УДК 579.62

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-347-4-7-11>

Краткий обзор/Brief review

Иванова О.Е.,
Панин А.Н.,
Карабанов С.Ю.,
Макаров Д.А.,
Ахметзянова А.А.,
Гергель М.А.

ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Звенигород-
ское ш., д. 5

Ключевые слова: антибиотикорези-
стентность, бактерии, антибактериальные
препараты, масс-спектрометрия, мульти-
резистентные штаммы

Для цитирования: Иванова О.Е., Па-
нин А.Н., Карабанов С.Ю., Макаров Д.А.,
Ахметзянова А.А., Гергель М.А. Вете-
ринарный мониторинг антимикробной
резистентности в Российской Федерации.
Аграрная наука. 2021; 347 (4): 7–11.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-347-4-7-11>**Конфликт интересов отсутствует**

Olga E. Ivanova,
Alexander N. Panin,
Sergei Y. Karabanov,
Dmitry A. Makarov,
Anna A. Ahmetzyanova,
Maria A. Gergel

Federal State Budgetary Institution «The
Russian State Center for Animal Feed and
Drug Standardization and Quality», Moscow,
Zvenigorodskoe sh., 5

Key words: antibiotic resistance, bacteria,
antibacterial drugs, mass spectrometry,
multi-resistant strains

For citation: Ivanova O.E., Panin A.N.,
Karabanov S.Yu., Makarov D.A.,
Ahmetzyanova A.A., Gergel M.A. Veterinary
monitoring of antimicrobial resistance in the
Russian Federation. Agrarian Science. 2021;
347 (4): 7–11. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-347-4-7-11>**There is no conflict of interests**

Ветеринарный мониторинг антимикробной резистентности в Российской Федерации

РЕЗЮМЕ

В настоящее время по данным ВОЗ число случаев инфицирования человека устойчивыми к антибиотикам патогенными микроорганизмами растет во всех частях света до угрожающих значений; данная проблема представляет одну из самых больших угроз человечеству, приводя к повышенной смертности, удлинению срока госпитализации и повышению экономических затрат на лечение. Мониторинг антибиотикорезистентности бактерий, выделяемых из сырья животного происхождения, проводится во многих странах мира, включая страны Азии, Африки и Южной Америки. ВОЗ был создан при поддержке ФАО и МЭБ открытый интернет-ресурс «Мировая база оценок странами собственных мероприятий в сфере противодействия антибиотикорезистентности» — «Global Database for Antimicrobial Resistance Country Self Assessment». Целью наших исследований явился мониторинг резистентности бактерий, выделенных из сырья и продукции животного происхождения, а также из объектов окружающей среды, к антимикробным препаратам, применяемым в ветеринарии, а также имеющим важное значение для медицины.

Veterinary monitoring of antimicrobial resistance in the Russian Federation

ABSTRACT

Currently according to the WHO, the number of human infections with antibiotic-resistant pathogenic microorganisms is increasing in all parts of the world to alarming levels, this problem poses one of the greatest threats to humanity, leading to increased mortality, prolonged hospitalization and increased economic costs of treatment. Monitoring of antibiotic resistance of bacteria isolated from raw materials of animal origin is carried out in many countries around the world, including countries in Asia, Africa and South America. The WHO with the support of FAO and OIE has created an open Internet resource "Global Database for Antimicrobial Resistance Country Self Assessment". The purpose of our research was to monitor the resistance of bacteria isolated from raw materials and products of animal origin, as well as from environmental objects, to antimicrobial drugs that are used in veterinary medicine and are also of great importance for human medicine.

Поступила: 30 марта
После доработки: 5 апреля
Принята к публикации: 7 апреля

Received: 30 March
Revised: 5 April
Accepted: 7 April

Введение

Антибиотикорезистентность в настоящее время является одной из самых серьезных угроз мировому здравоохранению. Устойчивость зоонозных бактерий вносит важный вклад в эту проблему.

Антибиотики продуцируют бактерии, грибы, реже — другие организмы. К наиболее важным для медицины группам антибиотиков относятся: пенициллины, цефалоспорины, тетрациклины, амфениколы, макролиды, аминогликозиды, полимиксины, карбапенемы, гликопептиды и другие [1]. В то же время в медицине активно применяются и синтезированные человеком, не имеющие природного аналога группы антибактериальных средств, в том числе фторхинолоны, сульфаниламиды и т.д. [1].

Антимикробные средства активно применяются и в ветеринарии, при этом большинство классов антимикробных средств — общие для ветеринарии и медицины. Так, составленный МЭБ «Список важных для ветеринарии антимикробных средств» содержит представителей почти всех классов препаратов, используемых в медицине [2]. Исключение составляют главным образом канцерогенные препараты, которые в медицине применяются, несмотря на риск, но в животноводстве запрещены из-за наличия их остатков в продуктах питания, например, нитрофураны и нитроимидазолы [3].

С проблемой устойчивости патогенных бактерий к антимикробным средствам человечество столкнулось сразу после начала их практического использования. Так, эффективность первой в истории успешно примененной в 30-х годах XX века группы антимикробных средств — сульфаниламидов, была серьезно поколеблена приобретенной вследствие мутаций устойчивостью, распространяющейся через плазмиды [4]. Еще в 40-х годах, при внедрении в клиническую практику первого антибиотика — пенициллина (был открыт сэром Александром Флемингом в 1929 году) и других антимикробных средств, появившаяся вследствие этого резистентность к ним, в том числе и множественная, оказалась проблемой для лечения пациентов [5].

В первую очередь фактором распространения опасных для людей устойчивых патогенов является применение антибиотиков в медицине, в особенности этот процесс ускоряет неправильное применение антимикробных средств [6].

Но вклад вносит также и чрезвычайно активное применение антимикробных средств в животноводстве.

Существуют многочисленные научные данные, подтверждающие, что применение антибактериальных средств в животноводстве является ключевым фактором появления и распространения в животноводческих хозяйствах антибиотикорезистентных бактерий. Устойчивые патогены могут затем заражать людей тремя основными способами — через прямой контакт с животными, через пищевые продукты животного происхождения и через окружающую среду [7, 8].

Одним из наиболее ярких примеров связи ветеринарного использования антибиотиков и медицинской проблемы антибиотикорезистентности является ситуация с колистином. Этот антибиотик, долгое время редко использовавшийся медициной из-за побочной токсичности, в настоящее время относится к резервным препаратам «последней надежды» и применяется для лечения инфекций, вызываемых нечувствительными к другим антибиотикам патогенами. Между тем, с нача-

ла 80-х годов XX века колистин активно используется в животноводстве, в том числе и в качестве стимулятора роста. Научные исследования говорят о том, что именно ветеринарное применение явилось причиной распространения через плазмиды гена устойчивости к колистину *mcr-1*, который в настоящее время обнаруживается и у людей. При этом частота распространения гена у отбираемых от животных изолятов бактерий прямо пропорциональна объемам применения колистина [9, 10].

Методика

Материалом служили смывы с тушек убойных кур, смывы с производственных объектов, фекалии от кур и продуктивных животных и собственно пищевая продукция. Образцы для исследований отбирали на перерабатывающих предприятиях агропромышленного комплекса по всей территории Российской Федерации.

Отбор образцов осуществляли в соответствии с конкретным стандартом на данную продукцию, соблюдая требования ГОСТ 31904-2012 «Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний». Образцы фекалий отбирали в стерильные пластиковые контейнеры, герметично закрывающиеся крышкой.

Отбор проб смывов осуществляли с использованием пробирок, заполненных физиологическим раствором, отбор проб для исследования их на *Campylobacter spp.* осуществляли с использованием пробирок, заполненных обогатительным бульоном Болтон, а также с использованием eSwab-system, которые представляют собой пробирки, заполненные жидким питательным бульоном AMIES или содержат плотную агаризованную питательную среду, позволяющую в процессе транспортирования сохранить свойства искомым микроорганизмам при их наличии.

Принимая во внимание, что бактерии рода *Campylobacter* весьма чувствительны к замораживанию, отобранные образцы не замораживали и хранили при температуре 3 ± 2 °C и старались анализировать в максимально короткие сроки.

Для мониторинговых исследований в соответствии с рекомендациями МЭБ (Кодекс здоровья наземных животных МЭБ 2015 года, глава 6.7) были выбраны следующие группы микроорганизмов: *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* и *Enterococcus spp.* Среди выбранных одна группа (*Enterococcus spp.*) относится к грамположительным, прочие — к грамотрицательным бактериям.

Выбор антибактериальных препаратов для включения в программу мониторинга был произведен с учетом следующей информации:

- реестра зарегистрированных в Российской Федерации антибактериальных средств для ветеринарного применения (из информационной системы Россельхознадзора ИРЕНА);
- сведений об объемах применения антибактериальных средств на территории Российской Федерации;
- сведений об эффективности применения различных препаратов в отношении выбранных 4 групп микроорганизмов;
- списка ВОЗ, составленного для критически важных для медицины антибиотиков (WHO Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. 4th revision. 2013. Published in 2016);
- списка МЭБ критически важных антибиотиков для ветеринарного применения (OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. 2015);

- наличия для антибактериального средства критериев оценки резистентности по минимальной ингибирующей концентрации согласно методам CLSI и EUCAST;

- наличия коммерчески доступных микропланшетов для антибактериального средства в линейке к микробиологическому анализатору Sensititre.

На основании полученных данных был составлен список отобранных 30 антимикробных средств и изолятов микроорганизмов, которые планируется проанализировать на чувствительность в дальнейшей работе (табл. 1).

В число выбранных 30 препаратов, представленных в таблице 1, включены две комбинации из двух препаратов различных групп каждая, поскольку данные препараты демонстрируют наибольшую эффективность именно при совместном применении. По мере сбора и систематизации данных об антимикробных средствах в изначальный список внесли коррективы, заменив три из указанных в таблице 1 антибактериальных средства — цефкином, тилозин и окситетрациклин — на тигециклин, телитромицин и цефтаролин.

Выделение изолятов проводили микробиологическими методами «золотого стандарта». Морфологические свойства бактерий изучали при помощи окраски по Граму. Микроскопию изолированных колоний кампилобактерий проводили, используя окраску фуксином Циля при разведении физиологическим раствором в соотношении 1:1 не более 10 мин. При наличии грамотрицательных множественных тонких коротких прямых в форме «запятых», «галочек», а также длинных извитых палочек судили о наличии в образцах кампилобактерий.

Идентификацию микроорганизмов осуществляли с помощью иммуно-хроматографического метода с применением тест-системы Singlepath *Campylobacter*, Merck (Германия), биохимического метода с применением тест-систем Api и масс-спектрометрический с помощью масс-спектрометра MALDI Tof MS.

Для определения резистентности микроорганизмов к антибактериальным средствам использовали метод серийных разведений в бульоне с определением минимальных подавляющих концентраций (MIC). Для этого использовали стерильные 96-луночные планшеты.

Таблица 1. Список антибактериальных средств, отобранных для включения в программу мониторинга антибиотикорезистентности

Table 1. List of antibacterial agents selected for inclusion in the antibiotic resistance monitoring program

Антибактериальное средство	Группы микроорганизмов, изоляты которых планируется тестировать на чувствительность. Знак «+» — тестируется, «-» — не тестируется			
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Campylobacter spp.</i>	<i>Enterococcus spp.</i>
Пенициллины				
1. Ампициллин	+	+	—	+
2. Амоксициллин / клавулановая кислота	+	+	—	+
3. Амоксициллин	+	+	—	+
Цефалоспорины				
4. Цефтиофур	+	+	+	+
5. Цефкином	+	+	+	+
6. Цефотаксим	+	+	+	+
Тетрациклины				
7. Окситетрациклин	+	+	+	+
8. Доксидоциклин	+	+	+	+
9. Тетрациклин	+	+	+	+
Аминогликозиды				
10. Гентамицин	+	+	+	+
11. Спектиномицин	+	+	+	—
12. Стрептомицин	+	+	+	+
Макролиды				
13. Эритромицин	—	—	+	+
14. Тилозин	—	—	+	+
Азалиды				
15. Азитромицин	—	—	+	+
Линкозамиды				
16. Клиндамицин	—	—	+	+
Амфениколы				
17. Флорфеникол	+	+	+	+
18. Хлорамфеникол	+	+	+	+
Полимиксины				
19. Колистин	+	+	+	—
Хинолоны				
20. Энрофлоксацин	+	+	+	+
21. Левофлоксацин	+	+	+	+
22. Ципрофлоксацин	+	+	+	+
23. Моксифлоксацин	+	+	+	+
24. Марбофлоксацин	+	+	+	+
Диаминопиримидин				
25. Триметоприм	+	+	—	+
26. Триметоприм/сульфаметоксазол	+	+	—	+
Сульфаниламиды				
27. Сульфадиазин	+	+	—	+
28. Сульфаметоксазол	+	+	—	+
29. Рифампицин	+	+	+	+
30. Ванкомицин	+	+	—	+

Рис. 1. Чувствительность бактерий рода *Salmonella* к антибиотикам
Fig. 1. Sensitivity of the genus *Salmonella* to antibiotics

Рис. 2. Чувствительность бактерий рода *Campylobacter* к антибиотикам
Fig. 2. Sensitivity of the genus *Campylobacter* to antibiotics

Рис. 3. Чувствительность бактерий *E. coli* к антибиотикам
Fig. 3. Sensitivity of the genus *E. coli* to antibiotics

Рис. 4. Чувствительность бактерий *Enterococcus* к антибиотикам
Fig. 4. Sensitivity of the genus *Enterococcus* to antibiotics

Результаты

Результаты проверки чувствительности тестируемых бактерий к антибиотикам представлены на диаграммах 1–4.

Изучение чувствительности к антибиотикам бактерий рода *Salmonella*, выделенным из биоматериала, отобранного от продуктивных животных и птицы, проводилось в соответствии с критериями EUCAST/ECOFF 2020. Диаграмма читается следующим образом: по оси X — антибиотики, по оси Y — процент чувствительных изолятов (S, зеленый цвет), чувствительных при увеличенной экспозиции (ранее данная категория называлась «с промежуточной устойчивостью», I, желтый цвет),

устойчивых (R, красный цвет). N — количество исследованных изолятов.

Исходя из данных, представленных на диаграмме 1, наблюдается устойчивость выделенных изолятов к меропенему, препарату четвертого поколения. Сальмонеллы, устойчивые к меропенему, были выделены от кур. Для кур доля устойчивых к меропенему изолятов составила 4%.

Среди исследованных изолятов *Campylobacter spp.* устойчивость показали 47,5% изолятов — к ципрофлоксацину, 55% — к доксициклину, 60% — к тетрациклину.

На диаграмме 3 отмечается наличие изолятов *E. coli*, устойчивых к меропенему — антибиотику из резервной

Таблица 2. Общее количество мультирезистентных штаммов микроорганизмов

Table 2. Total number of multi-resistant strains of microorganisms

Группа микроорганизмов	Общее количество тестируемых изолятов	Количество мультирезистентных изолятов	%
2020 год			
<i>E. coli</i>	194	90	46
<i>Enterococcus spp.</i>	46	13	28
<i>Salmonella spp.</i>	124	60	53
<i>Campylobacter spp.</i>	44	7	15
2019 год			
<i>E. coli</i>	90	41	45
<i>Enterococcus spp.</i>	46	25	54
<i>Salmonella spp.</i>	124	29	23

группы карбапанемов, не зарегистрированной для применения продуктивным животным на территории Российской Федерации.

На диаграмме 4 видно, что 36% изолятов *Enterococcus* продемонстрировали устойчивость к рифампицину — важному для медицины противомикробному препарату.

Информация о мультирезистентных микроорганизмах, устойчивых одновременно к трем и более классам антимикробных препаратов, представлена в таблице 2.

Исходя из данных, представленных в таблице 2, видно, что количество полирезистентных штаммов микроорганизмов за 2019 год составило 36,5%, а за 2020 — 41,7%, т.е. количество мультирезистентных штаммов увеличилось на 5,2%.

Выводы

Впервые в ветеринарной сфере осуществляется попытка разработки системы гармонизированного с международными требованиями систематического мониторинга антибиотикорезистентности бактерий. В мониторинге охвачены все рекомендуемые МЭБ группы микроорганизмов, основные группы используемых в ветеринарии антимикробных препаратов, различные виды исследуемого материала (как пищевые продукты, так и биоматериал животных) от разных видов продуктивных животных и из разных регионов Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Проблемы резистентности к антибиотикам возбудителей болезней, общих для человека и животных А.Н. Панин и др. Ветеринария и зоотехния: ветеринария. №5, 2017, С. 18. [Problems of resistance to antibiotics of pathogens common to humans and animals A.N. Panin (eds.) Veterinary and Zootechnia: Veterinary. No. 5, 2017, p. 18] (In Russ).
2. Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance in Foodborne Bacteria: Application of a One-Health Approach. Geneva WHO, 2017. P. 40.
3. Reduction of veterinary antimicrobial use in the Netherlands. The Dutch success model D.C. Speksnijder (eds.) Zoonoses Public Health. 2015, Apr; 62 (Suppl 1): P. 79–87.
4. Ginsberg J., Waksman S. Antibiotics J. Ginsberg. S. Waksman American Chemical Society, May 24, 2005. P 56.
5. Critically important antimicrobials for human medicine, 6th

Сравнение изолятов бактерий, выделенных от разных видов продуктивных животных (КРС, свиньи) и от птицы (куры, индейка) показало наиболее высокую устойчивость у изолятов, выделяемых от птицы.

Особую озабоченность вызывают высокие, а в ряде случаев чрезвычайно высокие уровни устойчивости к критически важным для медицины препаратам: колистину, фторхинолонам (в частности, цiproфлоксацину), цефалоспорином последних поколений (в частности — цефотаксиму), азитромицину и рифампицину. В первую очередь у изолятов, полученных от птицы — кур-бройлеров и индейки. Устойчивость к колистину, цiproфлоксацину и цефотаксиму, а также к комбинации цiproфлоксацина и цефотаксима у

изолятов по нашим данным значительно выше, чем в ЕС и США.

Это может говорить об активном применении в отечественном животноводстве вышеуказанных критически важных для медицины препаратов: фторхинолонов, колистина, цефалоспоринов, а также рифампицина и азитромицина. При этом благодаря явлению кросс-резистентности устойчивость к цiproфлоксацину может быть обусловлена применением ветеринарного препарата энрофлоксацина, для медицины значения не имеющего.

Для кампилобактерий следует отметить, что антибиотикорезистентность оказалась ниже, чем в Евросоюзе, в том числе и для цiproфлоксацина. Тем не менее устойчивость к цiproфлоксацину у изолятов, выделенных от птицы, хоть и ниже, чем в Евросоюзе, но все равно остается на высоком уровне.

Проведенные исследования антимикробной резистентности зоонозных бактерий методом серийных разведений в бульоне подтверждены молекулярно-генетическими методами исследований.

Таким образом, дальнейшие усилия по мониторингу и рационализации применения антибиотиков целесообразно сосредоточить на препаратах из группы критически важных для медицины (в т.ч. фторхинолонов, колистина, цефалоспоринов последних поколений), в первую очередь для птицеперерабатывающих предприятий.

revision. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

6. OIE List Of Antimicrobial Agents Of Veterinary Importance, May 2015.

7. Albert T. Sheldon, Jr. Antibiotic resistance: a survival strategy T. Albert Jr. Sheldon Clin Lab Sci. 2005 Summer; 18(3): P. 170–180.

8. Santiago S.M., Maximino A. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective S.M. Santiago, A. Maximino Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2016 May; 8(3): P. 253–267.

9. Antibiotic resistance is ancient Vanessa M. D'Costa [et al.] Nature. 2011 Aug 31; 477(7365): P. 457–461.

10. Antibiotics Overuse in Animal Agriculture: A Call to Action for Health Care Providers A. Martin (eds.) Am J Public Health. 2015 December; 105(12): 2409–2410.