobnnykh preparatov. SPb.: Izdatel'stvo VVM; 2021. (in Russian)]
3. Макавичик С.А., Кротова А.Л., Баргман Ж.Е., Сухинин А.А., Приходько Е.И. Механизмы резистентности к антимикробным препаратам у микроорганизмов, выделенных от крупного рогатого скота. Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2020; 4: 41–46. doi: <https://doi.org/10.17238/issn2072-6023.2020.4.41>. [Makavchik S.A., Krotova A.L., Bargman Zh.E., Sukhinin A.A., Prihod'ko E.I. Mekhanizmy rezistentnosti k antimikrobnym preparatam u mikroorganizmov, vydelennykh ot krupnogo rogatogo skota. doi: <https://doi.org/10.17238/issn2072-6023.2020.4.41>. Voprosy Normativno-Pravovogo Regulirovaniya v Veterinari. 2020; 4: 41–46. (in Russian)]
4. Макавичик С.А., Сухинин А.А., Кротова А.Л., Селиванова Л.В., Приходько Е.И. Этиологическая структура возбудителей мастита коров и их характеристика чувствительности к антибактериальным препаратам в Северо-Западном регионе. Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2020; 1: 66–71. doi: <https://doi.org/10.17238/issn2072-6023.2020.1.66>. [Makavchik S.A., Sukhinin A.A., Krotova A.L., Selivanova L.V., Prihod'ko E.I. Etiologicheskaya struktura vzbuditelei mastita korov i ikh kharakteristika chuvstvitel'nosti k antibakterial'nym preparatam v Severo-Zapadnom regione. Voprosy Normativno-Pravovogo Regulirovaniya v Veterinarii 2020; 1: 66–71. doi: <https://doi.org/10.17238/issn2072-6023.2020.1.66>. (in Russian)]
5. Макавичик С.А. Рациональная фармакотерапия животных с основами ранжирования антимикробных препаратов в ветеринарных лабораториях. Ветеринария. 2022; 2: 9–12. doi: <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2022.25.02.09-12>. [Makavchik S.A. Rational pharmacotherapy of animals with the basics of ranking antimicrobials in veterinary laboratories. Veterinary Science. 2022; 2: 9–12. doi: <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2022.25.02.09-12>. (in Russian)]
6. Макаров Д.А., Карабанов С.Ю., Крылова Е.А., Поболелова Ю.И., Иванова О.Е., Гергель М.А., Куликовский А.В., Сухоедова А.В. Опыт использования онлайн-платформы Amrcloud для ветеринарного мониторинга антибиотикорезистентности зоонозных бактерий. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020; 22 (1): 53–59. doi: <https://doi.org/10.36488/cmasc.2020.1.53-59>. [Makarov D.A., Karabanov S.Yu., Krylova E.A., Pobolelova Yu.I., Ivanova O.E., Gergel' M.A., Kulikovskii A.V., Sukhoedova A.V. Opyt ispol'zovaniya onlain-platformy amrcloud for veterinarnogo monitoringa antibiotikorezistentnosti zoonoznykh bakterii. Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya. 2020; 22 (1): 53–59. doi: <https://doi.org/10.36488/cmasc.2020.1.53-59>. (in Russian)]
7. Сулян О.С., Агеевец В.А., Сухинин А.А., Агеевец И.В., Абгарян С.Р., Макавичик С.А., Каменева О.А., Косякова К.Г., Мругова Т.М., Попов Д.А., Пунченко О.Е., Сидоренко С.В. Ассоциированная устойчивость к полимиксину и бета-лактамам *Escherichia coli*, выделенных от людей и животных. Антибиотики и химиотер. 2021; 66 (11–12): 9–17. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-11-12-9-17>. [Sulyan O.S., Ageevets V.A., Sukhinin A.A., Ageevets I.V., Abgaryan S.R., Makavchik S.A., Kameneva O.A., Kosyakova K.G., Mrugova T.M., Popov D.A., Punchenko O.E., Sidorenko S.V. Associated resistance to polymyxin and beta-lactams of *Escherichia coli* isolated from humans and animals. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2021; 66 (11–12): 9–17. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-11-12-9-17>. (in Russian)]
8. Кузьменков А.Ю., Виноградова А.Г., Трушин И.В., Авраменко А.А., Эйдельштейн М.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. AMRcloud: новая парадигма мониторинга антибиотикорезистентности. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2019; 21 (2): 119–124. doi: <https://doi.org/10.36488/cmasc.2019.2.119-124>. [Kuzmenkov A.Yu., Vinogradova A.G., Trushin I.V., Avramenko A.A., Edelstein M.V., Dekhnich A.V., Kozlov R.S. AMRcloud: a new paradigm in monitoring of antibiotic resistance. Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya. 2019; 21 (2): 119–124. doi: <https://doi.org/10.36488/cmasc.2019.2.119-124>. (in Russian)]
9. OIE. List of antimicrobial agents of veterinary importance, June 2021. Available at: <https://www.oie.int/app/uploads/2021/06/a-oie-list-antimicrobials-june2021.pdf>. Accessed February 27, 2023.
10. WHO Antibiotic Categorization. Available at: <https://aware.essentialmeds.org/list>. Accessed February 27, 2023.
11. Перечень лекарственных препаратов, предназначенных для лечения инфекционных и паразитарных болезней животных. Утвержден приказом Министерства сельского хозяйства от 18 ноября 2021 года N 771. Доступно по: <https://fsvps.gov.ru/rus/fsvps/laws/8442.html>. Ссылка активна на: 27.02.2023г. [Perechen' lekarstvennykh preparatov, prednaznachennykh dlya lecheniya infektsionnykh i parazitarnykh boleznei zhivotnykh. Utverzhden prikazom Ministerstva sel'skogo khozyaystva ot 18 noyabrya 2021 goda N 771. Dostupno po: <https://fsvps.gov.ru/rus/fsvps/laws/8442.html>. Ssylka aktivna na: 27.02.2023g. (in Russian)]
12. Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Available at: <https://mic.eucast.org/search>. Accessed February 27, 2023.

Информация об авторах

Кротова Анастасия Леонидовна — заместитель заведующего отделом пищевой микробиологии, бактериологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Северо-Западной испытательной лаборатории ФГБУ «ВНИИЗЖ», Санкт-Петербург, Россия

Макавичик Светлана Анатольевна — д. в. н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Сухинин Александр Александрович — д. б. н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия

About the authors

Anastasia L. Krotova — Deputy Head of the Department of Food Microbiology, Bacteriology, and Veterinary and Sanitary Expertise, North-Western Testing Laboratory «ARRIAH», St. Petersburg, Russia

Svetlana A. Makavchik — D. Sc. in Veterinary Sciences, Associate Professor of the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia

Aleksandr A. Sukhinin — D. Sc. in Biology, Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia