

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМ. ПАСТЕРА»  
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ  
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

*На правах рукописи*

Егорова Светлана Александровна

МОНИТОРИНГ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ  
БАКТЕРИЙ РОДА *SALMONELLA* К АНТИБИОТИКАМ  
С УЧЕТОМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

03.02.03 – микробиология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Научный консультант:  
доктор медицинских наук,  
Кафтырева Л.А.

Санкт-Петербург – 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность темы исследования.....	6
Степень разработанности темы исследования.....	8
Цель исследования.....	10
Задачи исследования.....	10
Научная новизна.....	11
Теоретическая и практическая значимость.....	12
Методология и методы исследования.....	15
Объекты исследования.....	15
Методы исследования.....	17
Бактериологические методы .....	17
1 Идентификация штаммов <i>Salmonella</i> .....	17
2 Определение чувствительности штаммов к антимикробным препаратам..	18
Молекулярно-генетические методы .....	19
1 Детекция генов, кодирующих механизмы резистентности.....	19
2 Детекция хромосомных мутаций, обуславливающих устойчивость к хинолонам.....	23
3 Изучение плазмидного профиля .....	25
4 Трансформация плазмидной ДНК.....	26
5 Полногеномное секвенирование .....	26
6 Филогенетический анализ методом PFGE.....	26
7 Мультилокусное сиквенс-типирование .....	27
8 Филогенетический анализ методом SNP-типирования.....	28
Статистическая обработка данных и программное обеспечение.....	29
Личное участие автора в получении результатов.....	30
Основные положения, выносимые на защиту.....	34
Степень достоверности и апробация результатов исследования.....	34

ГЛАВА 1 Современная популяция <i>Salmonella</i> : чувствительность к клинически значимым антимикробным препаратам, механизмы резистентности и филогенетическая характеристика (обзор литературы)....	37
1.1 <i>Salmonella</i> как актуальный возбудитель острых кишечных инфекций ...	37
1.2 Устойчивость штаммов <i>Salmonella</i> к антимикробным препаратам. Международные клоны высокого риска.....	40
1.3 Механизмы резистентности штаммов <i>Salmonella</i> к клинически значимым антимикробным препаратам и методы их детекции.....	50
1.3.1 Механизмы резистентности к бета-лактамам.....	50
1.3.2 Механизмы резистентности к хинолонам.....	54
1.3.3 Молекулярные методы детекции механизмов резистентности.....	62
1.4 Современные методы субтипирования штаммов <i>Salmonella</i> .....	63
1.5 Возбудитель брюшного тифа: современное состояние проблемы устойчивости, международные клоны высокого риска.....	69
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	89
ГЛАВА 2 Характеристика штаммов <i>Salmonella</i> «не-тифоидных» сероваров, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг.....	89
2.1 Серологические варианты .....	89
2.2 Чувствительность штаммов <i>Salmonella</i> к антимикробным препаратам...	90
2.3 Уровни чувствительности штаммов <i>Salmonella</i> к азитромицину, нитрофурантоину, колистину и тигециклину.....	97
2.4 Распределение штаммов «дикий» популяции <i>Salmonella</i> по МПК цефотаксима, триметоприм/сульфаметоксазола и хлорамфеникола .....	102
2.5 Сравнение показателей устойчивости к антимикробным препаратам штаммов <i>Salmonella</i> , выделенных в Санкт-Петербурге в периоды 2014-2019 гг. и 2002-2005 гг.....	105
ГЛАВА 3 Характеристика чувствительности к антимикробным препаратам штаммов <i>S. Typhi</i> , возбудителя брюшного тифа, выделенных в РФ в 2005-2019 гг .....	107

3.1 Общая характеристика чувствительности штаммов <i>S. Typhi</i> к антимикробным препаратам .....	108
3.2 Уровни чувствительности штаммов <i>S. Typhi</i> к клинически значимым антимикробным препаратам .....	111
3.3 Фенотипы резистентности штаммов <i>S. Typhi</i> .....	115
ГЛАВА 4 Характеристика молекулярных механизмов резистентности штаммов <i>Salmonella</i> к бета-лактамам антимикробным препаратам.....	119
4.1 Механизмы резистентности к аминопеницилинам.....	119
4.2 Механизмы резистентности к цефалоспорином расширенного спектра..	121
ГЛАВА 5 Фенотипическая детекция устойчивости штаммов <i>Salmonella</i> к хинолонам.....	133
5.1 Методические особенности определения чувствительности штаммов <i>Salmonella</i> к хинолонам.....	133
5.2 Анализ фенотипов резистентности штаммов <i>Salmonella</i> к индикаторным хинолонам.....	140
ГЛАВА 6 Характеристика молекулярных механизмов резистентности штаммов <i>Salmonella</i> к хинолонам .....	144
6.1 Характеристика хромосомных мутаций, обуславливающих устойчивость к хинолонам .....	144
6.2 Плазмидоопосредованные механизмы резистентности к хинолонам ....	151
ГЛАВА 7 Механизмы множественной резистентности штаммов <i>S. Typhi</i> ...	156
7.1 Перечень препаратов, рекомендованный для проведения мониторинга чувствительности штаммов <i>Salmonella</i> к антибиотикам.....	159
ГЛАВА 8 Филогенетическая характеристика штаммов <i>S. Typhi</i> , возбудителя брюшного тифа в Российской Федерации в 2005-2019 гг.....	162
8.1 Характеристика методом MLST.....	163
8.2 Филогенетический анализ методом SNP-типирования.....	163
8.3 Филогенетический анализ методом PFGE .....	173
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	178
ВЫВОДЫ.....	210

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	212
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	214
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	215
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	217
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	266
Приложение 1 Профили множественной резистентности штаммов <i>Salmonella</i> , выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг. (абс. число штаммов/ % от числа устойчивых штаммов).....	266
Приложение 2 Устойчивость к антимикробным препаратам штаммов <i>Salmonella</i> , выделенных в Санкт-Петербурге в 2002-2005 гг. и 2014-2019 гг.....	267
Приложение 3 Базы данных, содержащие результаты диссертационного исследования.....	268
Приложение 4 Распределение значений диаметра зоны подавления роста для диска пefлоксацина и МПК ципрофлоксацина штаммов <i>Salmonella</i> (абсолютное число штаммов).....	283
Приложение 5 Распределение значений диаметра зоны подавления роста для диска налидиксовой кислоты и МПК ципрофлоксацина штаммов <i>Salmonella</i> (абсолютное число штаммов) .....	284
Приложение 6 Распределение значений диаметра зоны подавления роста для диска ципрофлоксацина и МПК ципрофлоксацина штаммов <i>Salmonella</i> (абсолютное число штаммов).....	285
Приложение 7 Частота выделения штаммов <i>Salmonella</i> , устойчивых к индикаторным хинолонам .....	286
Приложение 8 Молекулярная характеристика штаммов <i>S. Typhi</i> , выделенных в РФ в 2005-2019 гг., по наличию мутаций в генах <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> и <i>parC</i> .....	287

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Бактерии *Salmonella enterica* spp. *enterica* занимают второе место после *Campylobacter* spp. в «рейтинге» возбудителей инфекций общих для человека и животных и лидируют как возбудители групповых диарейных заболеваний, связанных с пищевыми продуктами. В 2016-2018 гг. в странах Евросоюза около 35% «пищевых» вспышек были вызваны бактериями рода *Salmonella* [310, 313, 314]. Особую актуальность сальмонеллезам придает тот факт, что максимальные показатели заболеваемости, регистрируемые у детей до 4 лет (89,9 на 100 тыс.), в семь раз превышают показатели у взрослых [162].

В последние годы во многих странах отмечен рост доли резистентных к антимикробным препаратам штаммов *Salmonella*, выделенных от людей, животных и из пищевых продуктов [111, 119-121, 314]. В 2017 г. Всемирная организация здравоохранения опубликовала список двенадцати «приоритетных патогенов», антибиотикорезистентность которых представляет угрозу для здоровья человека и требует незамедлительной разработки новых антимикробных препаратов [328]. К группе с высоким уровнем приоритетности отнесены штаммы *Salmonella*, устойчивые к фторхинолонам – препаратам выбора при лечении среднетяжелых, тяжелых и генерализованных форм сальмонеллезов, включая брюшной тиф. По данным национальных систем надзора доля таких штаммов для некоторых сероваров достигает 90,0% [119-121, 311, 312]. Глобальная популяция возбудителя брюшного тифа, включая штаммы *S. Typhi*, завозимые на территорию Российской Федерации, в основном представлена устойчивыми к хинолонам штаммами [124, 221, 262, 274]. Устойчивость штаммов *Salmonella* к антибиотикам ограничивает возможности эффективной терапии сальмонеллезов, что особенно актуально для брюшного тифа, поскольку антибиотикотерапия является необходимым компонентом схемы лечения этого заболевания. Генетические детерминанты резистентности не всегда проявляются фенотипически, поэтому определение чувствительности штаммов *Salmonella* к некоторым классам антимикробных

препаратов требует особых методических подходов, которые заключаются в выборе адекватных методов тестирования, индикаторных препаратов и критериев интерпретации [309].

Широкое использование антибиотиков в сельском хозяйстве способствует эволюции возбудителей, общих для человека и животных путем приобретения детерминант резистентности [330]. Международный туризм, торговля, перемещения животных и птиц, особенности сельского хозяйства и производства пищевых продуктов способствуют глобальному распространению устойчивых штаммов и возникновению эпидемиологически связанных заболеваний в различных регионах мира [94, 168, 249-251]. Многие антибиотики выводятся неизменными из организма человека и животных, попадают в объекты окружающей среды (вода открытых водоемов, почва, сточные воды), где служат селективным фактором, способствующим формированию резистентных штаммов и обмену генетической информацией между представителями различных родов и видов бактерий [330]. Таким образом, проблема устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам включает не только медицинский, но и ветеринарный, сельскохозяйственный и экологический аспекты.

Несмотря на должный уровень контроля безопасности пищевых продуктов и санитарное благополучие, проблема заболеваемости сальмонеллезами по-прежнему остается актуальной для РФ. По данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году», несмотря на тенденцию к снижению уровня заболеваемости (с 35,2 на 100 тыс. населения в 2009 году до 24,22 в 2019 году), сальмонеллезы занимают третье место (после рота- и норовирусной инфекций) в структуре очагов групповой заболеваемости с фекально-оральным механизмом передачи: в 2019 г. зарегистрировано 70 очагов (в 2018 г. – 83) с вовлечением 1829 человек (в 2018 г. – 2025), из которых около 70,0% составляли дети [42]. В 2019 г. Правительством РФ принята Стратегия предупреждения распространения антибиотикорезистентности [54]. В план мероприятий по ее реализации входит обеспечение системного мониторинга резистентности, а также проведение

научно-исследовательских работ по выявлению механизмов, обуславливающих устойчивость ведущих возбудителей инфекционных заболеваний.

### **Степень разработанности темы исследования**

В странах Евросоюза, США и Канаде на национальном и региональном уровнях проводится интегративный надзор за общими для человека и животных возбудителями (включая бактерии рода *Salmonella*). В упомянутых странах в последние годы доли штаммов с так называемой «критически важной» для медицины устойчивостью (к фторхинолонам, цефалоспорином расширенного спектра и с множественной устойчивостью к трем и более классам antimicrobных препаратов) достигают 13,0, 8,0 и 30,0% соответственно [111, 119, 121, 311, 312]. Российский референс-центр по мониторингу за сальмонеллезами (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) ежегодно проводит анализ сероваровой принадлежности штаммов *Salmonella*, выделенных в РФ, а также изучает чувствительность к антибиотикам штаммов, вызывающих групповые заболевания [58, 60]. В научной печати публикуются данные о выборочных исследованиях антибиотикорезистентности штаммов *Salmonella*, проводимых в РФ [2, 8, 9, 10, 19, 26, 29, 37, 55, 64, 67, 69]. Объективная оценка динамики устойчивости штаммов *Salmonella* в РФ осложняется многочисленными изменениями нормативно-методических документов, касающихся определения чувствительности к antimicrobным препаратам. До 2004 г. методика тестирования не была должным образом стандартизирована, отсутствовали единые критерии интерпретации результатов. Принятый в 2004 г. МУК 4.2.1890-04 [36] был основан на рекомендациях организации NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards; в настоящее время – CLSI, Clinical Laboratory Standard Institute). С 2014 г. в РФ действуют Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к antimicrobным препаратам» [20], основанные на рекомендациях Европейского Комитета по определению чувствительности к antimicrobным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST), подходы которого к тестированию некоторых препаратов отличаются от подходов CLSI. Эти факторы частично объясняют значительные



колебания в показателях резистентности, полученных в разные годы российскими исследователями.

В зарубежной литературе широко представлены данные о механизмах резистентности у штаммов *Salmonella* различных сероваров: описаны бета-лактамазы генетических семейств TEM, SHV, CTX-M, AmpC, карбапенемазы и хромосомные мутации, обуславливающие устойчивость к хинолонам [98, 114-116, 125, 127, 149, 165, 207, 220, 235, 243, 246, 278, 293, 295, 299, 301, 303]. В РФ этой теме посвящены единичные исследования, касающиеся главным образом, штаммов серовара *S. Typhimurium*, у которых выявлена продукция бета-лактамаз расширенного спектра генетического семейства CTX-M, а также однонуклеотидные замены в хромосомных генах, обуславливающие устойчивость к хинолонам [26, 27, 151, 218].

Современные молекулярные методы субтипирования позволили выявить циркуляцию во многих странах штаммов *Salmonella* определенных генетических линий, имеющих характерные фенотипы резистентности (так называемые международные клоны высокого риска), данные о циркуляции таких штаммов в РФ отсутствуют [81, 184, 186, 193, 202, 264]. В последние годы в мире выполнено несколько масштабных исследований генома *S. Typhi*, предложены стандартные схемы генотипирования, созданы доступные базы данных, содержащие информацию о штаммах возбудителя брюшного тифа, выделенных в различных регионах мира [287, 332, 333].

Учитывая вышесказанное, представлялось актуальным оценить современное состояние проблемы антибиотикорезистентности штаммов *Salmonella* различных сероваров, выделенных в РФ, используя стандартизованные международные подходы. Для обеспечения достоверности результатов мониторинга необходима разработка и внедрение оптимальных алгоритмов детекции клинически значимых молекулярных механизмов резистентности, которые позволяют прогнозировать эффективность антибиотикотерапии, а также выявлять штаммы *Salmonella* международных клонов высокого риска. Актуальными остаются вопросы характеристики

возбудителя брюшного тифа, штаммы которого завозят на территорию РФ. Для разработки протоколов оптимальной эмпирической терапии брюшного тифа необходима оценка уровней чувствительности штаммов *S. Typhi* к клинически значимым антибиотикам. Учитывая наличие международных баз данных и стандартных схем генотипирования представлялось актуальным установить положение штаммов *S. Typhi*, выделенных на территориях РФ, в глобальной популяции возбудителя брюшного тифа.

### **Цель исследования**

Охарактеризовать чувствительность и молекулярные механизмы устойчивости к антимикробным препаратам штаммов *S. Typhi* и других сероваров в Российской Федерации с учетом тенденций распространения резистентности в глобальной популяции бактерий рода *Salmonella*.

### **Задачи исследования**

1. Изучить чувствительность к антимикробным препаратам штаммов *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров, выделенных в 2014-2019 гг. в Санкт-Петербурге, оценить уровни чувствительности к клинически значимым антибиотикам.
2. Охарактеризовать фенотипы устойчивости к антимикробным препаратам и серовароспецифические различия у штаммов ведущих сероваров.
3. Оценить популяцию штаммов возбудителя брюшного тифа, выделенных в 2005-2019 гг. в Российской Федерации, по уровням чувствительности к клинически значимым антибиотикам и фенотипам устойчивости.
4. Выявить бета-лактамазы, обуславливающие устойчивость штаммов *Salmonella* к бета-лактамным препаратам. Оптимизировать алгоритмы фенотипической детекции механизмов устойчивости к цефалоспорином расширенного спектра и оценить их диагностическую ценность.
5. Изучить молекулярные механизмы приобретенной устойчивости штаммов *Salmonella* к хинолонам фенотипическими и молекулярными методами.
6. Разработать алгоритм фенотипической детекции устойчивости к хинолонам с учетом механизмов резистентности и методических особенностей тестирования штаммов *Salmonella*, оценить его диагностическую ценность.

7. Установить филогенетические связи и оценить положение штаммов *S. Typhi*, выделенных в Российской Федерации, в глобальной популяции возбудителя брюшного тифа.

### Научная новизна

В результате проведенных исследований получены новые данные о частоте выявления в РФ устойчивых к антимикробным препаратам штаммов *Salmonella*, выявлен рост в последние годы клинически значимой резистентности. Установлены значительные отличия устойчивости штаммов *Salmonella*, выделенных в РФ, по сравнению с зарубежными данными: штаммы, устойчивые к хинолонам, выделяли в 5 раз чаще, чем в странах Евросоюза, и в 10 раз чаще, чем в США.

Выявлена высокая частота выделения штаммов *Salmonella*, устойчивых к колистину и тигециклину; установлена вариабельность «дикий» популяции штаммов *Salmonella* в отношении уровня природной чувствительности к некоторым антимикробным препаратам (цефотаксиму, триметоприм/сульфаметоксазолу, хлорамфениколу, нитрофурантоину). Определены уровни чувствительности к антимикробным препаратам, выявлена низкая активность фторхинолонов и высокая активность цефалоспоринов расширенного спектра и азитромицина в отношении штаммов возбудителя брюшного тифа, завезенных в РФ.

Получены новые для РФ данные о продукции штаммами *Salmonella* различных сероваров бета-лактамаз генетических семейств TEM, CTX-M, CMY-2 и хромосомных механизмах резистентности к хинолонам. Выявлены семь вариантов однонуклеотидных замен в генах *gyrA* (Asp87Asn, Ser83Tyr, Ser83Phe, Asp87Tyr, Asp87Gly) и *parC* (Ser80Ile, Glu84Gly) и опосредованный плазмидами механизм резистентности к хинолонам – защита мишени, ассоциированная с геном *qnrS* (патенты на изобретение РФ № 2707548 от 27.11.2019, № 2707925 от 02.12.2019).

Показано, что на территории РФ циркулируют штаммы *Salmonella*, принадлежащие к международным клонам высокого риска (*S. Newport* MDR-AmpC/CMY-2, *S. Kentucky* ST198, *S. Typhi* субклады 4.3.1/гаплотипа H58), фенотип множественной антибиотикорезистентности которых сформировался в результате приобретения хромосомных мутаций и плазмидных генов резистентности.

Установлены филогенетические связи и определено положение «российских» штаммов в глобальной популяции *S. Typhi*. Доказано, что заболевания брюшным тифом в РФ в 2005-2019 гг. были вызваны штаммами международного клона высокого риска («азиатского» клона), устойчивого к хинолонам (субклада 4.3.1/гаплотип H58), что является прогностическим признаком клинической неэффективности эмпирической терапии брюшного тифа фторхинолонами в РФ.

Созданы три базы данных, которые включили уникальные результаты фенотипических и молекулярно-генетических исследований штаммов *Salmonella* (детерминанты резистентности, филогенетические группы, уровни устойчивости к антибиотикам): «*S. Typhi*-Museum: биологические свойства возбудителя брюшного тифа» (свидетельство регистрации № 2019621507), «*S. Typhi*-Museum: молекулярные детерминанты резистентности» (№ 2020620406) и «*Salmonella*-Museum: антибиотикочувствительность и механизмы резистентности» (№ 2019622278).

### **Теоретическая и практическая значимость**

С использованием современных международных стандартизованных методов определения чувствительности к антибиотикам, молекулярно-генетических методов детекции механизмов резистентности и филогенетического анализа установлена высокая частота выявления клинически значимой резистентности к антибиотикам у штаммов *Salmonella* и доказано вовлечение РФ в процесс глобальной экспансии международных резистентных генетических линий *Salmonella*.

Выявлены серовароспецифические различия в показателях резистентности штаммов *Salmonella*, позволяющие теоретически обосновать серовароориентированный подход при проведении мониторинга антибиотикочувствительности сальмонелл.

Научно обоснована необходимость экспертной оценки результатов определения чувствительности штаммов *Salmonella* к антибиотикам в связи со сниженной природной чувствительностью и методическими особенностями тестирования ряда препаратов.

Доказана роль плазмидоопосредованных и хромосомных механизмов в распространении клинически значимой резистентности у штаммов *Salmonella* в РФ: охарактеризованы мобильные генетические элементы и однонуклеотидные замены в хромосомных генах устойчивых штаммов. Установлено, что уровень устойчивости к фторхинолонам у штаммов *Salmonella* обусловлен расположением и количеством мутаций в хромосомных генах ДНК-гиразы (*gyrA*) и топоизомеразы IV (*parC*).

Результаты оценки штаммов *Salmonella*, выделенных в РФ, по уровням чувствительности к антимикробным препаратам (азитромицин, нитрофурантоин, колистин и тигециклин) существенно дополняют характеристику глобальной популяции *Salmonella*, представленную EUCAST.

Разработана научно обоснованная схема комплексной лабораторной диагностики устойчивости штаммов *Salmonella* к хинолонам, которая позволяет достоверно установить уровень и молекулярный механизм устойчивости и расширяет аналитические возможности бактериологических исследований.

Раскрыта эффективность при осуществлении надзора за брюшным тифом метода SNP-типирования, позволяющего проследить в Российской Федерации эволюцию и тенденции антибиотикоустойчивости *S. Typhi*, характерные для глобальной популяции возбудителя брюшного тифа.

Доказано, что при выборе антибиотика для стартовой терапии брюшного тифа необходимо опираться на эпидемиологические данные – информацию о том, из какого региона завезен штамм возбудителя. Установлено, что с высокой вероятностью клинической эффективности в РФ для лечения брюшного тифа могут быть рекомендованы цефалоспорины расширенного спектра и азитромицин.

Обоснован перечень препаратов для тестирования штаммов *Salmonella* в рамках мониторинга чувствительности к антибиотикам, включающего детекцию механизмов резистентности и штаммов международных клонов высокого риска на территории РФ.

Разработанные алгоритмы фенотипической детекции клинически значимых механизмов резистентности повышают достоверность исследования при определении чувствительности штаммов *Salmonella* к антимикробным препаратам

в бактериологических лабораториях и необходимы для выбора адекватной этиотропной терапии сальмонеллезом.

Созданные базы данных позволяют повысить эффективность эпидемиологического надзора за сальмонеллезами, включая брюшной тиф, а также корректировать схемы эмпирической терапии сальмонеллезом в зависимости от данных локального мониторинга. Разработана программа для ЭВМ «Сборно-аналитическая система Энтерус» (№ 2019611524), предназначенная для сбора и анализа информации о биологических свойствах микроорганизмов в рамках повседневной работы бактериологической лаборатории.

Тридцать три штамма *Salmonella* с различными механизмами резистентности депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» как контрольные штаммы для проведения фенотипических и молекулярно-генетических исследований устойчивости к антимикробным препаратам (В-7744, В-8314, В-8452, В-8453, В-8463, В-8464, В-8654, В-8655, В-8861-В8868, В-9042-9058). В международном банке данных GenBank депонированы семь нуклеотидных последовательностей генов *gyrA*, *parC* и *gyrB* штаммов *Salmonella* с различными хромосомными мутациями, обуславливающими устойчивость к препаратам выбора при лечении сальмонеллезом (Accession number: KT955017, MG596303, MK112505 - MK112509).

Рекомендации по скринингу устойчивости к хинолонам у штаммов *Salmonella* и характеристика чувствительности *S. Typhi* к этой группе антимикробных препаратов учтены при разработке российских методических и клинических рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версии 2014, 2015 и 2018 гг.). Результаты работы представлены в материалах Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и двух аналитических обзорах.

Материалы диссертации вошли в учебное пособие «Методические особенности определения чувствительности штаммов *Salmonella* к антимикробным

препаратам» и внедрены в образовательный процесс кафедры медицинской микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» МЗ РФ в дополнительные профессиональные программы повышения квалификации врачей по специальности «Бактериология» (акт внедрения от 08.06.2020).

Разработанные алгоритмы детекции механизмов резистентности внедрены в работу специализированной центральной бактериологической лаборатории СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина» (акт внедрения от 11.06.2020), клиничко-диагностической лаборатории СПб ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 5 им. Н. Ф. Филатова» (акт внедрения от 10.06.2020), бактериологического отдела клиничко-диагностической лаборатории СПб ГБУЗ «Детская городская больница № 17 Святителя Николая Чудотворца» (акт внедрения от 04.06.2020).

### **Методология и методы исследования**

Методология работы спланирована соответственно поставленной цели и задачам исследования. Предметом исследования стали чувствительность к антимикробным препаратам и молекулярные механизмы резистентности штаммов *Salmonella*. Программа исследования включала этапы: подготовительный (сбор штаммов и идентификация), экспериментальный (определение чувствительности, детекция механизмов резистентности, филогенетические исследования), обработки результатов и аналитический. В работе использованы бактериологические, молекулярно-генетические, биоинформатические и статистические методы исследований. Работа одобрена локальным этическим комитетом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (протокол № 27 от 11.12.2015 г.)

### **Объекты исследования**

Штаммы микроорганизмов: 1051 штамм *Salmonella enterica* subsp. *enterica*:

– 746 штаммов *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров, выделенных в 2014-2019 гг., и 6 штаммов *Salmonella*, устойчивых к цефалоспорином расширенного спектра, выделенных в 2008-2013 гг., из проб испражнений лиц в

возрасте от 18 до 80 лет (больные острыми кишечными инфекциями, контактные, декретированные лица). Штаммы были выделены в бактериологических лабораториях ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Санкт-Петербург» Роспотребнадзора и в рамках совместной научно-исследовательской работы поступали в лабораторию кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

– 299 штаммов *S. Typhi* из рабочей коллекции референс-центра по мониторингу возбудителя брюшного тифа (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера), полученные из 22 административных территорий РФ в 2005-2019 гг.: Санкт-Петербурга (200 штаммов), Московской (28), Иркутской (22), Калининградской (10), Ленинградской (7), Воронежской (6), Новгородской (3), Кемеровской (3), Ивановской (2), Архангельской (2), Томской (2), Смоленской (2), Рязанской (1), Тульской (1), Орловской (1), Ульяновской (1), Кировской (1) областей, Красноярского (1) и Хабаровского (1) края, Еврейской автономной области (1), Ханты-Мансийского автономного округа (3), Удмуртской Республики (1). Штаммы выделены из клинического материала больных брюшным тифом (кровь, испражнения, моча, выпот из брюшной полости, секционный материал) в бактериологических лабораториях больниц и ФБУЗ «Центров гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора.

Для выявления тенденций в развитии резистентности у штаммов *Salmonella* в Санкт-Петербурге использовали материалы Северо-Западного регионального центра по сальмонеллезам (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера): результаты изучения 562 штаммов *Salmonella*, выделенных в 2002-2005 гг.

Для внутреннего контроля различных этапов исследования использовали 20 референсных штаммов и референсные нуклеотидные последовательности и геномы энтеробактерий, представленные в GenBank (Таблица 1).



Таблица 1 - Контрольные штаммы и референсные нуклеотидные последовательности, использованные в исследовании

Контролируемый метод	Контрольный штамм/ нуклеотидная последовательность	Источник штамма
Определение чувствительности к антибиотикам: диско-диффузионным (ДДМ) и градиентной диффузии	<i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>E. coli</i> ATCC 35218	Американская коллекция типовых культур (АТСС), коммерческий штамм
Фенотипический тест, подтверждающий продукцию бета-лактамаз молекулярного класса А	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 (SHV-18)	Американская коллекция типовых культур (АТСС), коммерческий штамм
Фенотипический тест, подтверждающий продукцию бета-лактамаз молекулярного класса С	<i>S. Newport</i> (CMY-2)	Коллекция Коллаборативного Центра ВОЗ по сальмонеллам (Институт Пастера, Париж)
Детекция хромосомных мутаций в QRDR-регионе гена <i>gyrA</i>	Нуклеотидная последовательность гена <i>gyrA</i> штамма <i>S. Typhimurium</i> LT2; Нуклеотидная последовательность гена <i>gyrA</i> штамма <i>Salmonella Typhi</i> Ty2	GenBank CP014051.2  GenBank AE014613
Детекция генов, кодирующих различные механизмы резистентности, методом ПЦР	<i>E. coli</i> NCTC13351 ( <i>bla</i> <sub>TEM-like</sub> ) <i>E. coli</i> NEQAS U2A1789 ( <i>bla</i> <sub>SHV-like</sub> ) <i>E. coli</i> NEQAS 8955 ( <i>bla</i> <sub>CTT-like</sub> ) <i>E. coli</i> KS B11819 ( <i>bla</i> <sub>MOX-like</sub> ) <i>E. coli</i> BARN-ESBL-04 ( <i>bla</i> <sub>CTX-M8-like</sub> )	Коллекция Шведского института по контролю заболеваемости  Коллекция Коллаборативного Центра ВОЗ по сальмонеллам (Институт Пастера, Париж)
	<i>S. Nima</i> ( <i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> ) <i>S. Havana</i> 09-2913 ( <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> ) <i>S. Typhimurium</i> 04-7488 ( <i>bla</i> <sub>CTX-M1-like</sub> ) <i>S. Djakarta</i> 04-4335 ( <i>bla</i> <sub>CTX-M2-like</sub> ) <i>Salmonella</i> 1,4,12:i:- 09-1987 ( <i>bla</i> <sub>CTX-M9-like</sub> ) <i>S. Brandenburg</i> 08-1650 (AAC-like) <i>S. Tompson</i> 09-4311 ( <i>qnrA</i> ) <i>S. Montevideo</i> 09-5278 ( <i>qnrB</i> ) <i>S. Concord</i> 09-8390 ( <i>qnrS</i> ) <i>E. coli</i> "Cavaco" ( <i>qnrD</i> )	
Полногеномное секвенирование	Геном штамма <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i> Ty2, complete genome	GenBank AE014613
Определение сиквенс-типа плазмиды рНМС1	Аллели шести локусов плазмиды рНМС1	GenBank FJ183728 - FJ183741
Гель-электрофорез в пульсирующем электрическом поле	<i>S. Braenderup</i> H9812	Коллекция Коллаборативного Центра ВОЗ по сальмонеллам (Институт Пастера, Париж)
Трансформация плазмидной ДНК	<i>E. coli</i> DH10B	

## Методы исследования

### Бактериологические методы

#### 1. Идентификация штаммов *Salmonella*

До проведения исследования штаммы хранили при -70°C в триптиказо-соевом бульоне с добавлением 15% глицерина. Видовую идентификацию проводили по

ферментативной активности в отношении различных субстратов с использованием бактериологического анализатора Vitek 2 Compact (BioMerieux, Франция), а также методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) с использованием системы Microflex LRF (Bruker Daltonics, Германия). Рекомендуемые значения Score  $\geq 2,0$  использовали в качестве критерия достоверной видовой идентификации. Для штаммов *S. Typhi* в соответствии с Методическими рекомендациями «Бактериологическая диагностика брюшного тифа и паратифов А, В и С» [35] определяли ферментативный вариант по способности ферментировать ксилозу и арабинозу, используя диски производства HiMedia (Индия).

Определение антигенной структуры штаммов проводили в реакции агглютинации с сыворотками диагностическими сальмонеллезными адсорбированными к О- и Н-антигенам сальмонелл ПЕТСАЛ производства СПбНИИВС (Россия). Наименования сероваров *Salmonella enterica* spp. *enterica* писали с заглавной буквы прямым печатным шрифтом согласно укороченной номенклатуре, предложенной Коллаборативным Центром ВОЗ по сальмонеллам в схеме “Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars” [87].

## **2. Определение чувствительности штаммов к антимикробным препаратам**

Чувствительность штаммов *Salmonella* к АМП определяли согласно Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» методами диско-диффузионным, градиентных концентраций и последовательных разведений в жидкой среде [20] с использованием агара Мюллера-Хинтон и дисков с антибиотиками производства Oxoid (Великобритания), Е-тестов (bioMerieux, Франция) и MICE-тестов (Oxoid, Великобритания), коммерческих тест-систем MIKROLATEST® SensiLaTest MIC GI и GI (Erba Mannheim) и Sensititre (Thermo Scientific). Для отнесения штаммов к клинической категории чувствительности использовали критерии EUCAST (версия 9.0) [163], для тетрациклина – российских Клинических рекомендаций [20]. Использовали клинические категории чувствительности, введенные EUCAST в 2019 г.: «S» – чувствительный при стандартном режиме дозирования; «I» –

чувствительный при увеличенной экспозиции; «R» – резистентный. При оценке результатов также руководствовались экспертными правилами EUCAST Expert Rules Version 3.1 [158].

При выборе АМП для тестирования руководствовались Европейским протоколом мониторинга резистентности у штаммов *Salmonella* [157]. Список включал препараты, рекомендованные для лечения сальмонеллезов, индикаторные препараты для детекции клинически значимых механизмов резистентности и препараты перспективные в отношении лечения инфекций, вызванных полирезистентными штаммами (Таблица 2). При определении чувствительности штаммов *Salmonella* к хинолонам в тестирование включили три препарата этой группы: налидиксовую кислоту как чувствительный индикатор хромосомной устойчивости (диско-диффузионный метод); пefлоксацин как наиболее чувствительный фторхинолон, рекомендованный EUCAST и Клиническими рекомендациями (диско-диффузионный метод); ципрофлоксацин (метод градиентной диффузии).

В рамках исследования использовали термин «бета-лактамаза расширенного спектра» (БЛРС) в отношении любых бета-лактамаз, обуславливающих устойчивость к аминопенициллинам и ЦРС как молекулярного класса А (называя их «классическими» БЛРС), так и цефалоспорины молекулярного класса С (называя их AmpC-цефалоспорины). Продукцию бета-лактамаз молекулярных классов А и С подтверждали фенотипически согласно руководству EUCAST по детекции механизмов резистентности [309]. Подтверждающие тесты с ингибиторами бета-лактамаз для «подозрительных» штаммов проводили методом комбинированных дисков, используя набор реагентов “ESBL+AmpC Screen Kit”, производства Rosco Diagnostica, Дания) согласно инструкции производителя.

## **Молекулярно-генетические методы**

### ***1. Детекция генов, кодирующих механизмы резистентности***

Бактериальную ДНК для постановки ПЦР выделяли с помощью реагента InstaGen Matrix производства BioRad (США) согласно инструкции производителя.

Таблица 2 – Перечень тестируемых антимикробных препаратов и методы определения чувствительности штаммов *Salmonella*

Класс антимикробных препаратов		Антибиотики данного класса, включенные в исследование	Методы определения чувствительности штаммов	
			<i>Salmonella</i> не-тифоид.	<i>S. Typhi</i>
Бета-лактамы	Аминопенициллины	Ампициллин	ДДМ	ДДМ, МПК <sup>4</sup>
	«Защищенные» бета-лактамы	Амоксициллин/ клавулановая кислота	ДДМ, МПК <sup>1,2</sup>	ДДМ
		Цефтазидим/авибактам	МПК <sup>1,2</sup>	но
		Цефталозан/тазобактам	МПК <sup>1,2</sup>	но
	Цефалоспорины расширенного спектра	Цефтазидим	ДДМ	ДДМ
		Цефотаксим	ДДМ, МПК <sup>2-4</sup>	ДДМ, МПК <sup>4</sup>
		Цефепим, цефокситин	ДДМ, МПК <sup>1,4</sup>	но
		Карбапенемы	Меропенем	ДДМ, МПК <sup>1-3</sup>
Эртапенем	МПК <sup>1-3</sup>		но	
Хинолоны	Нефторированные хинолоны	Налидиксовая кислота	ДДМ	ДДМ, МПК <sup>4</sup>
	Фторированные хинолоны	Ципрофлоксацин	МПК <sup>2,3,4</sup>	МПК <sup>4</sup>
		Пефлоксацин	ДДМ	ДДМ
Аминогликозиды		Гентамицин, тобрамицин, амикацин	ДДМ, МПК <sup>1-3</sup>	ДДМ
Тетрациклины	Тетрациклин		ДДМ, МПК <sup>1-3</sup>	ДДМ
	Тигециклин		МПК <sup>2,3</sup>	но
Нитрофураны		Нитрофурантоин	МПК <sup>4</sup>	но
Макролиды		Азитромицин	МПК <sup>4</sup>	МПК <sup>4</sup>
Полимиксины		Колистин	МПК <sup>2,3</sup>	но
Препараты других групп	Триметоприм/сульфаметоксазол		ДДМ, МПК <sup>2-4</sup>	ДДМ, МПК <sup>4</sup>
	Хлорамфеникол		ДДМ, МПК <sup>3,4</sup>	ДДМ, МПК <sup>4</sup>

Примечание: ДДМ - диско-диффузионный метод, МПК - методы определения минимальной подавляющей концентрации, но – не определяли, <sup>1</sup>для БЛРС- продуцирующих штаммов, <sup>2</sup>тест-система Sensititre (Thermo Scientific), <sup>3</sup>тест-система SensiLaTest MIC (Erba Mannheim), <sup>4</sup>метод градиентных концентраций

Поиск генов, кодирующих различные механизмы резистентности, проводили методом ПЦР с электрофоретической или с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации, используя ранее опубликованные праймеры (производства ЗАО Евроген, РФ) и протоколы (Таблицы 3 и 4). У всех штаммов *Salmonella* провели поиск плазмидных генов, ответственных за реализацию механизмов резистентности к хинолонам: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrD*, *qnrC* и *aac-(6')-Ib*. У штаммов *Salmonella*, устойчивых к бета-лактамам согласно клиническим пограничным значениям и критериям скрининга, выявляли *bla*-гены, ответственные за продукцию различных бета-лактамаз:

- широкого спектра TEM-1 и -2, SHV-1, OXA (-1,-4,-30), PSE-1: – 41 штамм, устойчивый к аминопенициллинам;
- классических БЛРС молекулярного класса А генетического семейства CTX-M генетических групп CTX-M1,-2,-8,-9 и -25 – 18 штаммов, устойчивых к цефалоспорином расширенного спектра;
- AmpC-цефалоспориноаз молекулярного класса С генетических семейств ACC, FOX, MOX, DNA, CIT и EBC – 18 штаммов, устойчивых к цефалоспорином расширенного спектра.

Для постановки ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с интеркалирующим красителем SYBR GREEN использовали амплификатор CFX96 (BioRad, США). Готовили универсальную реакционную смесь (10 µl): SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, США) – 5 µl; по 0,4 µl каждого праймера (стоковая концентрация 10 µM); H<sub>2</sub>O – до 9,5 µl общего объема смеси; ДНК – 0,5 µl. Условия ПЦР: начальная инкубация 3 мин. при 98°C; 25 циклов – денатурация 15 сек. при 95°C, отжиг 30 сек. при соответствующей t°C (Таблица 3), элонгация 72°C 10 сек, детекция флуоресценции SYBR Green; финальная элонгация 72°C 2 мин. Специфичность полученных ампликонов оценивали, анализируя кривые плавления продуктов амплификации исследуемых штаммов по сравнению с контрольными в диапазоне температур от 73 до 96°C (0,2°C/5 сек). Каждый контрольный штамм тестировали трехкратно.

Таблица 3 – Мультиплексные ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с интеркалирующим красителем SYBR GREEN: мишени, праймеры, t отжига, использованные в исследовании

Ген-мишень	Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (5' - 3')	t отжига, °C	Источник
Гены бета-лактамаз генетических семейств TEM, SHV, OXA				
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> : варианты TEM, включая TEM-1 и TEM-2	MultiTSO-T_for	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	65	134
	MultiTSO-T_rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> : варианты SHV, включая SHV-1 SHV-2	MultiTSO-S_for	AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC		
	MultiTSO-S_rev	ATCCCGCAGATAAATCACCAC		
<i>bla</i> <sub>OXA</sub> : OXA-1, OXA-4 и OXA-30	MultiTSO-O_for	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG		
	MultiTSO-O_rev	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG		
Гены бета-лактамаз расширенного спектра генетического семейства CTX-M				
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	CTX-M1F	AAAGTGAAAGCGAACCGAATC	58	39
	CTX-M1R	ATCAGCTTATTCATCGCCACG		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	CTX-M2F	TAATGATGACTCAGAGCATTC		
	CTX-M2R	TGTAGTTAACCAGGTCGCTC		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>	CTX-M8F	GATGATGCTAATGACAACGGC		
	CTX-M8R	GCTGAGTTTCACCTAAGGCAC		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	CTX-M9F	CTGTCGAGATCAAGCCTGCC		
	CTX-M9R	GTATTCAGCGTAGGTTTCAGTG		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-25</sub>	CTX-M25F	AAAGTGAAACGCAAAGGGC		
	CTX-M25R	CGCTCAACTCCCCGAATG		
Гены, обуславливающие устойчивость к хинолонам				
<i>qnrA</i>	<i>qnrA</i> -F	ATTTCTCA CGCCAGGATTTG	64	283
	<i>qnrA</i> -R	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA		
<i>qnrB</i>	<i>qnrB</i> -F	GATCGTGAAAGCCAG AAAGG		
	<i>qnrB</i> -R	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i> -F	ACGACATTCGTCAACT GCAA		
	<i>qnrS</i> -R	TAAATTGGCACCTGTAGGC		

Для ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации использовали амплификатор C1000 (BioRad, США). Готовили универсальную ПЦР-смесь (25  $\mu$ l): «Taq M мастер-микс (зеленый)» (Алкор Био, РФ) – 12,5  $\mu$ l; по 0,4  $\mu$ l каждого праймера (стоковая концентрация 10  $\mu$ M); H<sub>2</sub>O – до 24  $\mu$ l общего объема смеси; ДНК – 1,0  $\mu$ l. Условия ПЦР: начальная инкубация 15 мин. при 95°C; 25 циклов – денатурация 40 сек. при 94°C, отжиг 30 сек. при соответствующей  $t^\circ$ C (Таблица 4), элонгация 72°C 10 сек. Амплифицированные фрагменты идентифицировали путем электрофореза в 0,5X растворе TBE, 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия при 120 V в течение 45 мин, визуализировали с использованием системы гель-документирования Gel Doc (BioRad, США). В качестве маркера молекулярного веса использовали ДНК-маркер «100 bp +1,5 Kb +3 Kb» (SibEnzyme, РФ).

У 9 штаммов *S. Typhi* с множественной резистентностью к антибиотикам детекцию генов резистентности проводили, используя сервер Center of Genomic Epidemiology/ сервис ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), вводя данные полногеномного секвенирования штаммов в FASTA формате.

## **2. Детекция хромосомных мутаций, обуславливающих устойчивость к хинолонам**

У 92 штаммов *S. Typhi* проводили поиск хромосомных мутаций в QRDR-регионе (Quinolone Resistance Determining Region) генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*, используя сервис ResFinder сервера Center of Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), вводя данные полногеномного секвенирования штаммов в FASTA формате.

У 39 штаммов *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров и 36 штаммов *S. Typhi* характер мутаций в QRDR-регионе перечисленных генов был установлен путем амплификации и прямого секвенирования внутреннего фрагмента генов *gyrA* и *parC*. Для постановки секвенирующей реакции использовали набор BigDye Terminator v3.1 Matrix Standard Kit (Applied Biosystems, США), праймеры STGYRA1 (для *gyrA*) и STPARC1 (для *parC*) производства ЗАО Евроген, РФ и ранее опубликованные протоколы (Таблица 4) [253].

Таблица 4 – ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации: мишени, праймеры, ампликоны, t отжига, использованные в исследовании

Ген-мишень	Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (5' - 3')	Размер ампликона, bp	t отжига, °C	Источник
Мультиплексная ПЦР: гены цефалоспориноз молекулярного класса C					
<i>bla</i> <sub>ACC</sub> : ACC-1 и ACC-2	MultiCaseACC_for	CACCTCCAGCGACTTGTTAC	346	60	134
	MultiCaseACC_rev	GTTAGCCAGCATCACGATCC			
<i>bla</i> <sub>FOX</sub> : FOX-1 – FOX-5	MultiCaseFOX_for	CTACAGTGC GG GTTGGTTT	162		
	MultiCaseFOX_rev	CTATTTGCGGCCAGGTGA			
<i>bla</i> <sub>МОХ</sub> : MOX-1; MOX-2; CMY-1; CMY-8 – CMY-11; CMY-19	MultiCaseMOX_for	GCAACAACGACAATCCATCCT	895		
	MultiCaseMOX_rev	GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA			
<i>bla</i> <sub>DHA</sub> : DHA-1 и DHA-2	MultiCaseDHA_for	TGATGGCACAGCAGGATATTC	997		
	MultiCaseDHA_rev	GCTTTGACTCTTTCGGTATTCG			
<i>bla</i> <sub>CIT</sub> : LAT-1 – LAT-3; BIL-1; CMY-2 – CMY-7; CMY-12 – CMY-18; CMY-21 – CMY-23	MultiCaseCIT_for	CGAAGAGGCAATGACCAGAC	538		
	MultiCaseCIT_rev	ACGGACAGGGTTAGGATAGY Y = T или C			
<i>bla</i> <sub>EBC</sub> : ACT-1 и MIR-1	MultiCaseEBC_for	CGGTAAGCCGATGTTGCG	683		
	MultiCaseEBC_rev	AGCCTAACCCCTGATACA			
ПЦР с одной мишенью					
<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> : бета-лактамаза PSE-1	PSE-1-F	CGCTTCCCGTTAACAAGTAC	795	50	326
	PSE-1-R	CTGGTTCATTTACAGATAGCG			
<i>qnrD</i> : устойчивость к хинолонам	<i>qnrD</i> fw	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	532	50	118
	<i>qnrD</i> rev	AACAAGCTGAAGCGCCTG			
<i>qnrC</i> устойчивость к хинолонам	<i>qnrC</i> -F	GGGTTGTACATTTATTGAATC	447	50	325
	<i>qnrC</i> -R	TCCACTTTACGAGGTTCT			
<i>aac</i> -(6')-1b устойчивость к хинолонам	<i>aac</i> -(6')-1b-F	TTGCGA TGCTSTATGAGTGGCTA	482	55	259
	<i>aac</i> -(6')-1b-R	CTCGAATGCCTGGC GTGTTT			
<i>gyrA</i> секвенирование по Сэнгеру	STGYRA1	TGTCCGAGATGGCCTGAAGC	455	55	253
	STGYR12-GT	CGTTGATGACTTCCGTCAGGT			
<i>parC</i> секвенирование по Сэнгеру	STPARC1	ATGAGCGATATGGCAGAGCG	420	55	253



Анализ продуктов секвенирующей реакции проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystem 3500 (Applied Biosystems, США). Для оценки качества хроматограмм использовали программное обеспечение Chromas version 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd). Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с помощью программы Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) с референсными последовательностями указанных генов чувствительных к хинолонам штаммов *S. Typhimurium* LT2 (GenBank CP014051.2) и *S. Typhi* Ty2 (GenBank AE014613).

### **3. Изучение плазмидного профиля**

Плазмидную ДНК штамма *S. Newport*, продуцирующего цефалоспориноазу CMY-2, выделяли методом щелочного лизиса [302] и оценивали ее размер, сравнивая с supercoiled DNA ladder (Invitrogen, Groningen, Netherlands) и плазмидами pIP173 (125,8 kb), RP4 (56 kb) и Tr116 (210 kb) из коллекции Коллаборативного Центра ВОЗ по сальмонеллам (Институт Пастера, Париж) путем электрофореза в 0,8% агарозном геле. Плазмидную ДНК подвергали рестрикции рестриктазой PstI (BioLabs) в течение 120 мин на водяной бане при 37°C. Для этого к 17 µl плазмидной ДНК добавляли 2 µl 10-кратного буфера H и 1 µl рестриктазы (40 U/µl). Рестрикционный профиль исследуемой плазмиды сравнивали с профилями известных плазмид штаммов *S. Newport* MDR AmpC/CMY-2 из коллекции Коллаборативного Центра ВОЗ по сальмонеллам путем электрофореза в 1% агарозном геле при 30 V в течение 16 часов.

У 9 штаммов *S. Typhi* с множественной устойчивостью к антимикробным препаратам идентифицировали плазмиды, используя интерактивный сервис PlasmidFinder биоинформационной платформы Center of Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>), вводя данные полногеномного секвенирования штаммов в FASTA формате. Сиквенс-тип плазмид pHCM1 определяли у 8 штаммов, анализируя аллельное разнообразие шести локусов плазмиды [196]. Нуклеотидные последовательности локусов плазмиды, полученные для исследуемых штаммов в рамках полногеномного секвенирования, сравнивали с

последовательностями, депонированными в GenBank (FJ183728 – FJ183741) с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### **4. Трансформация плазмидной ДНК**

Плазмидная ДНК штамма *S. Newport* путем электропорации на аппарате MicroPulser™ (Bio-Rad) была трансформирована в электрокомпетентные клетки *E.coli* DH10B. Для этого 2 µl плазмидной ДНК штамма-донора добавляли к 50 µl электрокомпетентных клеток. После трансформации клетки инкубировали 2 часа при 37°C и засеивали на агар Мюллер-Хинтон с цефотаксимом (4,0 мг/л). После инкубации при 37°C 24 часов отобрали 5 колоний штамма-трансформанта.

#### **5. Полногеномное секвенирование**

Раздел работы выполнен совместно с сотрудниками лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции и молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера д.б.н. Семеновым А.В. и к.б.н. Останковой Ю.В. Секвенирование всего генома было проведено для 92 штаммов *S. Typhi*. Геномную ДНК выделяли из бульонных культур, содержащих 10<sup>9</sup> КОЕ, с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) согласно инструкции производителя. Геномные ДНК-библиотеки готовили из 70 нг ДНК с использованием набора реагентов MiSeq Nextera XT Library Preparation Kit (Illumina, США) согласно протоколу производителя (<https://support.illumina.com/documentation.html>). Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с набором реагентов MiSeq Reagent Kit v3 600 cycles (Illumina, США). Количество полученных прочтений считалось достаточным при достижении глубины прочтений не менее 30x на протяжении не менее 95% хромосомы референс-генома *Salmonella Typhi* Ty2 (GenBank AE014613). Сборку и анализ геномов проводили с помощью CLC Genomics Workbench 8.0 (QIAGEN, США). Полученные контиги использовали для дальнейшего анализа штаммов.

#### **6. Филогенетический анализ методом PFGE**

Макрорестрикционный анализ с разделением продуктов рестрикции в пульсирующем электрическом поле (от англ. pulse field gel electrophoresis, PFGE) выполнен совместно со старшим научным сотрудником лаборатории

идентификации патогенов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера к.м.н. Макаровой М.А. Изучение профилей рестрикции 107 штаммов *S. Typhi* проводили согласно стандартному международному протоколу PulseNet [297] с использованием рестриктазы *XbaI* на оборудовании CHEF Mapper BioRad (США). Для контроля качества проведения исследования использовали штамм *S. Braenderup* H9812 из коллекции Коллаборативного Центра ВОЗ по сальмонеллам (Институт Пастера, Париж). Результаты визуализировали в гель-документирующей системе Gel Doc XR System (Bio-Rad, США) с применением программного обеспечения ImageLab 4.0.1. Графические файлы в формате \*.tif импортировали в сформированную базу данных программы BioNumerix 6.0 (Applied Maths, Бельгия), с использованием инструментов которой осуществляли идентификацию размеров полученных фрагментов рестрикции в паттерне каждого штамма на основании сопоставления их с размерным стандартом штамма *S. Braenderup* H98124. Кластерный анализ результатов выполнен старшим научным сотрудником лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, к.б.н. Кулешовым К.В. по алгоритму UPGMA с расчетом коэффициента сходства Dice, допустимым уровнем отклонения позиции фрагментов 1,5% (tolerance) и оптимизацией 0,5%. Дискриминирующая способность PFGE-типирования определена на основании расчета индекса Хантера-Гастона.

### **7. Мультилокусное сиквенс-типирование**

У 92 штаммов *S. Typhi* оценили полиморфизм семи генов «домашнего хозяйства» (house keeping genes) *Salmonella enterica*: *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA*, *hrA*. Выбор изучаемых генов и отнесение штаммов *S. Typhi* к определенному сиквенс-типу проводили согласно общепринятой международной схеме MLST-типирования *Salmonella enterica*, доступной на серверах EnteroBase (<http://enterobase.warwick.ac.uk>) и Center of Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk>). Загрузку собственных данных, анализ и определение сиквенс-типов проводили посредством сервиса MLST 2.0 биоинформационной платформы Center of Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk>)

(<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>), вводя данные полногеномного секвенирования штаммов в FASTA формате.

### **8. Филогенетический анализ методом SNP-типирования**

(от англ. single nucleotide polymorphism).

Раздел работы выполнен совместно с старшим научным сотрудником лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора к.б.н. Кулешовым К.В. Для реконструкции глобального филогенетического древа проанализировали выборку геномов 1683 штаммов *S. Typhi*, которая включала как штаммы, выделенные в РФ (92 штамма), так и штаммы, секвенированные ранее в различных исследованиях. Полногеномные данные для российских штаммов были получены в ходе нашего исследования, данные для штаммов, выделенных в других странах, взяты из архива European Nucleotide Archive (accession ERP001718) [332]. Выборка характеризовалась широким временным промежутком (с 1905 по 2013 гг) и географией выделения штаммов (63 страны, 6 континентов: Азия, Африка, Северная и Южная Америка, Европа, Австралия и Океания). Для оценки филогенетической структуры популяции возбудителя брюшного тифа использовали метод SNP-типирования (single nucleotide polymorphism, анализ полногеномных данных штаммов путем выявления спектра ортологичных однонуклеотидных вариаций в геноме). Поиск ортологичных SNP проводили с использованием ранее разработанного алгоритма анализа данных [222]. В качестве референс-генома использовали нуклеотидную последовательность штамма *S. Typhi* CT18 (AL513382). Полученная матрица ортологичных SNP была использована для филогенетической реконструкции на основе метода максимального правдоподобия, реализованного в программе RaхML, в качестве модели нуклеотидных замен использовали модель GTR+I. Бутстрап анализ проведен с числом повторов 1000. Визуализацию филогенетического древа проводили в программе Figtree v1.3.1. Для обозначения крупных генетических кластеров использовали понятие «гаплотип», предложенное Roumagnac P. et al. [287]. На втором этапе провели филогенетическую классификацию геномов штаммов по алгоритму анализа полногеномных данных,

предложенному Wong et al. [333], основанному на выявлении только филогенетически значимых однонуклеотидных вариаций, используя программу Genotyphi (<https://github.com/katholt/genotyphi>) и ранее реконструированную филогению [332].

### **Статистическая обработка данных и программное обеспечение**

Полученные данные сгруппированы в сводные таблицы и обработаны с использованием программного пакета Excel 2010. Достоверность различий частот и долей показателей оценена с помощью 95% доверительных интервалов. Различия считались статистически значимыми при отсутствии перекрытия интервалов. Учитывая значительный разброс полученных в работе значений, 95% доверительные интервалы рассчитаны по методу Уилсона. Для биоинформатической обработки результатов использовали следующее программное обеспечение:

- Chromas version 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd) для оценки качества и анализа результатов секвенирования, полученных в формате хроматограмм;
- CLC Genomics Workbench 8.0 (QIAGEN, США) для сборки и анализа геномов;
- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) для детекции хромосомных мутаций и анализа аллельного разнообразия плазмиды рНСМ1 путем сравнения полученных нуклеотидных последовательностей с референсными, представленными в GenBank;
- различные сервисы биоинформатической веб-платформы Center of Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org>): сервис ResFinder для поиска детерминант резистентности (генов и хромосомных мутаций); сервис PlasmidFinder для поиска плазмид; сервис MLST 2.0 для определения сиквенс-типов штаммов *Salmonella* на основе анализа семи генов «домашнего хозяйства»;
- биоинформатическая веб-платформа Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk>) для проведения MLST-типирования и определения сиквенс-типов штаммов *Salmonella* на основе анализа семи генов «домашнего хозяйства»;
- программа BioNumerix 6.0 (Applied Maths, Бельгия) для анализа графических файлов профилей макрорестрикции, полученных методом PFGE, и кластерного анализа;

- программа RaXML (метод максимального правдоподобия) для филогенетической реконструкции матрицы ортологичных SNP и программа Figtree v1.3.1. для визуализации филогенетического древа глобальной популяции *S. Typhi*;
- программа Genotyphi (<https://github.com/katholt/genotyphi>) для филогенетической классификации геномов штаммов *S. Typhi* по алгоритму анализа полногеномных данных, предложенному Wong et al. [333].

Сводная информация об объеме и методах, использованных на различных этапах исследования, представлена в таблице 5.

### **Личное участие автора в получении результатов**

Автором проведено планирование и организация исследований по всем разделам диссертации. Автор лично осуществил сбор и обобщение данных литературы, участвовал в идентификации и определении чувствительности штаммов к антибиотикам, лично провел детекцию механизмов резистентности, разработал алгоритмы фенотипического скрининга резистентности к антибиотикам, обобщил, проанализировал и статистически обработал результаты, сформулировал научные положения, выводы, практические рекомендации, подготовил основные публикации по результатам исследования, оформил патенты на штаммы, создал электронные базы данных, депонировал штаммы и нуклеотидные последовательности. Автор лично провел биоинформатический анализ данных секвенирования для поиска детерминант резистентности, плазмид, MLST-типов штаммов, определения аллельного профиля плазмид.

Выполнены совместно с сотрудниками ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера: генотипирование штаммов методом PFGE – кандидатом медицинских наук Макаровой М.А., подготовка библиотек и полногеномное секвенирование – доктором биологических наук Семеновым А.В. и кандидатом биологических наук Останковой Ю.В. Филогенетический анализ результатов методов PFGE и SNP-типирования выполнен совместно со старшим научным сотрудником ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора кандидатом биологических наук Кулешовым К.В.

Таблица 5 – Этапы, методы и объем исследований

Этап исследования	Метод	Число изученных штаммов
<b>Бактериологические</b>		
Видовая идентификация	Бактериологический анализатор Vitek 2 Compact (BioMerieux, Франция)	1051
	Время-пролетная масс-спектрометрия на приборе Microflex LRF (Bruker Daltonics, Германия)	1051
Идентификация серовара	Реакция агглютинации на стекле с адсорбированными сыворотками к О- и Н-антигенам <i>Salmonella</i>	1051
Определение чувствительности к антимикробным препаратам	Диско-диффузионный метод: ампициллин, амоксициллин/клавулановая кислота, цефтазидим, цефотаксим, меропенем, хлорамфеникол, тетрациклин, триметоприм/сульфаметоксазол, пefлоксацин, налидиксовая кислота, гентамицин, тобрамицин, амикацин	1051
	Метод градиентной диффузии: -ципрофлоксацин -азитромицин -нитрофурантоин -цефокситин -хлорамфеникол, налидиксовая кислота, цефотаксим, ампициллин	1045 666 453 18 (БЛРС+) 299 (S. Typhi)
	Метод последовательных разведений в жидкой среде: тест-системы MIKROLATEST® SensiLaTest MIC GI и GII (Erba Mannheim) и Sensititre (Thermo Scientific): - амоксициллин/клав.кислота, цефтазидим, цефтазидим/авибактам, цефтолазан/газобактам, азтреонам, цефепим, меропенем, эртапенем, ципрофлоксацин, тетрациклин, гента-, тобрамицин, амикацин -колистин -тигециклин -цефотаксим -триметоприм/сульфаметоксазол -хлорамфеникол	18 (БЛРС+) 77 89 355 342 190
	Фенотипические тесты, подтверждающие продукцию бета-лактамаз молекулярных классов А и С: чувствительность к ингибиторам клавулановой кислоте и клоксациллину	18 (БЛРС+)

Продолжение таблицы 5

Этап исследования	Метод	Число изученных штаммов
<b>Молекулярно-генетические</b>		
Детекция генов бета-лактамаз ( <i>bla</i> )	ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с интеркалирующим красителем SYBR GREEN в формате мультиплексной реакции с последующим анализом кривых плавления продуктов амплификации:	
	- TEM-1, 2; SHV-1, OXA-1	41
	- генетических групп CTX-M1,-2,-8,-9, -25	18 (БЛРС+)
	ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации	
	- PSE-1	41
- AmpC-цефалоспориноз генетических семейств ACC, FOX, MOX, DNA, CIT и EBC (в формате мультиплексной реакции)	18 (БЛРС+)	
Детекция генов, ответственных за реализацию механизмов резистентности к хинолонам	ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с интеркалирующим красителем SYBR GREEN в формате мультиплексной реакции с последующим анализом кривых плавления продуктов амплификации: <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i>	1045
	ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации: - <i>qnrC</i> , <i>qnrD</i> , <i>aac-(6')-Ib</i>	
Детекция мутаций в QRDR-регионе генов <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> , <i>parE</i>	Секвенирование по Сенгеру амплифицированных нуклеотидных последовательностей на приборе Applied Biosystem 3500, анализ с использованием программы BLAST	39 ( <i>Salmonella</i> ) 36 ( <i>S. Typhi</i> )
Детекция детерминант резистентности	Анализ данных полногеномного секвенирования с использованием биоинформационной платформы Center of Genomic Epidemiology/сервис ResFinder ( <a href="https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/">https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/</a> )	92 ( <i>S. Typhi</i> )
Полногеномное секвенирование (WGS)	Полногеномное секвенирование на приборе MiSeq с использованием наборов реагентов MiSeq Reagent Kit v2 и Nextera XT (Illumina, США)	92 ( <i>S. Typhi</i> )



Продолжение таблицы 5

Этап исследования	Метод	Число изученных штаммов
Изучение плазмидного профиля	Выделение плазмид методом щелочного лизиса	1 (S. Newport)
	Изучение рестрикционного профиля плазмиды	1 (S. Newport)
	Выявление плазмид на основе анализа данных WGS с использованием биоинформационной платформы Center of Genomic Epidemiology/сервис PlasmidFinder	9 (S. Typhi)
	Определение сиквенс-типа плазмиды pHMC1 путем анализа данных WGS	8 (S. Typhi)
Филогенетический анализ популяции возбудителя брюшного тифа	Гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE)	107 (S. Typhi)
	MLST семи генов «домашнего хозяйства» с использованием интерактивного сервера Center of Genomic Epidemiology/раздел MLST (анализ данных WGS)	92 (S. Typhi)
	SNP- типирование: выявление полного спектра ортологичных однонуклеотидных вариаций в геноме (анализ данных WGS)	92 (S. Typhi)

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Более 60% штаммов *Salmonella* различных сероваров, выделенные в Российской Федерации, устойчивы к антимикробным препаратам, используемым для лечения сальмонеллезов. Выявлены серовароспецифические различия в структуре и спектре резистентности штаммов *Salmonella*, в последнее десятилетие отмечен рост устойчивости к хинолонам и цефалоспорином расширенного спектра.

2. Клинически значимая устойчивость штаммов *Salmonella* в Российской Федерации опосредована хромосомными и плазмидными механизмами. Устойчивость к хинолонам и ее уровень обусловлены разнообразием и сочетанием вариантов однонуклеотидных замен в хромосомных генах *gyrA* и *parC*, устойчивость к бета-лактамам – продукцией плазмидных бета-лактамаз генетических семейств TEM, CTX-M и CMY-2.

3. Детекция молекулярных механизмов резистентности является неотъемлемой частью мониторинга чувствительности *Salmonella* к антибиотикам в рамках эпидемиологического надзора за сальмонеллезом и позволяет выявлять штаммы международных клонов высокого риска: в Санкт-Петербурге обнаружены штаммы *Salmonella* Newport MDR-AmpC/CMY-2 и *Salmonella* Kentucky ST198 с множественной устойчивостью к антибиотикам, обусловленной характерными молекулярными механизмами.

4. Брюшной тиф в Российской Федерации обусловлен штаммами *Salmonella* Turphi глобально распространенного международного клона высокого риска – субклады 4.3.1 (гаплотипа H58) с характерным фенотипом и генотипом резистентности, затрагивающим хинолоны – препараты выбора для лечения брюшного тифа, что отражает тенденции развития устойчивости в эндемичных странах Юго-Восточной Азии.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность полученных результатов исследования обеспечивается репрезентативностью выборок штаммов на всех этапах, достаточным объёмом проведенных исследований. Изучено более 1000 штаммов *Salmonella* различных сероваров, включая 299 штаммов возбудителя брюшного тифа. В работе

использовали широкий спектр современных стандартизованных бактериологических и молекулярно-генетических методов с высокой чувствительностью и специфичностью. Молекулярно-генетические методы включали полногеномное секвенирование (92 штаммов *Salmonella*), секвенирование амплифицированных нуклеотидных последовательностей по Сэнгеру (75 штаммов), методы генотипирования, используемые в международных системах надзора за сальмонеллезом (гель-электрофорез в пульсирующем поле (107 штаммов), мультилокусное сиквенс-типирование и SNP-типирование (92 штамма)). Все исследования проводились с использованием современного сертифицированного оборудования. Филогенетический анализ проведен несколькими международно признанными методами, биоинформатический анализ – с использованием специализированного программного обеспечения и международных баз данных.

Диссертационная работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора «Проблемно ориентированные научные исследования в отрасли эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями на 2016-2020 гг.», утвержденной Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека А.Ю. Поповой 13.01.2016 г., приказ № 5; договор НИР «Совершенствование лабораторной диагностики бактериальных возбудителей диарейных заболеваний. Генетическое разнообразие факторов вирулентности, механизмов резистентности к антимикробным препаратам».

Диссертационная работа апробирована на заседании Ученого совета ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера 4 марта 2020 г. (протокол № 3).

Материалы диссертационной работы представлены на XI съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2017 г.), итоговой конференции по результатам Российско-Гвинейского научно-технического сотрудничества в области изучения эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской Республике в 2015-2017 гг. (Санкт-Петербург, 2017 г.), Российско-Китайском Конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии

и клинической микологии (XX Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2017 г.), X Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2018 г.), международной конференции «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2018 г.), V Конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (Новосибирск, 2018 г.), Российско-Китайском Конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (XXII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2019 г.), Российско-Вьетнамской научно-практической конференции «Актуальные направления и перспективы сотрудничества в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия» (Москва, 2019 г.), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: актуальные проблемы и решения» (Нижний Новгород, 2019 г.), V Национальном Конгрессе бактериологов (Москва, 2019 г.), заседании отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов в Санкт-Петербурге и Ленинградской области (Санкт-Петербург, 2020 г.).

## **ГЛАВА 1 Современная популяция *Salmonella*: чувствительность к клинически значимым антимикробным препаратам, механизмы резистентности и филогенетическая характеристика (обзор литературы)**

### **1.1 *Salmonella* как актуальный возбудитель острых кишечных инфекций**

Бактерии *Salmonella enterica* spp. *enterica* являются ведущим возбудителем острых кишечных инфекций (ОКИ) бактериальной этиологии, уступая первое место *Campylobacter* spp. в тех странах, где налажена лабораторная диагностика кампилобактериоза. Ежегодно в мире возникают 93,8 млн. случаев диарей сальмонеллезной этиологии, из них 155 тыс. заканчиваются летально [237]. В странах Евросоюза (ЕС) в 2018 г. возникло более 90 тыс. случаев сальмонеллезной инфекции (20,4 случая на 100 тыс. населения), по числу случаев заболеваний бактерии рода *Salmonella* занимали второе место после *Campylobacter* spp. в «рейтинге» возбудителей инфекций общих для человека и животных, а также лидировали как возбудители групповых заболеваний (вспышек), связанных с пищевыми продуктами (34,3% всех «расшифрованных» вспышек в ЕС в 2017 г.), обуславливая максимальное число лиц, вовлеченных, госпитализированных и умерших в результате вспышки [310, 313, 314]. Максимальные показатели заболеваемости отмечены в группах детей в возрасте от 0 до 4 лет (89,9 на 100 тыс.), что в семь раз выше, чем у взрослых [162].

В РФ во второй половине 20 века отмечены подъемы заболеваемости сальмонеллезами. В 1960-70 гг. регистрировали внутрибольничные инфекции среди детей раннего возраста, вызванные полирезистентными штаммами *S. Typhimurium*, распространение которых происходило преимущественно с факторами бытовой передачи в стационарах различного профиля. Подъем заболеваемости сальмонеллезами в 1980-90 гг. отмечался во всех возрастных группах населения и был обусловлен штаммами *S. Enteritidis*, основными факторами передачи которых являлись продукты промышленного птицеводства (мясо птицы, яйца и яйцопродукты) [19, 56, 57]. В последние 10 лет заболеваемость сальмонеллезами снижается (с 35,2 на 100 тыс. населения в 2009 г. до 24,2 в 2019 г.), ежегодно регистрируют 30-40 тыс. случаев заболеваний [41, 42]. В 2014-2018 гг. доля

сальмонеллезов в структуре ОКИ установленной этиологии колебалась от 11,1 до 15,1%, у детей до 14 лет – от 7,2 до 9,2% (<https://rosпотребнадзор.ru/activities/statistical-materials/>). По данным некоторых авторов в структуре ОКИ бактериальной этиологии у детей сальмонеллезы составляли от 35,5 до 69,3% [23].

В мире регистрируют вспышки сальмонеллезов, часто приобретающие масштаб международных: в 2017-18 гг. в странах ЕС ежегодно зарегистрировано более 1000 вспышек сальмонеллезной инфекции, общее число заболевших превышало 10 тыс. человек. Ведущим фактором передачи при сальмонеллезных вспышках являются, как правило, яйца и продукты их содержащие, которые обусловили возникновение половины вспышек, а также выпечка (около 20,0% вспышек) [271, 307, 313, 314]. Мясные продукты (говядина, свинина, мясо птиц и продукты из них) служили факторами передачи значительно реже. Некоторые случаи групповых заболеваний возникли вследствие употребления редких для сальмонеллезной инфекции факторов передачи: молочных продуктов и сыра, рыбы, конфет, фруктов, овощей и соков, риса, орехов, специй [89, 110, 139, 141, 168, 194, 300, 313, 314]. По данным Европейского Агентства по пищевой безопасности (EFSA) и Европейского центра по контролю заболеваний (ECDC) в 2017 г. штаммы *Salmonella* обнаруживали в пробах различного продовольственного сырья: сыром мясе птицы (около 5,0%), свинине (1,6%) и мясной продукции из свинины (0,5%), мясе крупного рогатого скота (КРС) и мясных продуктах КРС (около 0,2%), яйцах и яйцепродуктах (0,3%), овощах и семенах (около 1,0%), специях и травах (0,4%), проростках (0,23%) [314].

В РФ несмотря на тенденцию к снижению заболеваемости, сальмонеллезы занимают третье место (после рота- и норовирусной инфекций) в структуре очагов групповой заболеваемости с фекально-оральным механизмом передачи инфекции: в 2019 г. зарегистрировано 70 очагов групповой заболеваемости сальмонеллезом (в 2018 г. – 83) с общим количеством пострадавших 1829 человек (в 2018 г. – 2025), из которых около 70,0% составляли дети до 17 лет [42, 44].

Во всех странах среди большого числа выделяемых сероваров *Salmonella* доминирует с различной частотой серовар *S. Enteritidis* (Таблица 6) [188].

Таблица 6 - Серовары *Salmonella*, выделяемые от людей, по официальным данным ведущих национальных систем надзора за сальмонеллезами

Страны ЕС, 2018 г. <sup>[310, 314]</sup>		США, 2016 г. <sup>[121]</sup>		Канада, 2013 г. <sup>[111]</sup>		РФ, 2017-2018 гг. <sup>[41, 42, 61]</sup>	
Серовары	%	Серовары	%	Серовары	%	Серовары	%
S. Enteritidis	49,9	S. Enteritidis	16,8	S. Enteritidis	24,0	S. Enteritidis	72,0-84,0
S. Typhimurium	13,0	S. Newport	10,1	S. Heidelberg	13,0	S. Typhimurium	2,0-11,7
S. <u>1</u> ,4,[5],12:i:-	8,1	S. Typhimurium	9,8	S. Typhimurium	12,0	S. Infantis	1,3-9,0
S. Infantis	2,3	S. Javiana	5,8	S. Newport	6,0	Другие серовары	7,0-16,0
S. Newport	1,4	S. <u>1</u> ,4,[5],12:i:-	4,7	S. <u>1</u> ,4,[5],12:i:-	5,0		
S. Agona, Kentucky, Derby, Virchow, Stanley	0,7-0,9	S. Infantis	2,7	Другие серовары	40,0		
S. Bovismorbificans, Napoli, Coeln, Java, Chester, Saintpaul, Hadar, Bareilly, Brandenburg	0,3-0,6	S. Muenchen, Montevideo, Braenderup	2,6-2,1				
		S. Tompson, Saintpaul Heidelberg, Oranienburg, Mississippi	1,7-1,1				
		S. Bareilly, Berta, Agona, Paratyphi B (tartrate+), Anatum	0,9-0,6				
Другие серовары	16,9	Другие серовары	30,8				

В странах ЕС штаммы этого серовара вызывали около половины случаев сальмонеллезов, в США – 16,8%, в Канаде – 24,0%. Спектр других сероваров и частота их выделения отличаются в различных регионах мира. В странах ЕС в списке часто выделяемых сероваров лидируют *S. Typhimurium*, «монофазный» вариант *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- и *S. Infantis*. В США высока доля штаммов *S. Newport*, *S. Typhimurium*, *S. Javiana* и *Salmonella* 1,4,[5],12:i:-. В Канаде значительное место в структуре возбудителей сальмонеллезов занимают штаммы серовары *S. Heidelberg* и *S. Typhimurium*, выделяемые практически с одинаковой частотой, а также *S. Newport* и *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- [111, 121, 314]. На распределение различных сероваров в этиологической структуре влияют регистрируемые ежегодно крупные (часто международные) вспышки сальмонеллезов. Так, в 2017 г. в странах ЕС значительное число штаммов *S. Newport* было выделено в результате групповых заболеваний в Соединенном Королевстве, штаммов *S. Agona* – в рамках двух европейских вспышек, одна из которых у детей младшего возраста была связана с употреблением детской молочной смеси [161, 208].

В РФ в этиологической структуре сальмонеллезов у людей длительное время доминировал серовар *S. Typhimurium*, в середине 1980-х гг лидирующие позиции занял серовар *S. Enteritidis* [19, 56, 57]. В последние годы доля *S. Enteritidis* составляет от 72,0 до 84,0%, в тройку лидирующих сероваров также входят *S. Typhimurium* и *S. Infantis* (2,0-11,7% и 1,3-9,0%, соответственно) [28, 41, 42, 58-61]. По данным российского референс-центра по мониторингу сальмонеллезов в 2019 г. от людей выделяли штаммы *Salmonella* 21 серовара, из продовольственного сырья – 27 сероваров. При этом к серовару *S. Enteritidis* относились 81,0% штаммов, выделенных от людей и 52,0% – из продуктов питания и объектов окружающей среды [42].

## **1.2 Устойчивость штаммов *Salmonella* к антимикробным препаратам.**

### **Международные клоны высокого риска**

Антимикробная терапия не рекомендована для лечения неосложненного сальмонеллезного гастроэнтерита легкой и средней тяжести, поскольку она не сокращает длительности симптомов, но в ряде случаев повышает частоту и



длительность бактерионосительства [292]. Современные подходы к лечению диареи сальмонеллезной этиологии предполагают назначение антимикробных препаратов (АМП) при тяжелом течении, генерализованных, внекишечных формах инфекции [3, 7, 11, 66], при среднетяжелом течении у детей до 2 лет, пациентам с тяжелыми сопутствующими состояниями вне зависимости от возраста. В настоящее время рекомендовано использование нитрофуранов, рифаксимины, фторхинолонов (у взрослых), цефалоспоринов расширенного спектра (ЦРС) и азитромицина, а в качестве альтернативных препаратов – триметоприм/сульфаметоксазола, ампициллина, налидиксовой кислоты и хлорамфеникола, в ряде случаев – амикацина и нетилмицина [1, 14, 15, 18, 21, 22, 25, 34, 38, 40, 43, 46-53, 122, 132, 179, 281].

Учитывая неуклонный рост антибиотикорезистентности, у штаммов *Salmonella* необходимо определять чувствительность к АМП как с целью назначения адекватной этиотропной терапии, так и в рамках мониторинга, результаты которого должны учитываться при формировании тактики эмпирической терапии сальмонеллезом. Государственные и межнациональные системы мониторинга, действующие в странах ЕС (EFSA/ECDC), США (National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria, NARMS), Канаде (Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance, CIPARS), направлены на выявление устойчивости штаммов *Salmonella*, выделенных не только от людей, но и из пищевых продуктов, и от сельскохозяйственных животных. В первую очередь осуществляют мониторинг наиболее значимой устойчивости. В Перечне ВОЗ антимикробных препаратов, критически важных для медицинского применения, в группу «самые приоритетные критически важные» включены ЦРС, хинолоны и полимиксины (<https://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-sixth/en/>). Кроме того, проводится надзор за множественной устойчивостью к трем и более классам АМП (multidrug resistance, MDR). В таблице 7 приведены официальные данные о частоте выделения от людей штаммов *Salmonella* с клинически значимой резистентностью.

Таблица 7 - Серовары *Salmonella*, для которых характерна устойчивость к «критически важным» для медицины антимикробным препаратам: доля устойчивых штаммов (%)

Страны ЕС <sup>[311, 312]</sup>		США <sup>[119, 120]</sup>		Канада <sup>[111]</sup>	
Цефалоспорины расширенного спектра					
Всего	1,9	Всего	3,4	Всего	7,8
S. Kentucky	17,1	S. Dublin	71,4	S. Heidelberg	30,1
S. Dublin	3,4	S. Infantis	16,7	S. Newport	7,0
S. Infantis	2,6	S. Saintpaul	11,1	1,4,[5],12:i:-	6,0
S. Typhimurium	2,6	S. Newport	5,6	S. Typhimurium	2,0
1,4,[5],12:i:-	2,2	S. Typhimurium	5,5	S. Enteritidis	0,4
S. Enteritidis	0,3	S. Heidelberg	2,9		
		1,4,[5],12:i:-	1,7		
		S. Enteritidis	0,5		
Фторхинолоны					
Всего	13,0	Всего	6,6	Всего	11,7
S. Kentucky	92,6	S. Dublin	21,4	S. Enteritidis	12,0
S. Infantis	23,4	S. Enteritidis	21,1	S. Typhimurium	2,0
S. Enteritidis	12,3	S. Infantis	20,6	S. Heidelberg	1,0
S. Typhimurium	8,0	1,4,[5],12:i:-	7,4	1,4,[5],12:i:-	2,0
1,4,[5],12:i:-	6,0	S. Hadar	5,3	S. Newport	2,0
		S. Typhimurium	2,6		
		S. Newport	1,6		
Множественная устойчивость к АМП (3 и более классов)					
Всего	28,6	Всего	12,4	Всего	7,8
S. Kentucky	76,3	S. Dublin	58,3	S. Heidelberg	31,0
S. Typhimurium	39,7	1,4,[5],12:i:-	67,8	S. Newport	7,0
1,4,[5],12:i:-	81,4	S. Typhimurium	18,3	1,4,[5],12:i:-	6,0
S. Infantis	39,4	S. Infantis	15,3	S. Typhimurium	2,0
S. Enteritidis	1,6	S. Newport	5,6	S. Enteritidis	0,4
		S. Enteritidis	4,2		

В европейских странах у штаммов *Salmonella*, выделенных от людей, отмечены высокие показатели резистентности к сульфаниламидам (32,8%), тетрациклинам (30,2%) и аминопенициллинам (27,5%), а также множественной устойчивости к АМП (28,6%): около 40,0% штаммов *S. Typhimurium* и 80,0% «монофазной» *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:- имели MDR-фенотип. Выделены несколько штаммов *S. Typhimurium*, сохранившие чувствительность только к карбапенемам.

В целом, доля штаммов *Salmonella*, устойчивых к клинически значимым АМП (фторхинолонам и ЦРС), во всех анализируемых странах была относительно невысока, но выявлены серовары, для которых показатели устойчивости значительно превышали средние. Так, доля штаммов, устойчивых к ЦРС, колебалась от 1,9% в странах ЕС до 7,8% в Канаде, у ведущего серовара *S. Enteritidis* составляла 0,3-0,5%. В тоже время, в странах ЕС у штаммов *S. Kentucky* (входящего в десять ведущих сероваров в этой стране) доля устойчивых к ЦРС превышала 17,0%, у двух штаммов выявлены гены, кодирующие продукцию карбапенемаз. Серовар *S. Dublin* в США более чем на 70,0% представлен такими штаммами, *S. Infantis* – 16,7%, *S. Saintpaul* – 11,1%. В Канаде в популяции штаммов *S. Heidelberg* (серовар, который занимает 2-3 место в структуре сальмонеллезов) более 30,0% штаммов устойчивы к ЦРС.

Несмотря на то, что доля устойчивых к фторхинолонам штаммов колебалась от 6,6% (США) до 13,0% (страны ЕС), у сероваров *S. Dublin*, *S. Enteritidis* и *S. Infantis* в США показатели в три раза превышали средние (20,0%), в странах ЕС практически все штаммы серовара *S. Kentucky* (92,6%) были устойчивы к фторхинолонам, а доля таких штаммов *S. Infantis* превышала 20,0%.

Множественная устойчивость к 3 и более классам АМП выявлена почти у 30,0% штаммов *Salmonella*, выделенных в странах ЕС (28,6%), что значительно превышает их долю в США (12,4%) и Канаде (7,8%). Наиболее характерен MDR-фенотип для штаммов «монофазного» варианта *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- (81,4% штаммов в странах ЕС и 67,8% в США). Такой фенотип также отмечен в странах ЕС у 76,3% штаммов *S. Kentucky*, около 40,0% штаммов *S. Typhimurium* и *S. Infantis*, в США – у 58,3% штаммов серовара *S. Dublin*, в Канаде – 31,0% *S. Heidelberg*.

Обращает на себя внимание тот факт, что в популяции возбудителя появилась резистентность к АМП, которые в настоящее время не используются для лечения сальмонеллезов, но рассматриваются как препараты резерва в отношении панрезистентных штаммов: тигециклину (0,8%) и колистину (4,7%) [314]. Более 90,0% устойчивых к колистину штаммов относились к сероварам *S.*

Enteritidis и S. Dublin, для которых характерна высокая природная толерантность к этому препарату [75, 312]. Устойчивость к азитромицину, который относительно недавно введен в протоколы лечения сальмонеллезов, отмечена в странах ЕС у 2,5% штаммов, в США – около 1,0% [120, 312].

Следует отметить, что в популяции *Salmonella* устойчивость к определенным АМП имеет выраженные серовароспецифические отличия (Таблица 7). Для штаммов серовара S. Enteritidis, ведущего возбудителя сальмонеллезов во всех странах мира, характерна относительно высокая доля устойчивых к фторхинолонам (12,0 – 13,8%), в тоже время доля штаммов, устойчивых к ЦРС, не достигала 1,0%, доля MDR-штаммов колебалась от 0,4 до 4,2%. Серовар S. Typhimurium отличался высокой долей штаммов с множественной резистентностью к АМП (до 40,0% в странах ЕС), при этом доля устойчивых к ЦРС и фторхинолонам невысока (до 4,0 и 8,5%, соответственно). Штаммы серовара S. Infantis характеризовались высокими показателями для всех «критически важных» видов устойчивости: ЦРС (до 6,9%), хинолонам (до 23,4%) и множественной устойчивости (до 40,0%).

Ситуация с устойчивостью *Salmonella* в отдельных странах нередко связана с распространением генетических линий (клонов) сероваров, характеризующихся определенным фенотипом резистентности – так называемых международных клонов высокого риска. Возникновение и эволюция штаммов таких клонов путем накопления детерминант резистентности усугубляется использованием антибиотиков в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве [94, 330]. Во второй половине XX века в Европе циркулировали полирезистентные штаммы S. Typhimurium нескольких фаготипов. Наиболее успешный клон S. Typhimurium DT104 в 1990-е гг. составлял большую часть MDR-популяции *Salmonella* в Европе и США. В конце 2000-х гг. в европейских странах возникло несколько международных вспышек, вызванных штаммами *Salmonella* с антигенной формулой 1,4,[5],12:i:–, которые получили название «монофазный» вариант S. Typhimurium [155]. Установлено, что этот резистентный вариант возник из классического S. Typhimurium благодаря приобретению композитного транспозона,

заменившего жгутиковый оперон. Эти изоляты также приобрели геномный островок, кодирующий устойчивость к некоторым тяжелым металлам, входящим в состав кормовых добавок для свиней. В США монофазный вариант *S. Typhimurium* выделяют от свиней, причем штаммы этого серовара приобрели дополнительную устойчивость к хинолонам и цефалоспорином третьего поколения [94]. Таким образом, в настоящее время *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- распространены глобально, занимают 3-5 место в списке сероваров, часто выделяемых от людей, животных, домашней птицы, кормов и пищевых продуктов, и 70-80,0% штаммов характеризуются множественной устойчивостью к АМП [111, 119, 312-314]. В два последних десятилетия в странах ЕС в основном циркулируют штаммы *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- двух клональных линий [155, 264]. Штаммы первой клональной линии (фаготипа U302), впервые зарегистрированные в Испании в 1997 г., имели фенотип множественной устойчивости, обусловленный серовар-специфической плазмидой. У штаммов второй клональной линии (фаготипов DT193 и 120), которые распространились в нескольких странах ЕС с 2000 г., MDR-фенотип обусловлен уникальным хромосомным островком, включающим гены резистентности. Исследования последних лет, основанные на результатах полногеномного секвенирования (whole genome sequencing, WGS), также выявили доминирование в странах Евросоюза штаммов *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- нескольких генетических линий, относящихся к сиквенс-типам ST19 (и близкородственному ST34) и ST36 [184, 264].

В 1989 г. в Египте возник полирезистентный клон *S. Kentucky* сиквенс-типа ST198, содержащий островок патогенности (SGI) с генами резистентности к ампициллину, стрептомицину, гентамицину, сульфаметоксазолу и тетрациклину, а также три мутации в хромосомных генах *gyrA* и *parC*, обуславливающие устойчивость высокого уровня к фторхинолонам. В 2000-х гг. штаммы клона *S. Kentucky* ST198 с мясом птицы распространились в Северную, Южную и Западную Африку, Центральную Азию, Индию, Европу и Канаду. Различные генетические линии этого клона приобрели дополнительную плазмидопосредованную устойчивость к ЦРС (бета-лактамазы расширенного спектра CTX-M-15,

цефалоспориноза CMY-2), карбапенемам (карбапенемазы OXA-48 и VIM) и азитромицину. Таким образом, большая часть MDR-штаммов *S. Kentucky*, циркулирующих в настоящее время в мире, являются результатом клональной экспансии одной генетической линии, которая приобрела хромосомные гены резистентности около 30 лет назад, а затем продолжала эволюционировать, накапливая дополнительные детерминанты резистентности к современным АМП. В странах ЕС в настоящее время 76,3% штаммов этого серовара обладают множественной резистентностью, а также устойчивость высокого уровня к фторхинолонам (92,6%) и ЦРС (17,1%) [186, 225-227, 236, 276, 311, 312].

С начала 2000-х гг. в странах ЕС от людей, кур из пищевых продуктов выделяют штаммы *S. Mbandaka* ST413, которые продуцируют цефалоспоринозу CMY-2 и имеют плазмидоопосредованную резистентность к хинолонам [202]. В Иране и Швейцарии от людей и из мяса кур выделены штаммы *S. Infantis* генетической линии ST32, которые отличаются множественной устойчивостью к АМП [193, 277].

В США 8,0% штаммов серовара *S. Newport* (третий по частоте выделения) устойчивы к 7 из 9 тестируемых классов антибиотиков, включая ЦРС, и продуцируют цефалоспоринозу CMY-2 (так называемый клон *S. Newport* MDR AmpC/CMY-2) [129]. Большая часть штаммов *S. Dublin* (хозяин-адаптированный для крупного рогатого скота серовар), выделяемых в США в последние годы, характеризуется множественной устойчивостью (91,7%), в том числе к ЦРС (66,7%). Несмотря на незначительную долю этого серовара в структуре сальмонеллезов (0,2%), у 60,0% пациентов заболевание протекает как генерализованная инфекция и требует обязательного назначения АМП [185].

В РФ периодически публикуются результаты исследований, проводимых на различных территориях. Российский референс-центр по мониторингу за сальмонеллезом (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) проводит анализ данных поступающих из различных регионов РФ относительно сероварной принадлежности *Salmonella*, а также проводит исследование штаммов, вызывающих случаи групповой заболеваемости, в

отношении чувствительности к АМП [16, 17, 58-61]. В тоже время, сравнение данных, полученных в разные годы в РФ, между собой и с зарубежными данными, затруднено в связи с произошедшими в последние десятилетия изменениями нормативно-методических документов (МУК 4.2.1890-04, КР) и критериев интерпретации. Кроме того, некоторые российские исследования ограничены выборкой штаммов (выделенные только от детей, или нозокомиальные штаммы, выделенные во время вспышек в медицинских учреждениях). Эти факторы частично объясняют значительные колебания в показателях резистентности, полученных российскими исследователями. Особенные трудности возникают при сравнении показателей чувствительности *Salmonella* к фторхинолонам, поскольку подходы к тестированию этой группы препаратов и критерии интерпретации последние годы менялись неоднократно. По опубликованным данным в различные годы на территориях РФ доля штаммов, устойчивых к ЦРС составляла от 0 до 45,3%, к фторхинолонам – от 0 до 53,6% (Таблица 8) [2, 8-10, 12, 26, 29, 37, 55, 64, 67, 69].

Проблема устойчивости к АМП многих актуальных для медицины микроорганизмов, включая *Salmonella*, напрямую связана с безопасностью пищевых продуктов (мясо птицы, яйца, говядина, свинина, молочные продукты, свежая плодоовощная продукция), которые могут быть фактором передачи резистентных к АМП штаммов (клонов) человеку от сельскохозяйственных животных [115, 235, 311, 312, 329, 330]. Использование АМП в сельском хозяйстве для стимулирования роста животных и птиц запрещено в странах ЕС в 2006 году и жестко регламентировано в США в 2017 году. Однако глобализация торговли пищевыми продуктами, сельскохозяйственными животными и птицей приводит к тому, что нецелевое использование АМП в некоторых частях мира вызывает нежелательные последствия даже в странах с жестким контролем за их использованием [94, 329].

Таблица 8 – Устойчивость к антимикробным препаратам штаммов *Salmonella*, выделенных в Российской Федерации

Серовар (число исследованных штаммов)	Территория	Годы выделения	Доля устойчивых штаммов, %			Ссылка
			ЦРС	НК	ЦИП	
<i>Salmonella</i> spp. (66)	Екатеринбург	1999	1,5	но	0	2
<i>S. Enteritidis</i> (64)	Санкт-Петербург	2010 – 2014	18,8	0	0	8
<i>S. Typhimurium</i> (22)			45,3	0	0	
<i>S. Enteritidis</i> (433)	Москва	2005 – 2008	8,3 – 14,4	46,9	0,5 <sup>2</sup>	37
<i>Salmonella</i> spp. (63)	Пермский край	1987 – 2009	1,6	но	0	69
<i>S. Typhimurium</i> <sup>1</sup> , (88)	Россия	1994 – 2009	100	43,6	0 <sup>2</sup>	26
<i>S. Enteritidis</i> (85)	Дальневосточный и Сибирский ФО	1989 – 2000	но	но	0	10
<i>S. Enteritidis</i> (528)		2003 – 2008	но	но	53,6	
<i>S. Enteritidis</i> (77)		2011 – 2016	0 – 0,4	42,5 – 59,2	0 <sup>2</sup>	
<i>Salmonella</i> spp. (158)	Казань	2007 – 2009	0,85	но	0	67
<i>Salmonella</i> spp.	Красноярский край	2015	2,2	но	11,1	55
<i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> (456)	Смоленск	2012 – 2017	6 – 7,0	но	6,3	9
<i>Salmonella</i> spp. (37)		2017	2,7	но	21,6	12

Примечание: ЦРС – цефалоспорины расширенного спектра, НК – налидиксовая кислота, ЦИП – ципрофлоксацин, но – не определяли;  
<sup>1</sup>штаммы, устойчивые к ЦРС; <sup>2</sup>истинные показатели устойчивости к ципрофлоксацину соответствуют показателям устойчивости к налидиксовой кислоте



По данным некоторых исследований в РФ в ветеринарии и сельском хозяйстве также выделяют штаммы, устойчивые к АМП «критически важным» для медицины [5, 63]. Устойчивость к антибиотикам является также проблемой экологической безопасности: АМП и устойчивые штаммы микроорганизмов находят в сточных водах, особенно вблизи мест их производства и широкого использования (фармацевтические заводы, больницы, сельскохозяйственные фермы) [102]. Такая ситуация определяет необходимость глобального подхода к борьбе с антибиотикорезистентностью, затрагивающего различные экологические ниши и отрасли народного хозяйства на различных уровнях (локальном, национальном, международном).

Таким образом, несмотря на контроль качества пищевых продуктов, благополучие в области коммунальной гигиены, доступность эпидемиологически безопасной питьевой воды, для РФ по-прежнему актуальна проблема ОКИ (в том числе сальмонеллезов), обусловленных пищевым путем передачи, которые нередко протекают в виде групповых заболеваний с большим числом пострадавших. Эффективная антибактериальная терапия сальмонеллезов, направленная на раннее купирование симптомов, предотвращение осложнений, генерализации инфекции и бактериовыделения, осложняется наличием в популяции *Salmonella* штаммов, устойчивых к рекомендованным АМП, причем для некоторых сероваров доля устойчивых штаммов чрезвычайно высока. Объективная оценка ситуации с устойчивостью *Salmonella* в РФ осложняется несовершенным нормативно-методическим обеспечением процедуры определения чувствительности *Salmonella* к АМП. В 2017 г. ВОЗ опубликовала список «приоритетных патогенов», представляющих угрозу для здоровья человека из-за развития устойчивости к антибиотикам. К группе бактерий с высоким уровнем приоритетности отнесены штаммы *Salmonella*, устойчивые к фторхинолонам – препаратам выбора при лечении сальмонеллезов [328]. В РФ доля таких штаммов среди выделенных от людей достигает 50,0 – 60,0% [10].

### **1.3 Механизмы резистентности штаммов *Salmonella* к клинически значимым антимикробным препаратам и методы их детекции**

#### **1.3.1 Механизмы резистентности к бета-лактамным препаратам**

Устойчивость энтеробактерий к бета-лактамным АМП вызвана в большинстве случаев инактивацией антибиотика ферментами бета-лактамазами. Фенотип устойчивости штамма к различным группам бета-лактамов (аминопенициллинам, ЦРС, карбапенемам) зависит от спектра активности продуцируемой бета-лактамазы. По данным национальных систем надзора стран ЕС и США, штаммы *Salmonella*, устойчивые к аминопенициллинам, составляли 29,5 и 12,4% в изученных коллекциях, соответственно [119, 120, 311, 312]. В РФ доля таких штаммов в различных исследованиях составляла от 6,1 до 42,0% [2, 9]. У штаммов энтеробактерий такая устойчивость обусловлена, как правило, продукцией бета-лактамаз широкого спектра (БЛШС) TEM-1,2, SHV-1 или OXA-1 [109]. У большинства штаммов *Salmonella*, устойчивых к аминопенициллинам, обнаружена продукция бета-лактамазы TEM-1, значительно реже – SHV-1, OXA-1 и PSE-1 [119, 172, 177]. Такая устойчивость, как правило, преодолевается «ингибиторозащищенными» пенициллинами (амоксициллин/ клавулановая кислота, ампициллин/сульбактам) и ЦРС (цефотаксим, цефтриаксон, цефиксим, цефепим и др.), поэтому не имеет клинического значения.

В 1980-х гг. в мире стали регистрироваться случаи выделения штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС, причем распространение таких штаммов отмечено даже в странах с низкими доходами, где использование цефалоспоринов ограничено из-за их относительно высокой стоимости. Высокая частота устойчивости к ЦРС характерна для определенных сероваров *Salmonella*: *S. Dublin* (66,7%), *S. Heidelberg* (31,0%), *S. Kentucky* (17,1%), *S. Infantis* (от 2,6 до 6,9%), *Salmonella* 1,4,5,12:i:- (6,0%) [111, 119, 120, 313, 314]. По данным различных авторов в РФ доля штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС, составляла от 0 до 45,3%, и была наиболее характерна для штаммов *S. Typhimurium* [2, 8, 26, 37, 69, 151, 218].

Устойчивость к ЦРС у штаммов энтеробактерий обусловлена продукцией БЛРС молекулярного класса А (чувствительны к классическим ингибиторам - клавулановой кислоте, сульбактаму и тазобактаму), а также цефалоспориноз молекулярного класса С (AmpC) (чувствительны к клоксациллину, не чувствительны к классическим ингибиторам) [109]. Несмотря на то, что наиболее частыми продуцентами БЛРС являются штаммы *E. coli* и *K. pneumoniae*, вызывающие инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), продукция этих бета-лактамаз отмечена и у других клинически значимых видов энтеробактерий. Штаммы *Salmonella* различных сероваров, продуцирующие БЛРС генетических семейств CTX-M, TEM, SHV, OXA и цефалоспоринозу CMY-2, выделяют практически во всех странах Азии, Европы, Северной Америки и Африки как от заболевших людей, так и из пищевых продуктов, и от сельскохозяйственных животных [98, 115, 116, 125, 220, 235, 278]. По данным NARMS в 2015 г. у подавляющего числа исследованных штаммов *Salmonella* выявлены гены *bla*<sub>CMY</sub>, у единичных штаммов – *bla*<sub>SHV</sub> и *bla*<sub>CTX-M</sub> [119]. В Корее доля штаммов, устойчивых к ЦРС, в 2010-2017 гг. выросла с 0 до 25,0%, выделены штаммы, продуцирующие CTX-M79, CTX-M15, CMY-2 [207]. В Швейцарии и Иране в 2010-2015 гг. от заболевших людей и из мяса кур выделены штаммы *S. infantis*, относящиеся к генетической линии ST32, продуцировавшие CTX-M65 [193, 277]. В России с конца 1990-х гг. продукция БЛРС генетической группы CTX-M5 обнаружена у штаммов *S. Typhimurium* [26, 151, 218].

Несмотря на то, что карбапенемы не используются для лечения сальмонеллезных инфекций, в 1998 г. в США был выявлен первый штамм *Salmonella*, продуцирующий карбапенемазу KPC-2. В последние годы устойчивые к карбапенемам штаммы *Salmonella* различных сероваров выделены от людей, диких птиц и из продуктов животного происхождения (свинина, мясо цыплят) в Великобритании, Франции, Германии, Швейцарии, США, Китае, Индии, Пакистане, Австралии, Марокко и Колумбии [165], причем во многих случаях отмечено, что инфицирование людей произошло в странах Индийского субконтинента и Африки. У штаммов *Salmonella* обнаружены карбапенемазы всех

пяти генетических семейств, имеющих высокую клиническую значимость: KPC-2 (*S. Cubana*, *S. Typhimurium* и *S. Schwarzengrund*), OXA-48 (*S. Typhimurium*, *S. Saintpaul*, *S. Kentucky*, *S. Paratyphi B*), металло-бета-лактамазы IMP-4 (*S. Waycross*, *S. Typhimurium*), VIM-1,2 (*S. Infantis*, *S. Kentucky ST198*), NDM-1 (*S. Senftenberg*, *S. Westhampton*, *S. Stanley*, *S. Agona*, *S. Indiana*, *S. Corvallis*) и NDM-5 (*S.1,4,[5],12:i:*) [165, 209, 226, 235].

Широкое распространение мобильных генетических детерминант, кодирующих карбапенемазы, у возбудителей ИСМП (*K. pneumoniae* и *E. coli*) и «выход» таких штаммов за пределы стационаров повысили вероятность их диссеминации в популяции *Salmonella*. В пользу этого предположения говорит тот факт, что штаммы *Salmonella* с определенными карбапенемазами имеют эпидемиологическую связь с регионами, эндемичными по данному виду карбапенемазы у возбудителей ИСМП: так, штаммы *Salmonella*, продуцирующие KPC, выделяли в США и Колумбии, NDM – от пациентов, посещавших страны Индийского субконтинента, OXA-48 – от пациентов, вернувшихся в Европу из стран северной Африки [165]. Эти факты свидетельствуют о необходимости активного скрининга штаммов, продуцирующих карбапенемазы, у людей, посещавших эндемичные страны, для предотвращения их дальнейшего распространения.

В настоящее время EUCAST и CLSI рекомендуют проводить детекцию БЛРС у штаммов энтеробактерий только в рамках инфекционного контроля. Алгоритм исследования включает скрининг «подозрительных» штаммов и дальнейшее подтверждение продукции БЛРС/цефалоспориноз AmpC фенотипическими и молекулярными методами. Учитывая субстратную специфичность бета-лактамаз различных генетических семейств, на этапе скрининга необходимо тестировать два «индикаторных» препарата из группы ЦРС – цефтазидим и цефотаксим [309]. Фенотипические подтверждающие тесты направлены на дифференциацию БЛРС и AmpC путем выявления их чувствительности к специфическим ингибиторам: клавулановой кислоте (для БЛРС) и клоксациллину (для AmpC). В рутинной практике бактериологических лабораторий ввиду отсутствия коммерчески доступного клоксациллина, как правило ограничиваются подтверждением

продукции БЛРС, используя для этого метод двойных дисков (выявление так называемой «пробки шампанского»). Кроме того, возможно использование методов комбинированных дисков (цефалоспоринов с ингибиторами), градиентной диффузии (E-тесты) и микроразведений в бульоне (коммерческие тест-системы) [309]. В настоящее время для фенотипической детекции и дифференциации бета-лактамаз выпускают готовые наборы производства MAST (Великобритания), Rosco (Дания), Liophilchem (Италия).

Учитывая широкий диапазон распределений значений МПК карбапенемов у штаммов-продуцентов карбапенемаз, а также их высокую клиническую значимость, для их достоверной детекции скрининговые значения при тестировании этой группы АМП отличаются от клинических пограничных значений [309]. Несмотря на то, что штаммы считают чувствительными к меропенему, если МПК не превышает 2,0 мг/л (диаметр зоны подавления роста не менее 22 мм), подозрение на продукцию штаммом карбапенемазы возникает уже в том случае, если МПК выше 0,12 мг/л (зона подавления роста < 28 мм). Фенотипические подтверждающие тесты в отношении «подозрительного» штамма основаны на выявлении чувствительности продуцируемой карбапенемазы к различным ингибиторам: бороновой кислоте (для карбапенемаз молекулярного класса А), дипиколиновой кислоте или EDTA (для карбапенемаз класса В, металло-бета-лактамаз), клоксациллину (для цефалоспоринов AmpC). В настоящее время выпускают готовые наборы производства MAST (Великобритания), Rosco (Дания), Liophilchem (Италия), в состав которых входят диски или таблетки, содержащие меропенем и его комбинации с указанными ингибиторами.

Таким образом, определение чувствительности штаммов *Salmonella* к бета-лактамам не вызывает методических затруднений при условии тестирования индикаторных препаратов и постановки подтверждающих тестов. В тоже время подходы к интерпретации полученных результатов различны. EUCAST считает, что используемые в настоящее время критерии интерпретации (клинические пограничные значения) позволяют выявить устойчивость к бета-лактамам у большинства штаммов энтеробактерий, включая *Salmonella*, продуцирующих

различные бета-лактамазы (БЛРС, AmpC, карбапенемазы), поэтому подтверждение продукции БЛРС или карбапенемазы не обязательно и не влияет на категоризацию штамма. В отличие от EUCAST, российские КР рекомендуют выполнять подтверждающие тесты и информировать врача о возможной нечувствительности штамма-продуцента БЛРС (или карбапенемазы) к цефалоспорином и азтреонаму (или карбапенемам), даже если этот штамм формально попадает в категорию «S- чувствительный» [20].

### 1.3.2 Механизмы резистентности к хинолонам

Класс хинолонов включает две основные группы препаратов, отличающихся по структуре и спектру антимикробной активности: нефторированные (налидиксовая кислота и др.) и фторированные хинолоны (ципрофлоксацин, норфлоксацин, пефлоксацин, левофлоксацин и др.). Механизм действия этого класса АМП заключается в блокаде репликации бактериальной ДНК путем ингибирования двух ферментов: ДНК-гиразы и топоизомеразы IV, каждый из этих которых состоит из двух субъединиц (GyrA и GyrB, ParC и ParE, соответственно). Возникновение клинически значимой устойчивости к хинолонам у штаммов энтеробактерий – многофакторный и поэтапный процесс, который обусловлен хромосомными и/или плазмидоопосредованными механизмами. Молекулярные механизмы устойчивости энтеробактерий к хинолонам, выявленные в настоящее время у штаммов *Salmonella*, представлены в таблице 9.

Основным механизмом устойчивости к хинолонам у энтеробактерий, в том числе *Salmonella*, является модификация QRDR-региона ферментов ДНК-гиразы и топоизомеразы IV. QRDR-регион –это высоко консервативный участок субъединицы фермента (и соответствующего гена), отвечающий за связывание с ДНК. У энтеробактерий этот регион включает следующие позиции нуклеотидов: в гене *gyrA* – с 161 по 514 bp, *gyrB* – с 1243 по 1410 bp, *parC* – с 139 по 399 bp, *parE* – с 1348 по 1584 bp [149, 270].

Таблица 9 – Приобретенные молекулярные механизмы устойчивости к хинолонам, описанные у штаммов *Salmonella*

Механизмы устойчивости	Детерминанты резистентности (аминокислотные замены в соответствующих кодонах)	Серовары	Ссылка
<b>Хромосомные: приобретение мутаций в хромосомных генах</b>			
1. Снижение афинности внутриклеточной мишени (комплекс ДНК и ДНК-гиразы/топоизомеразы IV)	<b><i>gyrA</i></b> Ser83→Phe, Tyr, Ala, Thr Asp87→Gly, Asn, Tyr, Lys, Cys	Typhimurium, Enteritidis, Kentucky, Isangi, Concord, Senftenberg, Livingstone, Kissi, Kivu, Paratyphi A, Reading, Hadar, Haifa, Virchow, Typhi	27, 119, 127, 149, 246, 295, 301, 303
	<b><i>gyrB</i></b> Ser464→Ala, Tyr, Phe; Glu466→Asp; Val423→Gly; Asp459→His	Typhimurium, Typhi, Braenderup, Paratyphi A Mikawasima,	119, 246 295, 301
	<b><i>parC</i></b> Ser80→Ile, Phe, Arg, Lys; Thr57→Ser,Ala,Gly; Tyr83→Phe; Glu84 → Gly	Typhimurium, Miami, Kentucky, Agona, Concord, Senftenberg, Braenderup, Hadar, Paratyphi A,	127, 246, 301
	<b><i>parE</i></b> Leu416→Phe, Asp420→Asn	Typhi, Paratyphi A	295
2. Снижение экспрессии поринов внешней мембраны OmpF	<i>ompF</i>	Typhimurium	127, 246
3. Активный эффлюкс хинолонов из клетки (система AcrAB-TolC)	<i>ramR, acrR</i>	Typhimurium, Livingstone, Typhi, Kentucky, Infantis, Hadar	72, 99, 256

Продолжение таблицы 9

Механизмы устойчивости	Детерминанты резистентности	Серовары	Ссылка
<b>Плазмидные: приобретение генов, обеспечивающих:</b>			
1. «Защита» мишени: предотвращение связывания ДНК-гиразы с хинолонами	<i>qnrA</i>	Concord, Enteritidis, Montevideo, Typhimurium, Tompson	117, 119, 243, 284, 293, 299, 301
	<i>qnrB</i>	Enteritidis, Typhimurium, Berta, Mbandaka, Stanley, Saintpaul, Keurmasser, Telelkebir, Kiambu, Aqua, Cubana, Bredeney, Newport, Paratyphi B, Derby	119, 144, 174, 243, 284, 293, 299, 301, 317
	<i>qnrS</i>	Anatum, Bovismorbificant, Stanley, Concord, Corvallis, Enteritidis, Infantis, Typhi, Typhimurium, Tompson, Emek, Montevideo, Give, Saintpaul, Virchow, Virginia, Kentucky	107, 119, 174, 243, 284, 293, 299, 301, 317
	<i>qnrD</i>	Bovismorbificant, Kentucky	118, 299
2. Ферментная инактивация хинолонов	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Typhimurium, Paratyphi B	119, 144, 284, 293, 299, 301, 303, 331
3. Активный эффлюкс хинолонов из клетки	<i>oqxAB</i>	Typhimurium	119, 229, 243, 331

Примечание: Asp – аспарагиновая кислота, Asn – аспарагин, Gly – глицин, Phe – фенилаланин, Ser – серин, Tyr – тирозин, Ala – аланин, Lys – лизин, Arg – аргинин, Glu – глутаминовая кислота, Thr – треонин, Cys – цистин, Ile – изолейцин, Val – валин, His – гистидин, Leu – лейцин



Конформационные изменения в ДНК-гиразе (топоизомеразе), возникающие вследствие хромосомных мутаций в QRDR-регионах перечисленных генов, препятствуют связыванию с хинолонами (механизм резистентности – модификация мишени). У штаммов *Salmonella* со сниженной чувствительностью к хинолонам описаны единичные однонуклеотидные замены в QRDR-регионе гена *gyrA* в кодонах 83 (Ser, серин) и 87 (Asp, аспарагиновая кислота), в результате которых возникают соответствующие аминокислотные замены (Таблица 9). Мутации в других субъединицах ДНК-гиразы или топоизомеразы IV (гены *gyrB*, *parC*, *parE*), а также мутации, приводящие к снижению экспрессии порина внешней мембраны OmpF (ген *ompF*) или повышению экспрессии эффлюксной системы AcrAB-TolC (регуляторные гены *ramR*, *acrR*), описаны у *Salmonella* значительно реже и, как правило, не имеют самостоятельного значения и участвуют в формировании резистентности к хинолонам как дополнительные факторы, повышая уровень устойчивости у штаммов с уже имеющимися мутациями в гене *gyrA* [72, 73, 99, 119, 127, 256].

Помимо хромосомных механизмов, у штаммов *Salmonella* описаны три механизма устойчивости к хинолонам, обусловленные приобретением генов резистентности, локализованных на плаزمиде (plasmid-mediated quinolone resistance, PMQR): защита мишени белками Qnr, системы активного эффлюкса QepA и OqxAB и модификация хинолонов ферментом ацетилтрансферазой AAC(6')-Ib-cr [119, 144, 243, 293, 299, 301, 331]. Гены, обуславливающие эти механизмы, обычно входят в состав трансферабельных элементов на плазмиде, *qnr* гены часто встроены в состав интегронов *sull*-типа и локализованы рядом с генами, обуславливающими устойчивость к другим классам АМП (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>AmpC</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *cat*, *dfrA* и др.). Белки семейства Qnr «защищают» ДНК-гиразу и топоизомеразу IV от связывания с хинолонами. В настоящее время описаны пять семейств Qnr-белков, каждое из которых содержит множество вариантов, отличающихся друг от друга различными аминокислотными заменами: QnrA (варианты A1-A6), QnrB (B1-B19), QnrS (S1-S3), QnrC (C1) и QnrD. Уровень устойчивости, обусловленной этими белками, зависит от уровня их экспрессии в

микробной клетке [284]. Гены, высоко гомологичные генам *qnr*, найдены на хромосомах и плазидах многих свободноживущих водных микроорганизмов (*Shewanella spp.*, *Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.* и др.), а также микроорганизмов, имеющих клиническое значение (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marscescens*, *Enterococcus spp.*, *Bacillus spp.* и др.), что указывает на широкий резервуар генов *qnr* в природе [284]. У штаммов *Salmonella* выявлены гены генетических семейств *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* и *qnrD* [117-119, 174, 243, 293, 299, 317].

У энтеробактерий описан особый вариант фермента аминогликозид-ацетилтрансферазы AAC(6')-Ib-cr, который обуславливает резистентность к тобрамицину, амикацину и канамицину и обладает дополнительной активностью в отношении двух фторхинолонов (ципрофлоксацина и норфлоксацина). В настоящее время описано около 30 вариантов гена *aac(6')-Ib-cr* и соответствующего фермента. Ген *aac(6')-Ib-cr* входит в состав интегронов и часто обнаруживается на IncF11-плазидах, обуславливающих продукцию БЛРС СТХ-M15, а также может быть ассоциирован с другими плазмидоопосредованными генами резистентности к хинолонам (*qnr* и *qepA*) и бета-лактамам (*bla*<sub>СТХ-М</sub>, -SHV, -KPC) [299]. Ген *aac(6')-Ib-cr* обнаружен у штаммов *S. Typhimurium* и *S. Paratyphi B* [119, 144, 293, 299, 331]. Также у штаммов *Salmonella* выявлены плазмидоопосредованные системы эффлюкса *OqxAB* и *QepA*, которые выводят из клетки гидрофильные хинолоны (ципрофлоксацин, энрофлоксацин и норфлоксацин) [119, 243, 301]. PMQR-гены широко распространены у штаммов энтеробактерий во всех странах, тем не менее у штаммов *Salmonella* их обнаруживают намного реже, чем хромосомные механизмы: доля таких штаммов в различных исследованиях составляла от 0,5 до 10,0% для генов *qnr*, менее 1,0% - для *aac(6')-Ib-cr*; система эффлюкса *OqxAB* описана у единичных штаммов *S. Typhimurium* [119, 243, 284].

В настоящее время для характеристики популяции микроорганизма по чувствительности/резистентности к АМП помимо клинических пограничных значений EUCAST использует понятие «эпидемиологическая точка отсечения» (epidemiological cut-off value, ECOFF). Значение ECOFF разграничивает штаммы микроорганизма на «дикий» (wilde type, WT) и «не-дикий» тип (non-wilde type,

non-WT). К «дикому» типу относят штаммы, не приобретшие фенотипически выраженных механизмов резистентности к конкретному АМП, к «не-дикому» типу – штаммы, которые приобрели такие механизмы. Значения ECOFF для каждой конкретной комбинации микроорганизм/антибиотик устанавливают статистическими методами на основании анализа характера распределения МПК антибиотика [163, 176, 318]. Значение ECOFF – это постоянный видовой признак микроорганизма, который не зависит от изменяющихся обстоятельств. ECOFF является объективным критерием, который дает возможность сравнить уровни приобретенной резистентности в ситуациях, когда клинические пограничные значения не установлены, отличались в различных регламентирующих документах (например, EUCAST и CLSI), менялись во времени, а также при сравнении штаммов, выделенных от людей и животных.

Развитие устойчивости к фторхинолонам происходит поэтапно. Для штаммов *Enterobacteriaceae* «дикого» типа МПК ципрофлоксацина не превышает значение ECOFF (0,06 мг/л для штаммов *Salmonella* и *E. coli*; 0,12 мг/л для *Klebsiella* spp. и других условно-патогенных энтеробактерий). Если у штамма вследствие единичной однонуклеотидной замены в хромосомном гене *gyrA* (в кодоне 83 или 87) произошла модификация только одного фермента (ДНК-гиразы) или штамм приобрел плазмидный ген резистентности, то возникает так называемая «устойчивость низкого уровня» к фторхинолонам: МПК ципрофлоксацина повышается в 2-4 раза и достигает 0,12-0,5 мг/л. При этом чувствительность к налидиксовой кислоте зависит от механизма резистентности: при мутациях в хромосомных генах штамм становится высокоустойчивым к налидиксовой кислоте (МПК повышается до 400,0 мг/л), для плазмидоопосредованных механизмов характерен «парадоксальный» фенотип резистентности к хинолонам, когда штамм приобретает устойчивость низкого уровня к фторхинолонам, но остается чувствительным к налидиксовой кислоте (МПК ниже 16,0 мг/л) [284]. В случае возникновения у штамма, уже имеющего устойчивость низкого уровня, модификации второго фермента (топоизомеразы IV) вследствие дополнительных хромосомных мутаций (в гене *parC*) или приобретения плазмидных генов, такой штамм становится высоко

устойчивым к фторхинолонам: МПК ципрофлоксацина превышает клинические пограничные значения и повышается более 1,0 мг/л [93].

Возникновение спонтанных двойных мутаций, которые привели бы к одномоментному развитию устойчивости высокого уровня – редкое генетическое событие (частота от  $10^{-14}$  до  $10^{-16}$ ). Тем не менее, наличие у штамма устойчивости низкого уровня (как хромосомной, так и плазмидоопосредованной) способствует его выживанию и значительно повышает риск возникновения дополнительных хромосомных мутаций в процессе лечения хинолонами [206]. Горизонтальный перенос мобильных детерминант резистентности объясняет частую ассоциацию устойчивости к хинолонам с устойчивостью к другим АМП [284, 299].

Учитывая поэтапный характер развития, фенотипическая детекция устойчивости к хинолонам у штаммов *Salmonella* сопряжена с некоторыми трудностями. Согласно современным рекомендациям EUCAST, CLSI и отечественным КР по определению чувствительности микроорганизмов к АМП, штамм *Enterobacteriaceae* расценивается как чувствительный к ципрофлоксацину при МПК  $\leq 0,25$  мг/л, то есть в ряде случаев штаммы «не-дикого» типа (приобретшие хромосомный или плазмидоопосредованный механизм резистентности) с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам формально будут относиться к категории «S» [20, 128, 163]. В отличие от других энтеробактерий, для штаммов *Salmonella*, прежде всего вызывающих генерализованные инфекции, устойчивость низкого уровня (МПК ципрофлоксацина 0,12-0,5 мг/л) признана клинически значимой. Клиническая неэффективность фторхинолонов (используемых в стандартной дозировке) при лечении брюшного тифа, вызванного такими штаммами *S.Typhi*, подтверждена многочисленными рандомизированными клиническими исследованиями, проведенными во многих странах мира (категория доказательств А) [131, 143, 261, 308]. Аналогичные данные имеются и в отношении других сероваров *Salmonella* (категория доказательств С). В тоже время, некоторые исследователи указывают на эффективность использования максимально высоких доз

современных фторхинолонов длительным курсом в отношении штаммов *S. Typhi* с устойчивостью низкого уровня [216, 315, 335].

Таким образом, у штаммов *Salmonella* необходимо выявлять устойчивость к фторхинолонам не только высокого, но и низкого уровня. Исходя из этого, начиная с 2013 г. EUCAST рекомендовал особый подход к определению чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам, отличающийся от процедуры тестирования штаммов других *Enterobacteriaceae*. Наиболее достоверным показателем для прогнозирования эффективности терапии сальмонеллезной инфекции фторхинолонами является значение МПК ципрофлоксацина (определенное методом последовательных разведений или градиентной диффузии). Для штаммов *Salmonella*, вызывающих инвазивные инфекции (включая *S. Typhi*) используются особые критерии интерпретации для ципрофлоксацина ( $S \leq 0,06$  мг/л;  $R > 0,06$  мг/л), отличающиеся от критериев, используемых для других энтеробактерий ( $S \leq 0,25$  мг/л;  $R > 0,5$  мг/л). Штаммы *Salmonella*, для которых МПК ципрофлоксацина превышает 0,06 мг/л, следует считать устойчивыми ко всем фторхинолонам. Штаммы *Salmonella* с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам (МПК 0,12-0,5 мг/л) сложно выявить при тестировании ДДМ, поскольку диск с ципрофлоксацином не позволяет достоверно выявить устойчивые штаммы. Поэтому, чувствительность к ципрофлоксацину у *Salmonella* следует определять только методами МПК: разведений в агаре/бульоне или градиентной диффузии. Из рекомендаций EUCAST и КР исключены пограничные значения диаметров зон подавления роста для ципрофлоксацина при тестировании штаммов *Salmonella*, поскольку показано, что полученные результаты недостоверны при тестировании штаммов *Salmonella* диско-диффузионным методом [294]. Если в лаборатории нет технической возможности определить МПК ципрофлоксацина, допускается определение чувствительности к фторхинолонам ДДМ. В этом случае в качестве предиктора чувствительности к этой группе препаратов следует использовать диск с пefлоксацином [288, 294]. Целесообразность использования такого подхода подтверждена многими исследователями [291, 323].

Несмотря на описанные фенотипические особенности, присущие различным механизмам резистентности, в некоторых случаях фенотип не позволяет провести четкую дифференциацию между плазмидопосредованными и хромосомными механизмами. PMQR-гены обуславливают устойчивость низкого уровня к хинолонам, так же как и единичные хромосомные мутации в ДНК-гиразе, изменение экспрессии эффлюксных систем или поринов внешней мембраны. «Парадоксальный» фенотип резистентности также не всегда является достоверным маркером PMQR-резистентности. Нередко штаммы с PMQR-генами показывают высокий уровень устойчивости к хинолонам, включая налидиксовую кислоту, из-за сочетания различных механизмов [284].

Учитывая изложенное выше, представлялось актуальным разработать алгоритм, позволяющий максимально достоверно определять чувствительность штаммов *Salmonella* к хинолонам, и оценить его эффективность при тестировании штаммов возбудителя брюшного тифа и «не-тифоидных» сероваров, учитывая выявленные механизмы резистентности.

### **1.3.3 Молекулярные методы детекции механизмов резистентности**

Точное определение механизма резистентности, обуславливающего развитие определенного фенотипа, выявляемого при тестировании микроорганизмов, возможно только с использованием молекулярных методов. В настоящее время предложены различные мультиплексные ПЦР (с электрофоретической или гибридизационно-флуоресцентной детекцией), позволяющие выявить *bla*-гены, кодирующие бета-лактамазы широкого и расширенного спектра генетических семейств TEM, SHV, OXA, PSE, AmpC, карбапенемазы KPC, VIM, IMP, NDM, GES и др., а также плазмидопосредованные гены резистентности к хинолонам [118, 134, 283, 326]. В условиях научно-исследовательских учреждений возможно использование гибридизации с флуоресцентно-мечеными зондами к фрагментам известных генов в формате Luminex или ДНК-чипов. В РФ разработаны для коммерческого использования тест-системы для ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс®MDR MBL-FL» и «АмплиСенс®MDR

КРС/ОХА-48-FL» (Интерлабсервис, РФ) для детекции генов наиболее распространенных карбапенемаз у штаммов или в пробах клинического материала.

У штаммов, устойчивых к хинолонам, первичный скрининг мутаций в QRDR-регионе хромосомных генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* возможно проводить методом ПЦР в режиме реального времени с анализом кривых плавления флуоресцентных зондов с последующим секвенированием амплифицированных фрагментов для установления характера выявленных при первичном скрининге мутаций [27].

Учитывая высокое разнообразие вариантов генов внутри одного семейства, а также возможность сочетания различных механизмов (хромосомных и плазмидоопосредованных) у одного штамма, наиболее полную информацию о резистоме штамма позволяет получить анализ данных полногеномного секвенирования (Whole genome sequencing, WGS) [119, 243]. В настоящее время разработаны открытые биоинформатические платформы, позволяющие самостоятельно анализировать данные WGS и выявить все известные детерминанты резистентности (как мутации в хромосомных генах, так и приобретенные гены) в полностью или частично собранных геномах: например, платформы Comprehensive Antibiotic Research Database (CARD; <http://arpcard.mcmaster.ca>) и Center for Genomic Epidemiology (CGE, <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) [80, 95, 344]. Эти биоинформатические инструменты показали высокую конкордантность выявленных с их помощью генотипов с фенотипами резистентности.

#### **1.4 Современные методы субтипирования штаммов *Salmonella***

Сальмонеллезы занимают лидирующее место в структуре инфекций, передающихся с пищевыми продуктами. Эпидемиологическое расследование вспышек таких заболеваний направлено на выявление связанных случаев заболевания, источника и факторов передачи. Это особенно важно, учитывая сложность современной пищевой цепи, когда отдельные ингредиенты пищевых продуктов могут поступать из различных стран и континентов и пересекаться в несвязанных между собою вспышках. В решении этих задач помогают методы субтипирования возбудителя, обладающие достаточной разрешающей

способностью для дифференциации штаммов, вовлеченных и не вовлеченных во вспышку. Для сравнения данных, полученных как внутри страны, так и на международном уровне, методы субтипирования должны быть хорошо воспроизводимы, а также использовать единую международную номенклатуру.

Лабораторная диагностика сальмонеллезов основана на ферментативной и антигенной характеристике, которые позволяют отнести выделенный штамм к роду *Salmonella* виду *enterica* подвиду *enterica* и определенному серологическому варианту. Для субтипирования *Salmonella* долгое время использовали фенотипические методы: серотипирование (выявление соматических О- и жгутиковых Н-антигенов), фаготипирование (определение чувствительности к набору типовых бактериофагов), установление профиля антибиотикорезистентности.

Несмотря на то, что согласно схеме White-Kauffmann-Le Minor, в настоящее время описано примерно 2600 сероваров *Salmonella* (по комбинации 46 О-антигенов и 85 Н-антигенов), широкое распространение в мире имеют не более 100 сероваров [87, 205]. Недостатками традиционного серотипирования являются трудоемкость, необходимость иметь в лаборатории весь набор адсорбированных сывороток, а также объективные трудности, связанные с иннаглютинабельностью и монофазностью некоторых штаммов. Международный внешний контроль качества показал, что в странах ЕС лаборатории правильно серотипируют около 82,0% штаммов *Salmonella* [187]. В настоящее время разработаны методы «молекулярного серотипирования», выявляющие сероваро-специфические генетические маркеры (гены, ответственные за продукцию О- и Н-антигенов, или другие генетические детерминанты, характерные для конкретных сероваров) в различных форматах: мультиплексная ПЦР или ДНК-гибридизация со специфическими олигонуклеотидными зондами с использованием технологий Luminex и ДНК-микрочипов [100, 106, 108, 145, 170, 181, 191, 192, 343, 347]. Существуют коммерческие тест-системы для идентификации часто встречающихся сероваров *Salmonella*, например, «xMAP Salmonella Serotyping Assay» (Luminex) и «Check&Trace Salmonella» (Check-Points). Тем не менее,



методы серотипирования, основанные на выявлении отдельных серовароспецифических маркеров, не всегда достоверны, так как штамм *Salmonella* может приобрести гены, кодирующие антигенные комплексы, путем горизонтального переноса из генетически неродственного штамма: таким образом ежегодно возникает около 10 штаммов *Salmonella* с новыми антигенными комбинациями [86, 96, 205].

В качестве молекулярной альтернативы серотипированию *Salmonella* предложен и широко используется в международных референс-центрах метод MLST (Multilocus Sequence Typing), основанный на анализе нуклеотидной последовательности семи генов «домашнего хозяйства» [74, 92]. У *Salmonella* описано более 1000 различных сиквенс-типов и выявлено более 140 крупных генетических кластеров, причем для большинства сероваров (96,0%) отмечена выраженная корреляция с генетическим кластером, полученным методом MLST. В тоже время обнаружены некоторые полифилетичные серовары, штаммы которых, несмотря на одинаковую антигенную формулу, относятся к разным генетическим кластерам, и по-видимому, произошли от разных «предшественников» (*S. Newport*, *S. Oranienburg*, *S. Javiana*, *S. Montovideo*, *S. Poona*, *S. Bredeney*). Метод MLST характеризуется высокой воспроизводимостью, позволяет использовать единую номенклатуру. Исследователи могут проводить MLST-типирование на открытых веб-ресурсах Enterobase ([enterobase.warwick.ac.uk](http://enterobase.warwick.ac.uk)), PubMLST ([pubmlst.org](http://pubmlst.org)) и CGE ([cge.cbs.dtu.dk](http://cge.cbs.dtu.dk)), загружая результаты секвенирования исследуемых штаммов. В тоже время, разрешающая способность метода MLST ограничена низкой скоростью накопления нуклеотидных замен в генах «домашнего хозяйства». Как и метод традиционного серотипирования, он мало информативен при расследовании вспышек в условиях глобальной циркуляции нескольких сероваров (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*) [248].

В рамках надзора за инфекциями пищевого происхождения широко используют метод PFGE (pulse field gel electrophoresis), основанный на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов геномной ДНК штамма с разделением фрагментов рестрикции в пульсирующем поле. Метод позволяет

дифференцировать штаммы *Salmonella*, относящиеся к одному серо- и фаготипу. Стандартизованный протокол PFGE приведен в открытом доступе ([www.cdc.gov/pulsenet/participants/international](http://www.cdc.gov/pulsenet/participants/international)). Профили рестрикции штаммов, выделенных в рамках вспышки или при спорадических случаях, сравнивают между собой и с профилями, содержащимися в базах данных, таким образом, метод отражает генетическое разнообразие штаммов в пространстве и времени. Метод валидирован и используется для молекулярной характеристики большинства сероваров *Salmonella* в надзоре за сальмонеллезом в различных странах [159, 167, 230, 348]. Хорошая воспроизводимость метода подтверждается результатами внешней оценки качества: в 2016 г. 90,0% национальных референс-центров в странах ЕС предоставили результаты PFGE высокого качества, пригодные для межлабораторного сравнения [159]. В тоже время, этот метод имеет ограниченные возможности для субтипирования сероваров с высоко консервативным геномом (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* DT104, *S. Typhi*), а также не отражает филогенетические взаимоотношения штаммов, генетически отдаленные изоляты которых могут иметь идентичные PFGE-субтипы. В РФ метод PFGE используют в референс-центре по мониторингу за сальмонеллезом (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва): установлено превалирование на территории РФ в последние годы определенных PFGE-субтипов *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis* [31, 32, 45, 58, 61].

В странах ЕС и США при расследовании вспышек сальмонеллезом, вызванных *S. Typhimurium* и *S. Enteritidis*, широко используется метод MLVA (multiple locus variable number tandem repeat analysis, MLVA), который сравнивает штаммы по числу tandemных повторов в определенных локусах генома. MLVA-профили штаммов меняются достаточно быстро, что позволяет идентифицировать клоны и дифференцировать штаммы при расследовании вспышек [167, 230, 232, 234, 248, 252, 273]. Этот метод имеет большую разрешающую способность, чем PFGE, в тоже время результаты внешней оценки качества в 2016 г. показали, что правильные аллельные профили контрольных штаммов *S. Typhimurium* и *S. Enteritidis* предоставили 40,0 и 70,0% национальных референс-центров в ЕС,

соответственно [159]. Основным недостатком метода является низкая универсальность при типировании *Salmonella* различных сероваров: стандартизованная методика предложена для типирования только двух ведущих сероваров (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*) [159, 201, 223, 251, 296, 307]. Кроме того, VNTR-локусы могут меняться во время хранения и транспортировки штаммов, некоторые локусы расположены в профагах или плазмидах, что может изменить MLVA-профиль штаммов, выделенных во время одной вспышки, и снижает эффективность и достоверность метода при проведении долгосрочных эпидемиологических исследований [167, 200]. В РФ метод MLVA используется в референс-центре по мониторингу за сальмонеллезами и показал высокую эпидемиологическую конкордантность и разрешающую способность при субтипировании штаммов *S. Enteritidis* [30, 31, 32, 68].

В тоже время, высокая клональность некоторых сероваров (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Montovideo*, *S. Heidelberg*, *S. Typhi* и др.), связанная с гомогенностью их генома, не позволяет использовать традиционные молекулярные методы (PFGE, MLVA) для достоверного субтипирования штаммов и требует применения методов, основанных на анализе всего генома возбудителя. В настоящее время методы WGS (whole genome sequencing) внедрены в национальные системы надзора за заболеваниями, передающимися с пищевыми продуктами, в США (CDC, FDA), Великобритании (Public Health England), Дании (Statens serum Institut) и Канаде (Public Health Agency of Canada) [150, 171, 343]. Новейшие методы WGS (например, Oxford Nanopore) позволяют сделать вывод о принадлежности штамма к вспышке в течение 2 часов [166]. При использовании данных WGS для субтипирования существуют два принципиальных подхода: SNP-типирование (выявление спектра ортологичных единичных нуклеотидных вариаций - single nucleotide polymorphism, SNP) и полногеномное MLST (whole genome MLST, wgMLST), основанное на определении набора аллельных вариантов ортологичных генов в масштабе всего генома. Профиль исследуемого штамма получают путем выравнивания нуклеотидных прочтений его генома на полногеномную нуклеотидную

последовательность референс-генома. В результате исследуемый штамм характеризуется индивидуальным SNP- или wgMLST-типом (набором цифр, соответствующих аллельным вариантам генов), который сравнивается в дальнейшем между штаммами [135, 212, 263, 339, 342]. В настоящее время в 16 странах ЕС методы WGS широко используются при расследовании вспышек в рамках надзора за сальмонеллезом как в здравоохранении, так и в секторе пищевой безопасности и ветеринарии [91, 101, 110, 137, 138, 154, 204, 271, 306, 316, 338]. Так, в 2016-2017 гг. в 14 странах ЕС в результате употребления контаминированных яиц из Польши возникла международная вспышка, вызванная штаммом *S. Enteritidis*, принадлежащим к генетической линии, циркулировавшей в Европе с 2012 г. Анализ спектра SNPs показало, что большая часть штаммов, выделенных во время вспышки, принадлежали к двум близко родственным WGS-кластерам 469 и 360, и имели родственные MLVA-профили (в основном 2-9-7-3-2 и 2-9-6-3-2) [249].

Наряду с закрытыми WGS-базами данных возбудителей кишечных инфекций [83], существуют международные открытые платформы: Pathogene Detection (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/>), Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>), CGE (<http://www.genomicpidemiology.org/>), SISTR (<https://lfz.corefacility.ca/sistr-app/>) и SeqSero (<http://www.denglab.info/SeqSero>), которые содержат данные секвенирования, полученные из архива NCBI и лабораторий по всему миру, и позволяют анализировать полногеномные данные на основе различных схем MLST (семи генов «домашнего хозяйства», wgMLST и др.), определять серовар штамма, проводить быстрый скрининг мобильных элементов и генов резистентности [282, 342]. Такие платформы помогают использовать данные WGS для получения *in silico* результатов традиционных методов субтипирования (серовары, MLST-типы, MLVA-профили и др.), тем самым позволяя проводить ретроспективное сравнение баз данных, полученных в разное время.

Серотипирование долгое время остается золотым стандартом классификации *Salmonella* и формирует основу национальных программ эпидемиологического надзора за сальмонеллезом. Очевидно, что в настоящее время возникла

необходимость переосмысления методов субтипирования *Salmonella* и переход к изучению генома штаммов, который не обязательно сопровождается фенотипической экспрессией О- и Н-антигенов, формирующих традиционный серовар *Salmonella*. Благодаря быстрому совершенствованию технологий секвенирования и биоинформатического анализа, методы WGS становятся доступными и наиболее предпочтительными методами субтипирования при проведении эпидемиологического надзора и расследования вспышек сальмонеллезов [82, 203, 285, 289].

### **1.5 Возбудитель брюшного тифа: современное состояние проблемы устойчивости, международные клоны высокого риска**

По оценке ВОЗ ежегодно в мире возникают от 11 до 21 млн. случаев брюшного тифа, из них от 128 до 161 тыс. случаев с летальным исходом (<https://www.who.int/immunization/diseases/typhoid/en/>). Брюшной тиф регистрируется во всех странах, но показатели заболеваемости в различных регионах мира значительно отличаются. Оценка истинного уровня заболеваемости затруднена из-за отсутствия достоверной лабораторной диагностики, особенно в странах Африканского континента. Исследования, проведенные на популяционном уровне, демонстрируют широкую вариацию показателей заболеваемости брюшным тифом (от единичных случаев до сотен на 100 тыс. населения), как на глобальном уровне, так и в пределах отдельных стран [85, 238]. В целом, высокие уровни заболеваемости брюшным тифом (более 100 случаев на 100 тыс. населения) характерны для стран Южной, Центральной и Юго-Восточной Азии, Южной Африки; средние уровни (10-100 случаев на 100 тыс. населения) – для других регионов Азии, Африки, Латинской Америки, Карибских островов и Океании; низкие уровни (менее 10 случаев на 100 тыс. населения) - для стран Европы, Северной Америки, Австралии и Новой Зеландии [130, 217, 238]. Очевидно, что брюшной тиф продолжает оставаться серьезной проблемой здравоохранения в странах, где не решены вопросы коммунального устройства территорий, безопасного в эпидемиологическом отношении питьевого водоснабжения. В таких условиях урбанизация, приводящая к скученности населения, повышает вероятность

возникновения вспышек. Особую остроту проблеме придает тот факт, что основным поражаемым контингентом являются дети, в том числе первых лет жизни. Отсутствие достоверной лабораторной диагностики во многих странах не позволяет планировать противоэпидемические мероприятия, и делает невозможным своевременное назначение антибиотиков, что повышает частоту осложнений, летальность и формирование хронического бактерионосительства. В последние годы в некоторых странах Юго-Восточной Азии (Вьетнам и др.), которые ранее расценивались как эндемичные по брюшному тифу, отмечается снижение заболеваемости брюшным тифом в результате экономического подъема, который приводит к улучшению условий жизни населения, а также благодаря проводимым программам вакцинации [85, 245, 255, 336, 337].

В индустриально развитых странах брюшной тиф регистрируют в виде sporadic случаев, как правило, у лиц, вернувшихся из эндемичных стран, к которым относятся многие страны, популярные для туризма (Индия, Пакистан, Непал, Бангладеш, Индонезия и др.). Нередко брюшной тиф завозится трудовыми мигрантами. Случаи заражения и распространения внутри индустриально развитых стран возникают редко. В 2016 г. в 22 странах ЕС зарегистрированы 1161 случай брюшного тифа (0,33 случая на 100 тыс. населения, что является максимальным показателем за период с 2012 по 2016 гг.), причем около 70,0% в трех странах: Франции, Италии и Великобритании (40,0%). Установлено, что в 82,5% случаев инфицирование заболевших произошло во время выезда в страны за пределы ЕС, причем большая часть поездок была в Индию (40,8%) и Пакистан (19,6%). Греция – единственная страна ЕС, где зарегистрировано большое количество «домашних» случаев брюшного тифа (66,7%), когда инфицирование произошло внутри страны [160].

РФ не принадлежит к странам с высокой заболеваемостью брюшным тифом: по данным официальной регистрации показатель не превышает 0,03-0,1 на 100 тыс. населения, динамика заболеваемости на протяжении многих десятилетий характеризуется устойчивой тенденцией к снижению [41, 42]. В последние 10 лет в РФ ежегодно регистрируют от 10 до 30 sporadic случаев брюшного тифа,

возникающих в результате «завоза» из стран Азиатского и Африканского региона. За период 2005-2018 гг. было зарегистрировано несколько вспышек брюшного тифа среди лиц из социально неблагополучных групп населения, в организованных коллективах и местах коллективного проживания трудовых мигрантов, которые были обусловлены водным и пищевым факторами передачи и возникли из-за неудовлетворительного водоснабжения, несоблюдения санитарно-гигиенических норм в быту и нарушений норм действующего санитарного законодательства на пищеблоках.

Брюшной тиф характеризуется язвенным поражением лимфатической системы тонкого кишечника, бактериемией, лихорадкой, циклическим клиническим течением с выраженной интоксикацией, гепато- и спленомегалией, розеолезной сыпью, диареей. Изъязвление пейеровых бляшек подвздошной кишки, возникающее у 2,0-10,0% пациентов (с неблагоприятным преморбидным фоном, поздно госпитализированных и не получавших адекватную терапию на догоспитальном этапе) приводит к кишечному кровотечению и прободению кишечника. Летальность в настоящее время составляет менее 1,0%, частота рецидивов при брюшном тифе может достигать 10-15,0% [4, 24, 33]. У части переболевших формируется хроническое бактерионосительство, которое способствует возникновению новых случаев заражения. В Санкт-Петербурге в 2005-2007 гг. большинство пациентов поступали в стационар на поздних сроках (на 12-15 день от начала заболевания), поскольку клиническая картина развивалась постепенно и проявлялась неспецифическими симптомами: самым частым диагнозом при направлении на госпитализацию был «острый энтероколит» (51,0%). Первичный диагноз «брюшной тиф» или «тифо-паратифозное заболевание» был поставлен в 30,0% случаев. Заболевание у большинства больных (76,0%) имело тяжелую форму, у 24,0% – средней тяжести. Фебрильная лихорадка постоянного типа, как ведущий синдром брюшного тифа, наблюдалась в 85,0% случаев и сохранялась в среднем  $28,8 \pm 3,5$  дня, сопровождаясь выраженным интоксикационным синдромом (слабость, заторможенность, снижением аппетита, негативизм, дисфория, головная боль).

Диарейный синдром (кашицеобразный или водянистый стул от 2 до 20 раз в сутки) встречался в 79,8% случаев. Недостаточная настороженность врачей в отношении брюшного тифа и недооценка эпидемиологических данных затрудняла постановку диагноза и назначение адекватного лечения на ранних стадиях заболевания брюшным тифом [70, 71].

Ведущее место в лечении брюшного тифа занимает этиотропная терапия, направленная на купирование симптомов заболевания и предотвращение осложнений и бактерионосительства. Применение антибиотиков позволило снизить летальность от этой инфекции до уровня менее 1,0%. В качестве эмпирической терапии брюшного тифа в разные годы использовали хлорамфеникол, ампициллин, триметоприм/сульфаметоксазол, фторхинолоны (офлоксацин, цiproфлоксацин), ЦРС (цефтриаксон, цефиксим) и азитромицин. В настоящее время выбор АМП зависит от результатов определения чувствительности выделенного штамма *S. Typhi* к АМП: в отношении чувствительного к хинолонам возбудителя препаратами выбора являются фторхинолоны; если возбудитель устойчив к этой группе препаратов, то рекомендована комбинированная терапия, включающая азитромицин и ЦРС (цефтриаксон или цефиксим). В некоторых случаях в качестве альтернативных АМП могут быть использованы триметоприм/сульфаметоксазол, хлорамфеникол и амоксициллин для лечения инфекции, вызванной штаммами, чувствительными к этим препаратам. Выбор АМП для эмпирической стартовой терапии должен быть основан на данных локального мониторинга антибиотикорезистентности возбудителя [4, 15, 25, 51-53, 131, 132, 152, 153, 211, 324, 335].

Эффективность антимикробной терапии брюшного тифа снижается в результате развития у штаммов возбудителя устойчивости к АМП. Хлорамфеникол начали использовать для лечения брюшного тифа в 1948 г., в конце 1960-х гг. первые спорадические случаи брюшного тифа, вызванные устойчивыми штаммами, были зарегистрированы в Египте, Йемене и Пакистане. В 1972 г. в Мексике, Индии и Вьетнаме возникли первые крупные вспышки брюшного тифа, вызванные такими штаммами. Глобальное распространение



устойчивых штаммов привело к тому, что в 1980-е гг. для лечения брюшного тифа стали применять комбинацию ампициллина и триметоприма, но в 1987 г. в Китае была зарегистрирована первая вспышка, вызванная возбудителем с множественной устойчивостью ко всем АМП, применявшимся в качестве препаратов «первой линии» – хлорамфениколу, ампициллину и триметоприм/сульфаметоксазолу (так называемый MDR-фенотип, multidrug resistance) [33, 34, 247, 268]. Такие штаммы быстро распространились в странах Южной Азии (Индия, Бангладеш, Вьетнам, Непал, Пакистан и Таджикистан) и Южной Африки. Так, во Вьетнаме первый устойчивый штамм был выделен в 1993 г., а к 2005 г. уже 90,0% штаммов обладали MDR-фенотипом, поэтому указанные препараты утратили свое значение при лечении брюшного тифа [327]. Снижение эффективности препаратов «первой линии» потребовало смены тактики antimicrobial терапии и в начале 1990-х гг. для лечения брюшного тифа стали использовать фторхинолоны (ципрофлоксацин), что привело к тому, что в эндемичных странах появились MDR-штаммы *S. Typhi* с дополнительной устойчивостью к налидиксовой кислоте. В 2009 г. в Индии такие штаммы составляли до 80,0% исследованной популяции возбудителя, в европейских странах - от 12,0 (Великобритания, 1999) до 17,0% (Франция, 2008-2009) [327].

Смена АМП, используемых для лечения брюшного тифа, привела к снижению селективного давления и элиминации плазмиды, несущей детерминанты множественной резистентности. В настоящее время доля полирезистентных штаммов в странах Азии значительно снизилась, а доминируют штаммы *S. Typhi*, устойчивые только к хинолонам. Свободный, неконтролируемый доступ населения к дешевым фторхинолонам стал причиной быстрого распространения устойчивых штаммов в странах Юго-Восточной Азии. В 2013 г. в Индии доля MDR-штаммов составила 25,0%, штаммов, устойчивых к хинолонам – 81,5% [147], по данным других исследователей за период с 2011 по 2015 гг. доля MDR-штаммов снизилась до 20,0%, а резистентных к хинолонам - выросла с 10,0 до 66,0%, соответственно [107]. Несколько масштабных исследований, проведенных в 1995-2015 гг. в азиатских странах, которые

формируют до 80,0% заболеваемости брюшным тифом в мире (Индия, Вьетнам, Непал, Бангладеш, Камбоджа, Лаос, Тайланд, Китай), показали, что доля MDR-штаммов составляла 16,0-37,0%, устойчивость низкого уровня к фторхинолонам – до 65,0% (во Вьетнаме - 97,0%), причем в этот временной период отмечен резкий рост такой устойчивости с 4,0 до 97,0% [124, 221, 262, 274].

Тем не менее, доля MDR-штаммов *S. Typhi* остается высокой в странах Западной Африки. Так, от 20,0 до 60,0% штаммов, выделенных в Нигерии, Камеруне и Гвинее в 2000-2013 гг., характеризовались множественной устойчивостью, обусловленной плазмидами группы IncIII. В тоже время устойчивость к хинолонам, обусловленная мутациями в гене *gyrA*, встречалась крайне редко, что может быть связано с использованием для лечения брюшного тифа «старых» дешевых АМП: хлорамфеникола, ампициллина и триметоприм/сульфаметоксазола [97, 334].

В странах, в которых заболеваемость брюшным тифом формируется в результате «завоза» возбудителя из Юго-Восточной Азии и Африки, тенденции в развитии резистентности *S. Typhi* повторяют тенденции, характерные для эндемичных стран. В США доля штаммов *S. Typhi*, резистентных к АМП, выросла за счет роста резистентности к хинолонам (23,6% в 2002 г., 77,6% в 2014 г.), доля MDR-штаммов в 2014 г. составила около 12,0%. Наиболее высокий риск заражения резистентными штаммами приходился на страны Индийского региона: у 65,0% пациентов, инфицированных в этих странах, был выделен возбудитель, резистентный к хинолонам [119]. По данным французского референс-центра по сальмонеллам, в 2008-2009 гг. резистентные штаммы *S. Typhi* были завезены во Францию из азиатских стран Индийского региона (от 31,4% пациентов, заразившихся в этих странах, был выделены резистентные к хинолонам штаммы возбудителя) [327]. В Великобритании в 1990-х доля MDR-штаммов *S. Typhi* колебалась от 20,0 до 40,0%, в 1999 г. снизилась до 26,0%, более 90,0% случаев были связаны с посещением Пакистана и Индии [327]. Механизмы устойчивости к АМП, описанные у возбудителя брюшного тифа, не отличаются от других *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров (Таблица 10).

Таблица 10 – Механизмы резистентности к антимикробным препаратам, выявленные у штаммов *S. Typhi*

Антимикробные препараты	Механизм резистентности	Гены резистентности	Ссылка
Аминопенициллины	Ферментативная инактивация	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	196, 267, 324
Хлорамфеникол	Ферментативная инактивация	<i>cat</i>	324
Триметоприм/ сульфаметоксазол	Ферментативная инактивация	<i>dfrA, sul1, sul2</i>	324
Хинолоны	Модификация мишени (мутации в QRDR-регионе)	<i>gyrA, gyrB, parC, parE</i>	73, 107, 124, 173, 221, 241, 258, 274, 295
	Ферментативная инактивация	<i>qnrA, qnrB, qnrS, aac(6')-Ib-cr, qepA</i>	107, 175, 178, 213, 257, 265, 274, 301
Цефалоспорины расширенного спектра	Ферментативная инактивация	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	76, 77-79, 84, 105, 178, 190, 265, 272, 275, 286
Азитромицин	Ферментативная инактивация, эффлюкс	<i>ereA, ereB, ermB, mefA, mphA, mphB, mphD</i>	324

Устойчивость к бета-лактамам обусловлена продукцией бета-лактамаз широкого и расширенного спектра. У штаммов *S. Typhi* выявлена бета-лактамаза широкого спектра TEM-1, обуславливающая устойчивость к аминопенициллинам, которая в большинстве случаев является частью MDR-фенотипа и сочетается с устойчивостью к хлорамфениколу, тетрациклину, триметоприм/сульфаметоксазолу и налидиксовой кислоте.

MDR-фенотип у штаммов *S. Typhi*, как правило, обусловлен плазмидами рНСМ1 группы несовместимости IncHI1, которые содержат гены резистентности ко многим классам АМП [196, 267]. Впервые плазида R27 группы IncHI1, кодирующая устойчивость к тетрациклину, была выделена у штаммов *S. Typhi* *mu*gium в 1960-е гг. Во Вьетнаме в 2000 г. у штамма *S. Typhi* была выделена плазида группы IncHI1, названная рНСМ1, на 99,0% гомологичная R27, но имеющая дополнительные гены резистентности к АМП и тяжелым металлам [148]. Плазида рНСМ1 включает гены резистентности ко всем препаратам «первой линии»: *dhfr1b* (триметоприм), *sul2* (сульфаниламиды), *catI* (хлорамфеникол), *bla*<sub>TEM-1</sub> (ампициллин), *tetA/tetC* (тетрациклины), и *strAB* (стрептомицин). У плазмиды рНСМ1 выявлено 8 различных сиквенс-типов (PST),

пять из которых обнаружены у *S. Typhi* [267, 268]. Большинство MDR-штаммов *S. Typhi*, выделенных до 1995 г., обладали плазмидами рНСМ1 разных сиквенс-типов. Начиная с 1995 г. 98,0% MDR-штаммов *S. Typhi* были представлены такой комбинацией возбудитель/плазида: *S. Typhi* гаплотипа Н58/плазида рНСМ1 PST6, что свидетельствует о клональном распространении возбудителя. Высказано предположение, что глобальная экспансия клона Н58 началась именно после приобретения им плазмиды рНСМ1 PST6, которая в отличие от плазмид других сиквенс-типов, содержит гены, обуславливающие повышенную осмотолерантность, что создает селективное преимущество и повышает выживаемость штаммов в желчном пузыре, кишечнике, мочевых путях [148, 267].

В тех странах, где в связи с высокой долей MDR-штаммов изменили протокол лечения брюшного тифа и вместо препаратов первой линии стали использовать фторхинолоны (Вьетнам, Непал, Бангладеш), произошла элиминация плазмиды рНСМ1 из популяции *S. Typhi* гаплотипа Н58 [196, 224, 274]. В странах Африки (Кения), где продолжают использовать хлорамфеникол, штаммы *S. Typhi* гаплотипа Н58 по-прежнему характеризуются MDR-фенотипом, обусловленным этой плазмидой [210]. В Зимбабве среди штаммов, выделенных с 2009 по 2017 гг., 62,3% характеризовались MDR-фенотипом, из них 93,2% относились к гаплотипу Н58 [240]. Это свидетельствует о том, что для поддержания плазмиды рНСМ1 PST6 в популяции возбудителя необходимо селективное давление антибиотиков, без которого плазида быстро элиминируется из популяции. В тоже время, установлено, что в некоторых случаях MDR-регионы композитного транспозона, присутствующего в плазмидах группы IncHI1, могут интегрировались в хромосому *S. Typhi*, в этом случае потеря MDR-фенотипа при снижении селективного давления АМП менее вероятна [148]. Такие штаммы вызвали крупную вспышку брюшного тифа в Замбии в 2010-2012 гг. [189].

В 2007 г. появились первые сообщения о выделении штаммов *S. Typhi*, устойчивых к цефалоспорином 3-4 поколения, продуцирующих БЛРС. В настоящее время в странах Азии (Индия, Кувейт, Нигерия, Корея, Пакистан,

Бангладеш) и Африки (Нигерия, Конго) идентифицированы штаммы, продуцирующие как «классические» БЛРС генетического семейства СТХ-М (как правило, СТХ-М15) и SHV-12, так и цефалоспорины AmpC (CMY-2 и ACC-1). Единичные штаммы, выделенные в европейских странах (Германия, Норвегия, Нидерланды, Испания) и США, имели азиатское происхождение [76, 77-79, 84, 105, 178, 190, 265, 272, 275, 286]. Причем, нередко штаммы, продуцирующие БЛРС, характеризуются MDR-фенотипом и устойчивостью к фторхинолонам – как хромосомной (мутации *qyrA* Ser83Phe), так и плазмидоопосредованной (гены *qnrS*, *qnrB*, *aac(6')-Icr-b*) [180, 269, 284].

Учитывая широкое распространение в странах Юго-Восточной Азии нозокомиальных штаммов энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, а также способность мобильных генетических элементов, на которых локализованы гены карбапенемаз, к диссеминации среди штаммов энтеробактерий, существует вероятность появления в эндемичных странах штаммов возбудителя брюшного тифа, устойчивых к карбапенемам. В настоящее время резистентность к этой группе препаратов, обусловленная продукцией карбапенемазы OXA-48, описана у штамма *S. Paratyphi B*, выделенного в 2013 г. в Великобритании [165].

В 2016-2017 гг. в Пакистане зарегистрированы 339 случаев (спорадических и групповых) брюшного тифа, вызванного штаммом *S. Typhi* гаплотипа H58, устойчивым ко всем АМП, используемым для лечения: антибиотикам «первой линии» (хлорамфеникол, ампициллин и триметоприм/сульфаметоксазол), а также фторхинолонам и ЦПС [123, 215, 228]. Возбудитель был расценен как «чрезвычайно устойчивый» (extra drug resistant, XDR). Для лечения инфекции, вызванной такими штаммами, могут быть использованы только три препарата: азитромицин, меропенем или тигециклин, причем перорально – только азитромицин. Это значительно усложняет и удорожает лечение, что особенно актуально для стран с ограниченными ресурсами здравоохранения. XDR- штамм обладал большим количеством детерминант резистентности: хромосомно интегрированными композитными локусами резистентности, а также плазмидой группы IncY, содержащей гены *bla*<sub>СТХ-М15</sub> (устойчивость к ЦПС) и *qnrS* (устойчивость к

хинолонам). Локализация этих генов на одной плазмиде повышает вероятность ее сохранения при использовании одного из этих антибиотиков. Высокая гомология обнаруженной плазмиды IncY с плазмидами этой группы, широко представленных у штаммов энтеробактерий, позволяет предположить, что она могла быть приобретена штаммом *S. Typhi* в результате конъюгации от штамма *E. coli* в кишечнике человека [215]. XDR-штамм *S. Typhi* H58 получил межконтинентальное распространение и был выделен в Великобритании и США от туристов, вернувшихся из Пакистана [123, 215]. В дальнейшем регистрировались спорадические случаи брюшного тифа, вызванного XDR-штаммами *S. Typhi* других гаплотипов (не-H58), имеющих различные плазмиды [104, 228].

У штаммов *S. Typhi*, как и у *Salmonella* других сероваров, ведущим механизмом устойчивости к хинолонам является возникновение хромосомных мутаций в 83 или 87 кодонах QRDR-региона гена *gyrA* (Таблица 11). Исследования, проводимые в странах Азии, показали, что у 60,0-90,0% штаммов *S. Typhi* с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам (МПК 0,12-0,5 мг/л) обнаруживают однонуклеотидную замену *gyrA\_C248T(Ser83Phe)*, а также выявлены замены *gyrA\_G259A(Asp87Asn)* и *gyrA\_C248A(Ser83Tyr)* [107, 124, 221, 241, 258, 274, 295]. У некоторых штаммов *S. Typhi* выявлены одновременно две однонуклеотидные замены в гене *gyrA*: *Ser83Phe* и *Asp87Asn*, при этом устойчивость к фторхинолонам могла оставаться на низком уровне или повышалась до 4-8,0 мг/л [124, 173, 241]. Описанные в литературе у штаммов *S. Typhi* однонуклеотидные замены в гене *gyrB* либо не влияли на чувствительность к хинолонам (несмотря на то, что находились в QRDR-регионе), либо встречались у штаммов с устойчивостью низкого уровня, уже имеющими замены в гене *gyrA* (*Ser83Phe*, *Asp87Asn*), поэтому оценить их самостоятельный вклад в развитие резистентности сложно [73, 107, 183]. Некоторые замены в *gyrB* приводили к «парадоксальному» фенотипу (сохраняли чувствительность к налидиксовой кислоте) [73, 183, 295]. Мутации в генах *parC* и *parE* описаны только в сочетании с мутациями в гене *gyrA* у штаммов с устойчивостью высокого уровня.

Таблица 11 – Мутации в QRDR-регионе генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*, и соответствующие им фенотипы резистентности к хинолонам, описанные у штаммов *S. Typhi*

Аминокислотные замены	Фенотип резистентности к фторхинолонам <sup>1</sup>	Ссылка
<b>ген <i>gyrA</i></b>		
Ser83Phe	FQ-LLR	73, 107, 124, 173, 221, 241, 258, 274, 295
Ser83Tyr		73, 107, 124, 173, 241, 295
Asp87Asn		73, 107, 124, 173, 221, 241, 295
Asp87Tyr		107, 295
Asp87Gly		73, 124, 295
Asp87Ala		124,
Ser83Phe + Asp87Gly		124,
Ser83Phe + Asp87Asn		FQ-LLR, FQ-HLR
<b>ген <i>gyrB</i></b>		
Ser464Phe	FQ-LLR	73, 183, 295
Ser464Tyr		73, 183
Ser464Thr		183
Glu466Asp		295
<b>Сочетания мутаций в нескольких генах</b>		
<i>gyrA</i> (Ser83Phe) + <i>parE</i> (Leu416Phe)	FQ-LLR	295
<i>gyrA</i> (Ser83Phe) + <i>parE</i> (Asp420Asn)		295
<i>gyrA</i> (Ser83Tyr + Asp87Asn) + <i>parC</i> (Ser80Ile)	FQ-LLR	73, 173, 244, 253
<i>gyrA</i> (Ser83Phe + Asp87Asn) + <i>gyrB</i> (Gly435Glu)		173
<i>gyrA</i> (Ser83Phe) + <i>gyrB</i> (Gly435Ala)		173
<i>gyrA</i> (Asp87Asn) + <i>gyrB</i> (Gly435Glu)		173
<i>gyrA</i> (Ser83Phe) + <i>gyrB</i> (Gly435Val)		173
<i>gyrA</i> (Ser83Phe) + <i>parE</i> (Asp420Asn)		73, 295
<i>gyrA</i> (Ser83Phe) + <i>parE</i> (Leu416Phe)		295
<i>gyrA</i> (Ser83Phe + Asp87Asn) + <i>parC</i> (Ser80Ile)		FQ-HLR
<i>gyrA</i> (Ser83Phe + Asp87Asn) + <i>gyrB</i> (Ser464Phe)	295	
<i>gyrA</i> (Leu55Trp + Ser83Phe + Asp87Ala + Gln106Arg) + <i>parC</i> (Glu84Lys + Trp106Gly + Tyr128Asp)	142	

Примечание: Asp – аспарагиновая кислота, Asn – аспарагин, Gly – глицин, Phe – фенилаланин, Ser – серин, Tyr – тирозин, Ala – аланин, Lys – лизин, Arg – аргинин, Glu – глутаминовая кислота, Thr – треонин, Cys – цистин, Ile – изолейцин, Val – валин, His – гистидин, Leu – лейцин, Gln – глутамин, Trp – триптофан;

FQ-LLR – устойчивость к фторхинолонам низкого уровня (fluoroquinolone low-level resistance), МПК ципрофлоксацина 0,125 – 0,5 мг/л

FQ-HLR – устойчивость к фторхинолонам высокого уровня (fluoroquinolone high-level resistance), МПК ципрофлоксацина 1,0 мг/л и выше

У штаммов с устойчивостью высокого уровня к фторхинолонам (МПК повышается до 16,0 мг/л) обнаруживают, как правило, больше двух мутаций в нескольких генах: чаще всего, тройную мутацию *gyrA* (Ser83Phe+Asp87Asn) и *parC* Ser80Ple [93, 107, 173, 266, 308].

В последние годы в странах Азии выявлены штаммы *S. Typhi* с устойчивостью высокого уровня к фторхинолонам (МПК ципрофлоксацина 12,0 мг/л), обусловленной многочисленными мутациями (от четырех до семи) как в одном, так и разных генах [142, 173]. У единичных штаммов *S. Typhi* выявлены плазмидоопосредованные механизмы устойчивости к хинолонам, обусловленные генами *qnr* (механизм защиты мишени): *qnrB* [107, 175, 265] и *qnrS* [107, 213, 257, 274, 301], а также *aac(6)-Ib-cr* (ферментная инактивация антибиотика) [175, 178]. У некоторых таких штаммов гены *qnr* находились на одной плазмиде группы несовместимости IncY с генами *bla*<sub>CTX-M15</sub> [265]. Следует отметить, что для штаммов с плазмидоопосредованным механизмом характерен «парадоксальный» фенотип устойчивости к хинолонам, когда при устойчивости низкого уровня к ципрофлоксацину, штамм остается чувствительным к налидиксовой кислоте. У тех штаммов, у которых плазмидоопосредованная резистентность присоединяется к уже имеющейся хромосомной мутации (например, *gyrA* Ser83Phe и *qnrS*), устойчивость к фторхинолонам достигает высокого уровня [213].

Фенотипическая и молекулярная детекция резистентности у штаммов *S. Typhi* в целом не отличается от используемых при исследовании *Salmonella* других сероваров. В тоже время, генерализованный характер и тяжесть заболевания, а также обязательная антибиотикотерапия брюшного тифа, предъявляют повышенные требования к качеству проведения процедуры определения чувствительности штамма к АМП, а также к интерпретации результатов тестирования.

Отсутствие внутривидового разнообразия возбудителя брюшного тифа не дает возможности проводить фенотипическую дифференциацию отдельных штаммов в эпидемиологических целях. Несмотря на то, что описано четыре биовара *S. Typhi*, отличающиеся по способности ферментировать ксилозу и



арабинозу, подавляющее большинство штаммов, циркулирующих в настоящее время относятся к биовару I [35]. Относительно недавнее возникновение *S. Typhi* (около 50 тыс. лет) обуславливает высокую генетическую мономорфность (клональность) этого возбудителя, который имеет высоко консервативный геном, существующий недостаточно долго для возникновения выраженного полиморфизма. Глобальная популяция возбудителя относительно малочисленна: установлено, что все штаммы произошли от общего предшественника, рекомбинации между *S. Typhi* и другими *Salmonella* происходят очень редко [195, 196, 214, 287, 341]. Это осложняет поиск адекватного метода дискриминации штаммов, пригодного для решения эпидемиологических задач.

В рамках эпидемиологического расследования вспышек брюшного тифа в международных референс-центрах широко используется метод PFGE, который позволяет установить идентичность штаммов и выявить эпидемиологически связанные случаи заболевания. В тоже время показано, что этот метод не позволяет установить филогенетические взаимоотношения между штаммами [97, 136].

Исследования, проведенные классическим методом MLST (на основе семи генов «домашнего хозяйства»), показали, что штаммы *S. Typhi* кластеризуются в отдельную генетическую группу, совершенно отличную от других сероваров *Salmonella*. Этот кластер включает небольшое число близко родственных сиквенс-типов с безусловным превалированием ST1 и ST2 [74, 133, 169, 239, 258, 290, 340, 341, 345]. В настоящее время в международной базе EnteroBase (<http://enterobase.warwick.ac.uk>) представлены данные MLST для более чем 6600 штаммов возбудителя брюшного тифа, выделенных в различных регионах мира. Суммарная доля штаммов ST1 и ST2 превышает 95,0% (61,2 и 33,9%, соответственно), ST 2209, ST11 и ST2233 представлены 30-60 штаммами (0,5-0,9%), доля других сиквенс-типов колеблется от 0,02 до 0,2%, большинство из них представлены единичными штаммами. Сравнительный геномный анализ штаммов различных сиквенс-типов обнаружил у штаммов ST1 и ST2 уникальные мутации в генах вирулентности *flhB*, *sipC* и *tviD*, которые могут объяснить глобальное распространение этих сиквенс-типов [340, 341].

Для оценки филогенетической близости возбудителей, характеризующихся высокой клональностью, в настоящее время широко используют метод SNP-типирования, основанный на выявлении в сравниваемых геномах полного спектра ортологичных однонуклеотидных вариаций (от англ. Single nucleotide polymorphism, SNP). В 2006 г. Roumagnac и др. впервые использовали этот метод для филогенетической классификации возбудителя брюшного тифа, кластеризуя исследованные штаммы на основе спектра выявленных SNP в генотипы, которые получили название «гаплотипов» [287]. В 2015 г. Wong и др. провели широкомасштабный филогенетический SNP-анализ данных полногеномного секвенирования глобальной популяции возбудителя брюшного тифа, включающей 1832 штамма *S. Typhi*, выделенных в 63 странах. Авторы построили филогенетическое дерево, включающее 85 генетических групп (гаплотипов), и проследили эволюцию возбудителя брюшного тифа от общего предшественника – гаплотипа H45, возникшего 10-50 тыс. лет назад на территории Африки. Все последующие гаплотипы возникли из H45 путем одной или нескольких мутаций. Дальнейшее распространение возбудителя брюшного тифа происходило вместе с миграцией человеческой популяции из Африки в другие регионы мира [332].

Несмотря на большое разнообразие обнаруженных генетических групп *S. Typhi*, в настоящее время выявлено глобальное доминирование гаплотипа H58, который возник около 30-40 лет назад в Южной Азии (Индия) и в дальнейшем стремительно распространился в страны Юго-Восточной и Западной Азии [221, 274, 287, 332]. На Африканский континент штаммы этого гаплотипа попали в результате как минимум трех независимых событий («завозов»), сначала в Кению, а затем распространились по всей Восточной Африке (Тунис, Уганда, Танзания, Заир, Малави) и ЮАР, где гаплотип H58 стал доминирующим с 2000-х гг. [334].

В 1990-е гг. H58 приобрел большую конъюгативную плазмиду группы несовместимости IncHI1 сиквенс-типа PST6, а в дальнейшем (как следствие селективного давления фторхинолонов, сменивших в схеме этиотропной терапии антибиотика «первой линии») – однонуклеотидную замену в хромосомном гене *gyrA*. Таким образом, долгое время гаплотип H58 был ассоциирован с MDR-

фенотипом (устойчивость к ампициллину, хлорамфениколу, тетрациклину, триметоприм/сульфаметоксазолу, ципрофлоксацину), обусловленным сочетанием нескольких механизмов резистентности: плазмидоопосредованного (плазида IncHI1 PST6 выявлена у 74,0% штаммов H58) и хромосомного (однонуклеотидные замены в гене *gyrA* выявлены у 68,0% штаммов этого гаплотипа, из них у 45,0% - мутация Ser83Tyr) [274, 332]. В настоящее время наблюдается общая тенденция к потере плазмидоопосредованного MDR-фенотипа штаммами возбудителя брюшного тифа (в том числе гаплотипа H58) при сохраняющейся хромосомной устойчивости к хинолонам [274], уровень которой повышается: в Непале и Индии выделены штаммы *S. Typhi* H58 с тремя мутациями в генах *gyrA* (кодон 83 и 87) и *parC* (кодон 80) [107, 266].

В странах Западной и Центральной Африки (Нигерия, Сенегал, Гана, Того, ДР Конго) в популяции возбудителя брюшного тифа гаплотип H58 практически не встречается, а MDR-штаммы *S. Typhi* возникли, по-видимому, путем приобретения различных плазмид чувствительными штаммами локальной популяции возбудителя гаплотипов H42, 55, 56 и 77. Большинство штаммов *S. Typhi*, выделенных в этой части Африки, характеризовались классической множественной резистентностью к АМП первой линии, и не имели мутаций в *gyrA*, что объясняется использованием в странах Африки для лечения брюшного тифа «старых» дешёвых АМП (хлорамфеникола, ампициллина, триметоприм/сульфаметоксазола) [97, 260, 332, 334].

В 2016 г. Wong et al. для быстрой филогенетической классификации генома штамма был предложен усовершенствованный алгоритм анализа, основанный на определении наиболее филогенетически значимых SNP на основе ранее реконструированной этими же авторами глобальной филогении возбудителя брюшного тифа [333]. Анализ, проведенный по этому алгоритму, показал, что глобальная популяция *S. Typhi* разделилась на 4 первичных генетических кластера (1-4), которые в свою очередь подразделились на 16 клад и 49 субклад (Рисунок 1).

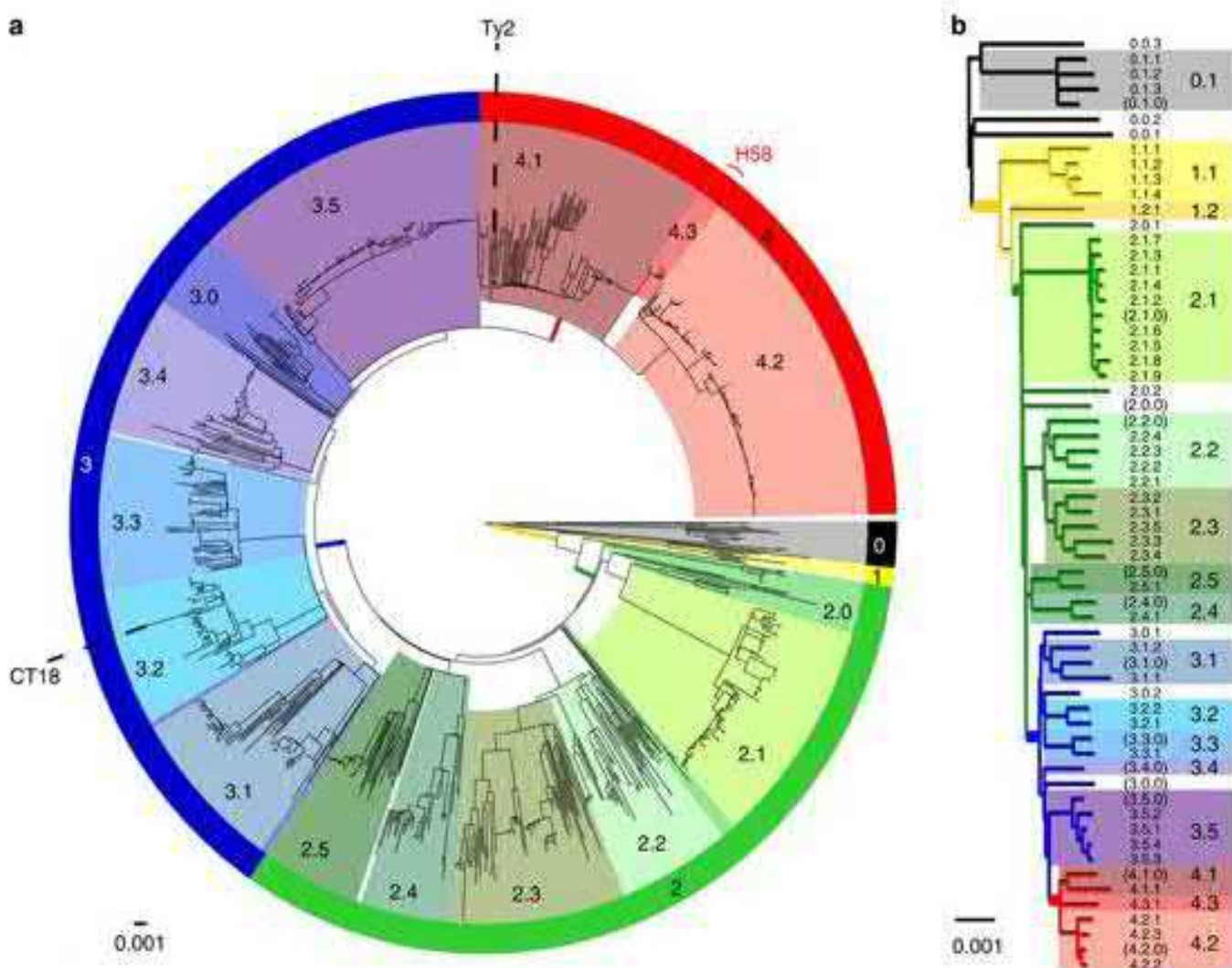


Рисунок 1 – Филогенетическая структура глобальной популяции возбудителя брюшного тифа (1831 штамм *S. Typhi*) по данным SNP-типирования [333]

Примечание:

- а – Первичные кластеры отмечены основными цветами, клады и субклады – оттенками соответствующих цветов. Штаммы H58 составили половину коллекции (852 штамма), но представлены на рисунке только в 6,0% для более ясного представления других клад
- б – Распределение штаммов *S. Typhi* на 16 клад и 49 субклад. Не-дифференцирующиеся клады указаны в скобках

Большинство субклад глобальной популяции *S. Typhi* строго географически кластеризованы и представляют собой длительно существующие локальные субпопуляции возбудителя, поэтому метод может быть использован для определения вероятного региона происхождения штаммов (Рисунок 2).

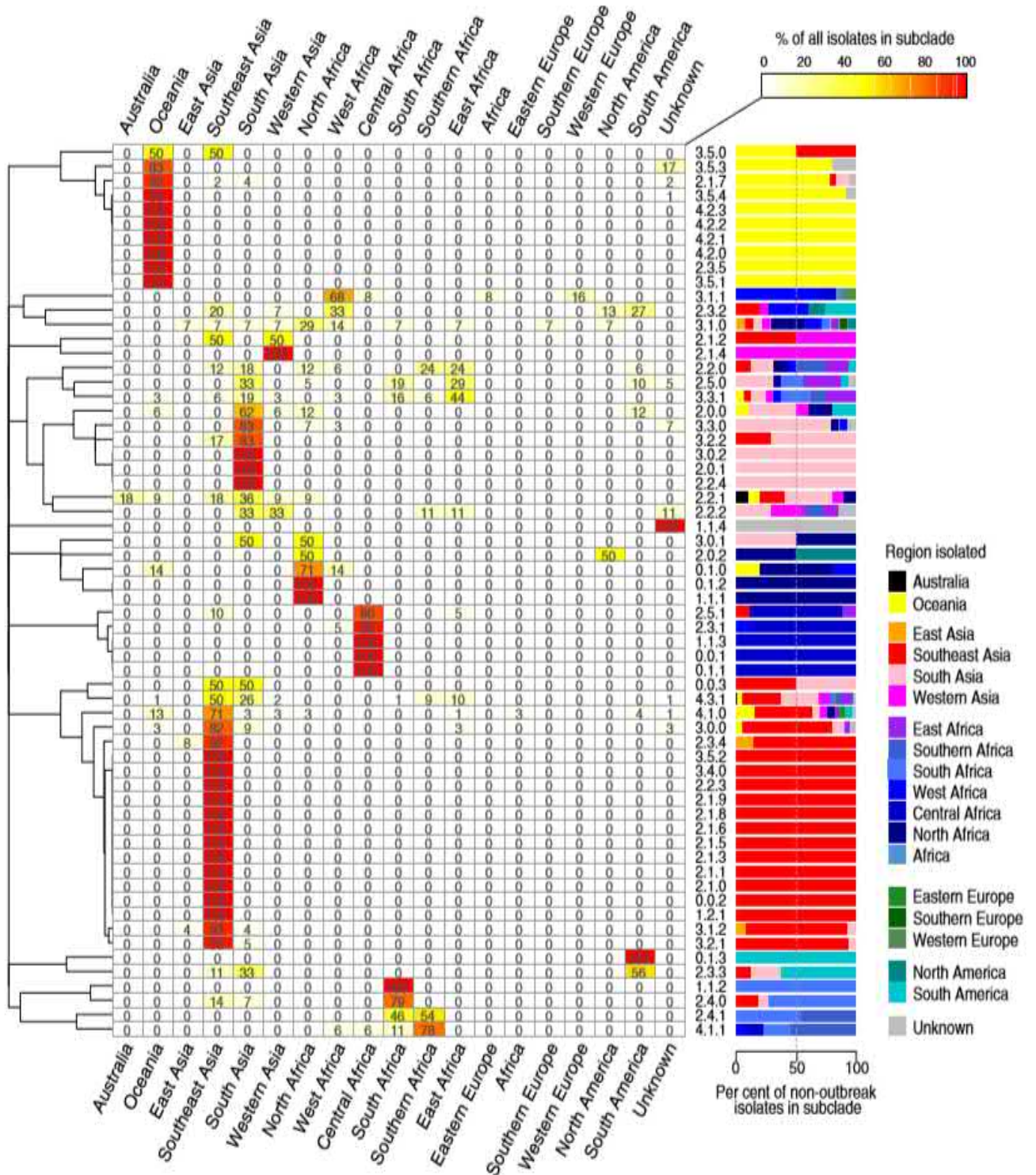


Рисунок 2 – Географическая кластеризация штаммов *S. Typhi*, относящихся к различным субкладам [333]  
 Примечание: показана доля штаммов каждой субклады, происходящих из конкретных регионов; вспышки брюшного тифа представлены одним штаммом

Например, субклада 3.1.1 (гаплотип H56) характерна для стран Африки [334]. «Азиатский» клон H58 (которой включает гаплотип H58 и 8 других H58-

дериватов согласно Roumagnac et al.) образует одну субкладу 4.3.1 внутри клады 4.3 (других субклад не обнаружено). В отличие от других, субклада 4.3.1 обнаружена в 9 различных регионах Африки, Азии и Океании. Таким образом, недавнее (около 30 лет назад) глобальное распространение международного клона высокого риска - субклады 4.3.1 (гаплотипа H58) из Южной Азии в десятки стран мира, где сформировались локальные субпопуляции возбудителя, представляет собой редкое событие в эволюционной истории *S. Typhi*.

Филогенетические исследования глобальной популяции возбудителя брюшного тифа выявили особенности эволюционного развития *S. Typhi*. Тот факт, что общий предшественник всех генетических линий возбудителя, гаплотип H45 и его ближайшие дериваты, до сих пор существуют в популяции возбудителя наряду с более «поздними» гаплотипами, позволяет предположить, что эволюция возбудителя происходит двумя независимыми путями. Существование *S. Typhi* в организме здоровых бактерионосителей обеспечивает медленную (в течение тысячелетий) нейтральную эволюцию, независимую от селективного влияния меняющихся схем этиотропной терапии. С другой стороны, клинически выраженный инфекционный процесс у заболевших сопровождается быстрой эволюцией возбудителя в ответ на селективное воздействие используемых АМП, что подтверждается возникновением разнообразных хромосомных мутаций у штаммов *S. Typhi*, относящихся к одной генетической группе, и глобальным распространением «успешной» субклады 4.3.1 (гаплотипа H58).

Таким образом, брюшной тиф остается актуальной инфекцией для стран, где существуют проблемы с безопасной в эпидемиологическом отношении водой и соблюдением санитарных норм проживания. В РФ в последние десятилетия регистрируются единичные спорадические случаи заболевания. В условиях развития международного туризма, связанного с посещением стран, неблагоприятных по брюшному тифу, и трудовой миграции из стран Центральной Азии, повышается риск «завоза» в РФ возбудителя брюшного тифа (чаще всего, резистентного к АМП) как заболевшими во время путешествия гражданами РФ, так и хроническими бактерионосителями – жителями

неблагополучных стран. Высокая занятость трудовых мигрантов на предприятиях общественного питания, а также часто неблагоприятные условия их проживания (скученность, невозможность в ряде случаев соблюдать санитарно-гигиенические нормы) создают условия для возникновения групповых заболеваний брюшным тифом. В такой ситуации очевидна необходимость мониторинга свойств возбудителя, выделяемого в РФ, включая чувствительность к АМП и клинически значимые механизмы резистентности, для адекватного прогноза возможностей использования различных групп АМП для эмпирической терапии брюшного тифа в нашей стране. Учитывая наличие стандартных схем генотипирования, большой объем уже проведенных на глобальном уровне популяционных исследований возбудителя брюшного тифа, существование доступных баз данных, включающих информацию о штаммах *S. Typhi*, выделенных в различных регионах мира, а также отсутствие аналогичных исследований в Российской Федерации, представляет большой интерес изучение филогенетической структуры российской популяции штаммов *S. Typhi*, выделенных на различных территориях РФ, а также определения их места в глобальной популяции возбудителя брюшного тифа.

Мониторинг чувствительности *Salmonella* к АМП, проводимый в различных странах, свидетельствует о сформированной устойчивости к препаратам, рекомендованным для лечения сальмонеллезов, что представляет большую проблему для здравоохранения. Устойчивость к фторхинолонам и ЦРС, развивающаяся на фоне утраты чувствительности *Salmonella* к «старым» АМП (ампициллин, хлорамфеникол, триметоприм/сульфаметоксазол), значительно ограничивает возможности терапии осложненных сальмонеллезов. Широкое использование бета-лактамов и хинолонов в сельском хозяйстве способствует диссеминации генов резистентности в штаммах возбудителей инфекций, общих для человека и животных, к которым относятся *Salmonella*. Совместная локализация генов резистентности к различным классам АМП на мобильных элементах делает возможной ко-селекцию штаммов, устойчивых даже к тем препаратам, которые не используются в данный момент в сельском хозяйстве.

«Перекрестная» селективная адаптация и горизонтальный трансфер генов от штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* (включая возбудителей ИСМП) вносят свой вклад в появление и распространение устойчивых к АМП штаммов *Salmonella*. Многие АМП, включая фторхинолоны, выводятся неизменными из организма человека и животных и со сточными водами попадают в окружающую среду, где могут быть обнаружены в незначительных количествах в воде открытых водоемов и почве. Накопление АМП во внешней среде создает преимущество для выживания микроорганизмов, обладающих плазмидными или хромосомными генами резистентности, сохраняет их в качестве резервуара и вносит свой вклад в успешную циркуляцию таких генов [299].

В рутинной практике бактериологических лабораторий существуют проблемы выявления некоторых клинически значимых механизмов резистентности у штаммов *Salmonella*, связанные как с недостатками нормативно-методического обеспечения процедуры определения чувствительности, так и с объективными биологическими особенностями популяции *Salmonella*. Учитывая многокомпонентность проблемы резистентности *Salmonella*, которая включает не только медицинский, но и ветеринарный, сельскохозяйственный и экологический аспекты, необходима разработка и внедрение в РФ системы интегративного надзора за сальмонеллезом на основе микробиологического мониторинга биологических свойств *Salmonella* (включая сероварный пейзаж, чувствительность к АМП и ведущие механизмы резистентности), выделенных из различных экологических ниш.



## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### ГЛАВА 2 Характеристика штаммов *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг.

По данным официальной регистрации в РФ в период с 2014 по 2019 гг. ежегодно регистрировалось в среднем 36 500 тыс. случаев сальмонеллезной инфекции, в том числе 17 тыс. (46,5%) случаев у детей до 14 лет включительно; доля сальмонеллезов в структуре ОКИ установленной этиологии колебалась от 15,1% (2014 г.) до 11,1% (2018 г.), у детей до 14 лет – от 9,2% (2014 г.) до 7,2% (2018 г.) (<https://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/>). На административных территориях Северо-Западного ФО (СЗФО) в этот период ежегодно регистрировалось около 12 тыс. случаев.

#### 2.1 Серологические варианты

Изучены 746 штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг. из проб испражнений лиц в возрасте от 18 до 80 лет, обследованных по различным показаниям: больные ОКИ, контактные, декретированные лица. Штаммы были выделены в бактериологических лабораториях филиалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Санкт-Петербург» Роспотребнадзора и поступали в лабораторию кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера для определения чувствительности к АМП и изучения механизмов резистентности к клинически значимым АМП. Все штаммы реидентифицированы до вида *Salmonella enterica* spp. *enterica* с использованием бактериологического анализатора Vitek 2 Compact BioMerieux, Франция) или методом время-пролетной масс-спектрометрии на приборе Microflex LRF (Bruker Daltonics, Германия). Для каждого штамма определена антигенная структура в реакции агглютинации с диагностическими сальмонеллезными адсорбированными сыворотками и установлен серовар согласно схеме “Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars” [87]. В тексте работы наименования сероваров штаммов, относящихся к *Salmonella enterica* spp. *enterica*, писали с заглавной буквы прямым печатным шрифтом согласно укороченной номенклатуре, предложенной Коллаборативным Центром ВОЗ по сальмонеллам [87]:

например, вместо полного названия серовара *Salmonella enterica* spp. *enterica* serovar *Enteritidis* использовали сокращенное название *S. Enteritidis*.

Включенные в исследование штаммы относились к 41 серовару. Доминирующее положение занимал серовар *S. Enteritidis*, доля которого в исследуемой популяции в разные годы колебалась незначительно и в среднем составила 79,6% (95%ДИ 76,6-82,4). На долю сероваров *S. Typhimurium* и *S. Infantis* приходилось 6,8% (95%ДИ 5,2-8,9) и 3,8% (95%ДИ 2,6-5,4) соответственно. Серовары других групп (9,8%, 95%ДИ 7,9-12,1) были представлены единичными штаммами (от 1 до 5) (Таблица 12).

Следует отметить, что в ходе нашего исследования среди 51 штамма *S. Typhimurium* не было выявлено штаммов «монофазного» варианта 1,4,[5],12:i:–, широко распространенного в европейских странах. Все штаммы имели Н-антиген 2-й фазы 1,2, в ряде случаев выявленный в результате фазовой инверсии путем культивирования штамма на агаре Свена-Гарда с добавлением сыворотки к Н-антигену 1-й фазы i.

## **2.2 Чувствительность штаммов *Salmonella* к антимикробным препаратам**

Перечень АМП, использованных для тестирования штаммов *Salmonella*, включал препараты, отвечающие следующим требованиям:

- используемые для лечения сальмонеллезов, протекающих в форме гастроэнтерита (ципрофлоксацин, азитромицин, триметоприм/сульфаметоксазол, нитрофураны) и генерализованных форм (амоксициллин/клавулановая кислота, цефотаксим, цефепим);
- являющиеся индикаторами клинически важных механизмов резистентности (ампициллин, цефтазидим, налидиксовая кислота, пefлоксацин);
- перспективные в отношении лечения штаммов с множественной устойчивостью (меропенем, колистин, тигециклин);
- препараты, устойчивость к которым может служить эпидемиологическим маркером при проведении мониторинга (аминогликозиды, хлорамфеникол, тетрациклины). Некоторые АМП, выбранные для тестирования, отвечали одновременно нескольким требованиям.

Таблица 12 – Доля штаммов *Salmonella* различных сероваров, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг.

Серовары	2014 г.			2015 г.			2016-17 гг.			2018-2019 гг.			2014-19 гг.		
	абс	%	95% ДИ	абс	%	95% ДИ	абс	%	95% ДИ	абс	%	95% ДИ	абс	%	95% ДИ
<i>S. Enteritidis</i>	174	80,9	75,2-85,6	110	73,8	66,2-80,2	160	80,8	74,8-85,7	150	82,0	75,8-86,9	594	79,6	76,6-82,4
<i>S. Typhimurium</i>	14	6,5	3,9-10,6	11	7,4	4,2-12,7	9	4,55	2,4-8,4	17	9,3	5,9-14,4	51	6,8	5,2-8,9
<i>S. Infantis</i>	11	5,1	2,9-8,9	6	4,0	1,9-8,5	9	4,55	2,4-8,4	2	1,1	0,3-3,9	28	3,8	2,6-5,4
Суммарно три ведущих серовара	199	92,5	88,3-95,4	127	85,2	78,7-90,0	178	89,9	84,9-93,4	169	92,3	87,6-95,4	673	90,2	87,9-92,1
Другие серовары <sup>1</sup>	16	7,5	4,6-11,7	22	14,8	10,0-21,3	20	10,1	6,6-15,1	14	7,7	4,6-12,4	73	9,8	7,9-12,1
Всего	215	100,0	-	149	100,0	-	198	100,0	-	183	100	-	746	100	-

Примечание:

ДИ – доверительный интервал

<sup>1</sup>Другие серовары:

*S. Montevideo* – 6 штаммов

*S. Kentucky*, *S. Derby*, *S. Bredeney* – по 4 штамма

*S. Agona*, *S. Heidelberg*, *S. Isangi*, *S. London*, *S. Saintpaul*, *S. Brandenburg*, *S. Stanley*, *S. Give* – по 3 штамма

*S. Chester*, *S. Kottbus*, *S. Newlands*, *S. Virchow*, *S. Westhampton* – по 2 штамма

*S. Blegdam*, *S. Chincol*, *S. Coeln*, *S. Concord*, *S. Corvallis*, *S. Dublin*, *S. Fyris*, *S. Goldcoast*, *S. Hadar*, *S. Haifa*, *S. Livingstone*, *S. Manhattan*, *S. Mbandaka*, *S. Munchen*, *S. Newport*, *S. Potsdam*, *S. Rissen*, *S. Sandiego*, *S. Senftenberg*, *S. Tshiongwe*, *S. Weltevreden* – по одному штамму

Тестирование проводили согласно Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» [20]. Для отнесения штаммов к категории чувствительности использовали критерии, приведенные в рекомендациях EUCAST (версия 9.0, 2019 г) [163], для тетрациклина – в российских КР. Для всех штаммов диско-диффузионным методом определили чувствительность к ампициллину, амоксициллин/клавулановой кислоте, цефтазидиму, цефотаксиму, меропенему, хлорамфениколу, тетрациклину, пefлоксацину, налидиксовой кислоте, гентамицину, тобрамицину, амикацину. Выборочно оценили чувствительность к азитромицину, цефотаксиму, ципрофлоксацину, колистину, тигециклину, нитрофурантоину методами определения МПК: методом градиентной диффузии (азитромицин, цефотаксим, ципрофлоксацин, нитрофурантоин) и с использованием коммерческих тест систем MIKROLATEST® SensiLaTest MIC GI и GII (Erba Mannheim) и Sensititre (Thermo Scientific) (колистин, тигециклин). При интерпретации результатов тестирования хинолонов, устойчивыми (R) считали штаммы *Salmonella* с МПК ципрофлоксацина  $> 0,06$  мг/л, то есть штаммы с устойчивостью как низкого, так и высокого уровня.

Среди 746 изученных штаммов *Salmonella* чувствительность ко всем тестируемым АМП отмечена у 34,5% штаммов, устойчивость к 1 и более классу – у 65,5% штаммов: *S. Enteritidis* – 30,1 и 69,9%, соответственно; *S. Typhimurium* – 39,2 и 60,8%; *S. Infantis* – 10,7 и 89,3% (Таблица 13). У других сероваров доля устойчивых штаммов была значительно ниже (24,7%), чем у штаммов ведущих сероваров, и чувствительность ко всем исследованным АМП сохраняли 75,3% штаммов. При анализе устойчивости *Salmonella* к отдельным классам АМП обращает на себя внимание высокая частота устойчивости к хинолонам (ципрофлоксацину) – 60,9%, которая наиболее выражена у штаммов сероваров *S. Enteritidis* (68,7%) и *S. Infantis* (89,3%), для других сероваров составила: *S. Typhimurium* – 13,7%; штаммы других сероваров – 19,2%.

Таблица 13 – Чувствительность к АМП штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-19 гг.

Антимикробные препараты	Всего n = 746			S. Enteritidis n = 594			S. Typhimurium n = 51			S. Infantis n = 28			Другие серовары n = 73			
	n	%	95%ДИ	n	%	95%ДИ	n	%	95%ДИ	n	%	95%ДИ	n	%	95%ДИ	
Чувствительный (S)	257	34,5	31,1-37,9	179	30,1	26,6-33,9	20	39,2	27,0-52,9	3	10,7	3,7-27,2	55	75,3	64,4-83,8	
Устойчивый (R) к - 1 и более классам АМП, из них:	489	65,5	62,1-68,9	415	69,9	66,1-73,4	31	60,8	47,1-73,0	25	89,3	72,8-96,3	18	24,7	16,2-35,6	
- 1-2 классам	414	55,5	51,9-59,0	375	63,1	59,2-66,9	20	39,2	27,0-52,9	6	21,4	10,2-39,5	13	17,8	10,7-28,1	
- 3 и более классам (MDR)	75	10,1	8,1-12,4	40	6,7	5,0-9,0	11	21,6	12,5-34,6	19	67,9	49,3-82,1	5	6,8	3,0-15,1	
Устойчивость к различным классам АМП:																
Бета- лактамы	аминопенициллины <sup>1</sup>	41	5,5	4,1-7,4	13	2,2	1,3-3,7	22	43,1	30,5-56,7	2	7,1	2,0-22,6	4	5,5	2,2-13,3
	ЦРС <sup>2</sup>	12	1,6	0,9-2,8	7	1,2	0,6-2,4	4	7,8	3,1-18,5	0	0	0-12,1	1	1,4	0,2-7,4
	карбапенемы	0	0	0,-0,5	0	0	0-0,6	0	0	0-7,0	0	0	0-12,1	0	0	0-5,0
хинолоны	454	60,9	57,3-64,3	408	68,7	64,8-72,3	7	13,7	6,8-25,7	25	89,3	72,8-96,3	14	19,2	11,8-29,7	
аминогликозиды	7	0,9	0,5-1,9	1	0,2	0-0,9	3	5,9	2,0-15,9	1	3,6	0,6-17,7	2	2,7	0,8-9,5	
триметоприм/сульфаметоксазол	45	6,0	4,5-8,0	15	2,5	1,5-4,1	8	15,7	8,2-28,0	18	64,3	45,8-79,3	4	5,5	2,2-13,3	
хлорамфеникол	32	4,3	3,1-6,0	26	4,4	3,0-6,3	4	7,8	3,1-18,5	0	0	0-12,1	2	2,7	0,8-9,5	
тетрациклин	91	12,2	10,0-14,7	38	6,4	4,7-8,7	21	41,2	28,8-54,8	23	82,1	64,4-92,1	9	12,3	6,6-21,8	
азитромицин (n = 363)	6	1,7	0,8-3,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
нитрофураны (n = 435)	165	37,9	33,5-42,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
колистин (n = 59)	24	40,7	29,1-53,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
тигекциклин (n = 71)	18	25,4	16,7-36,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Примечание: ДИ – доверительный интервал, MDR – multidrug resistance; <sup>1</sup>Штаммы, чувствительные к ЦРС; <sup>2</sup>ЦРС – цефалоспорины расширенного спектра

В отношении устойчивости к другим АМП также отмечены выраженные различия в зависимости от серовара: устойчивость к аминопеницилинам (ампициллину) по суммарным данным выявлена у 5,5% штаммов (наиболее характерна для *S. Typhimurium* – 43,1%), цефалоспорином расширенного спектра – 1,6% (*S. Typhimurium* – 7,8%), тетрациклин – 12,2% (*S. Infantis* – 82,1%, *S. Typhimurium* – 41,2%), триметоприм/сульфаметоксазолу – 6,0% (*S. Infantis* – 64,3%), хлорамфениколу – 4,3%, аминогликозидам – 0,9%. Не выявлены штаммы *Salmonella*, устойчивые к карбапенемам.

Оценили долю штаммов с фенотипом множественной устойчивости (к 3 и более классам АМП), при этом бета-лактамы АМП рассматривали как три различных класса: аминопеницилины, ЦРС и карбапенемы. Множественная устойчивость к АМП (multidrug resistance, MDR) выявлена у 10,1% (75 штаммов), при этом высокая частота MDR-штаммов была наиболее характерна для сероваров *S. Infantis* (67,9%) и *S. Typhimurium* (21,6%). Для *S. Enteritidis* и других сероваров этот показатель не превышал 7,0% (Таблица 13). Большинство MDR-штаммов *Salmonella* (80,0%) были устойчивы к трем классам АМП.

Профили множественной устойчивости большинства штаммов включали тетрациклин (67 из 75 штаммов, 89,3%) и хинолоны (67 штаммов, 86,7%), у половины штаммов – триметоприм/сульфаметоксазол (34 штаммов, 45,3%) и хлорамфеникол (32 штамма, 42,7%), более, чем у трети штаммов – аминопеницилины (29 штаммов 38,7%). Значительно реже профили MDR-штаммов включали ЦРС (11 штаммов 14,7%) и аминогликозиды (7 штаммов, 9,3%) (Приложение 1). Выявлены три штамма *Salmonella*, устойчивые к пяти классам АМП (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Bredeney*) и один штамм *S. Typhimurium*, устойчивый к шести классам АМП.

В ходе исследования выявлены особенности чувствительности и резистентности к АМП, характерные для определенных сероваров *Salmonella* (серовароспецифические особенности) (Таблица 13, рисунки 3 и 4, Приложение 1).

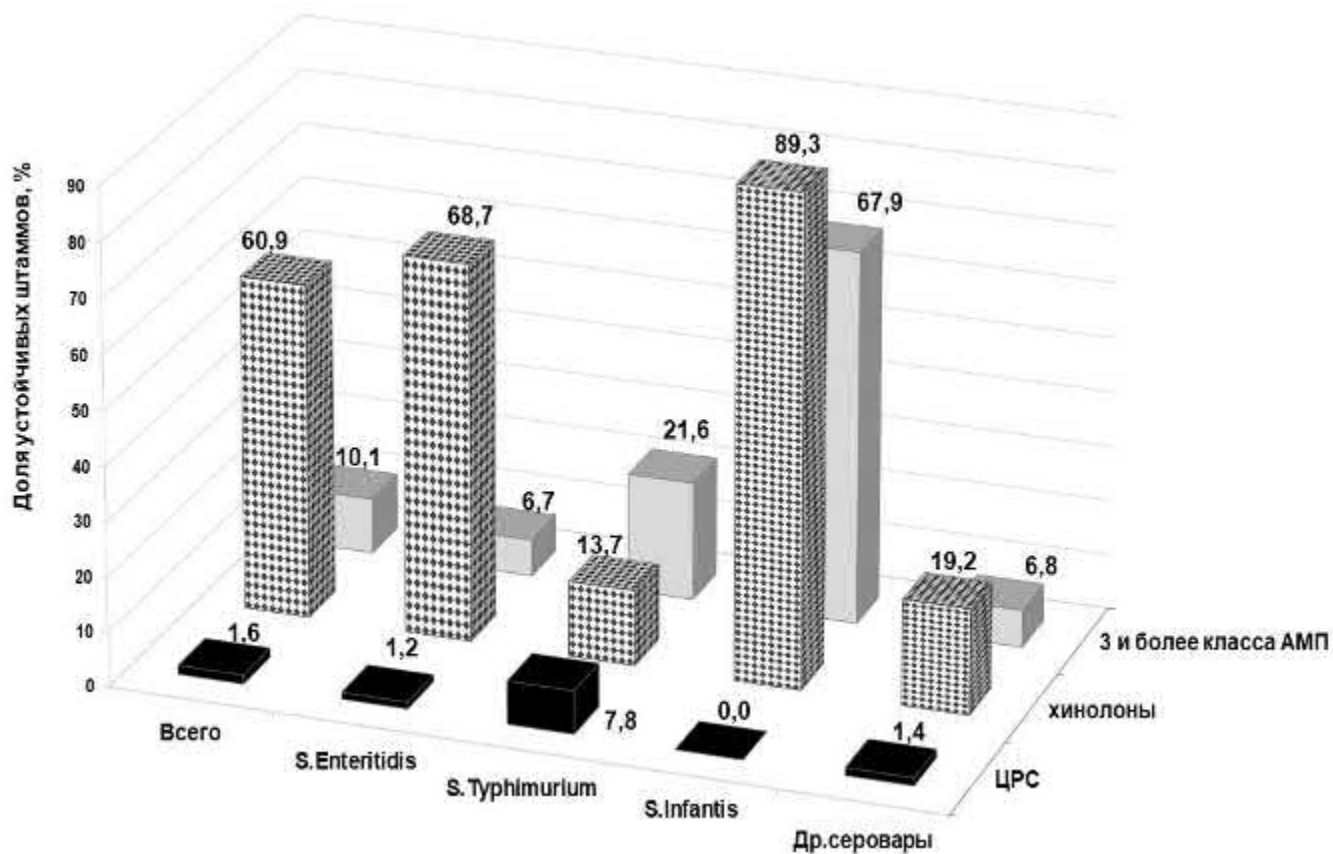


Рисунок 3 – Клинически значимая устойчивость к АМП штаммов *Salmonella* различных сероваров, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-19 гг. (% устойчивых штаммов)  
Примечание: ЦРС – цефалоспорины расширенного спектра

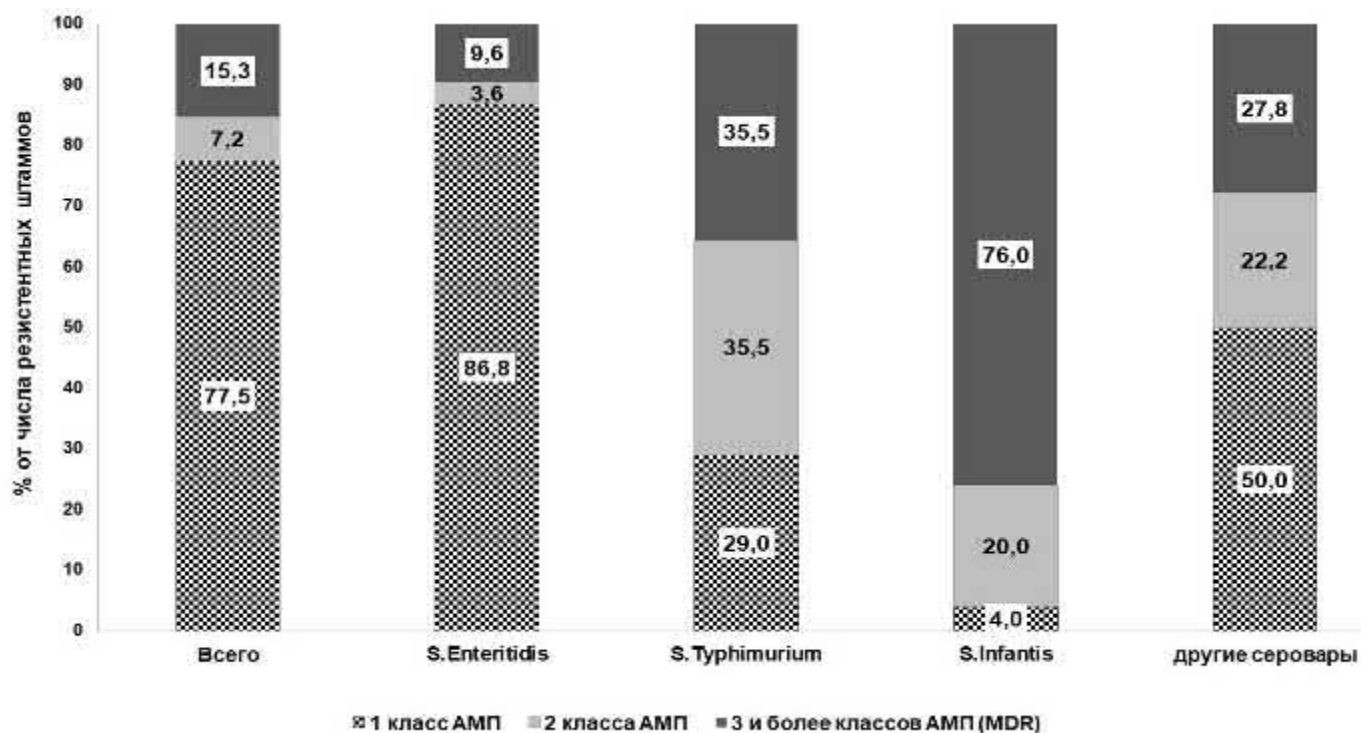


Рисунок 4 – Структура популяции штаммов *Salmonella*, устойчивых к АМП, по количеству маркеров резистентности

При анализе внимание уделяли клинически значимой резистентности, под которой подразумевали устойчивость к хинолонам и ЦРС (АМП широкого спектра, используемым в медицине для лечения инфекций различной локализации и этиологии, в том числе сальмонеллезной), а также множественную устойчивость к 3 и более классам АМП (MDR), поскольку именно эти показатели учитываются в первую очередь при проведении мониторинга антибиотикорезистентности у *Salmonella* в рамках ведущих национальных систем надзора стран ЕС и США.

Для штаммов серовара *S. Enteritidis* характерна устойчивость к хинолонам (резистентны 68,7% исследованных штаммов); доля штаммов, устойчивых к ЦРС составила 1,2%, к другим АМП – не превышала 7,0%, MDR-штаммов – менее 7,0%. В резистентной популяции выявлен ведущий фенотип: 86,8% из числа устойчивых штаммов *S. Enteritidis* характеризовались устойчивостью к одному классу АМП, практически все – к хинолонам. Среди резистентных MDR-штаммы составляли менее 10,0%, выявлен преобладающий профиль резистентности (24 штамма из 40; 60,0% от всех MDR-штаммов) – устойчивость к хинолонам, хлорамфениколу и тетрациклину.

У штаммов второго по частоте выделения серовара *S. Typhimurium* отмечена значительная частота устойчивости ко многим классам АМП: ампициллину (43,1%), тетрациклинам (41,2%), триметоприм/сульфаметоксазолу (15,7%), хинолонам (13,7%), самая высокая среди сероваров доля штаммов, устойчивых к ЦРС – 7,8%. Доля MDR-штаммов *S. Typhimurium* в 3 раза превышала этот показатель у штаммов *S. Enteritidis* и составила 21,6%. Структура резистентной популяции *S. Typhimurium* примерно на треть была представлена MDR-штаммами, преобладающие фенотипы не выявлены, но обращает на себя внимание, что большинство из них включали ампициллин (25 из 31 устойчивого штамма; 80,6%).

Серовар *S. Infantis* отличался максимальными показателями устойчивости к хинолонам (89,3% штаммов), тетрациклинам (82,1%), триметоприм/сульфаметоксазолу (64,3%) и множественной устойчивости (67,9%). В тоже время у штаммов этого серовара не выявлена устойчивость к ЦРС и хлорамфениколу. В отличие от других сероваров резистентная популяция почти на 80,0% была



представлена MDR-штаммами, большинство из которых (16 из 19 MDR-штаммов; 84,2%) имели идентичный профиль устойчивости, включающий хинолоны, триметоприм/сульфаметоксазол и тетрациклин.

Штаммы *Salmonella* других сероваров в целом отличались достоверно более низкими показателями устойчивости к АМП, чем три ведущих серовара. Устойчивые к АМП штаммы составили 24,7%, резистентность к отдельным классам АМП колебалась от 1,4% (ЦРС) до 19,2% (хинолоны), множественная устойчивость выявлена менее, чем у 7,0% штаммов. Тем не менее, структура резистентной популяции почти на треть (27,8%) была представлена MDR-штаммами, профиль устойчивости которых в большинстве случаев включал хинолоны.

Результаты исследования вошли в базу данных «*Salmonella*-Museum: антибиотикочувствительность и механизмы резистентности», свидетельство о регистрации № 2019622278 (Приложение 3).

### **2.3 Уровни чувствительности штаммов *Salmonella* к азитромицину, нитрофурантоину, колистину и тигециклину**

Выборочно оценили чувствительность штаммов *Salmonella* к антибиотикам, определение чувствительности к которым в условиях практической бактериологической лаборатории затруднено в связи с необходимостью использования методов определения МПК или отсутствием критериев интерпретации: азитромицину, нитрофуранам, колистину, тигециклину.

Азитромицин – препарат из группы макролидов, который обладает активностью в отношении *Salmonella* и *Shigella* и рекомендован для лечения сальмонеллезной и шигеллезной инфекции, в тоже время в нормативных документах отсутствуют критерии интерпретации. EUCAST и КР предлагают считать чувствительными к азитромицину штаммы, относящиеся к «дикому» типу (значение ЕСOFF – МПК 16,0 мг/л). В нашем исследовании методом градиентной диффузии (Е-тесты BioMerieux, Франция) определили МПК азитромицина для 363 штаммов (Рисунок 5).

Полученные значения МПК азитромицина распределились от 2,0 до 256,0 мг/л. К «дикому» типу относились 357 штаммов (98,3%), для 6 штаммов значения

МПК превысили 16,0 мг/л, эти штаммы были расценены как устойчивые (1,7%). Таким образом, азитромицин характеризовался высокой активностью в отношении штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге, так как МПК<sub>90</sub> составила 8,0 мг/л, доля устойчивых не превышала 2,0%. Наши данные совпадают с результатами, представленными EUCAST при изучении более чем 12 тыс. штаммов *Salmonella*, выделенных в лабораториях европейских стран, которые показали, что МПК азитромицина для 98,0% штаммов составляет от 2,0 до 8,0 мг/л (<https://mic.eucast.org/Eucast2/regShow.jsp?Id=35158>).

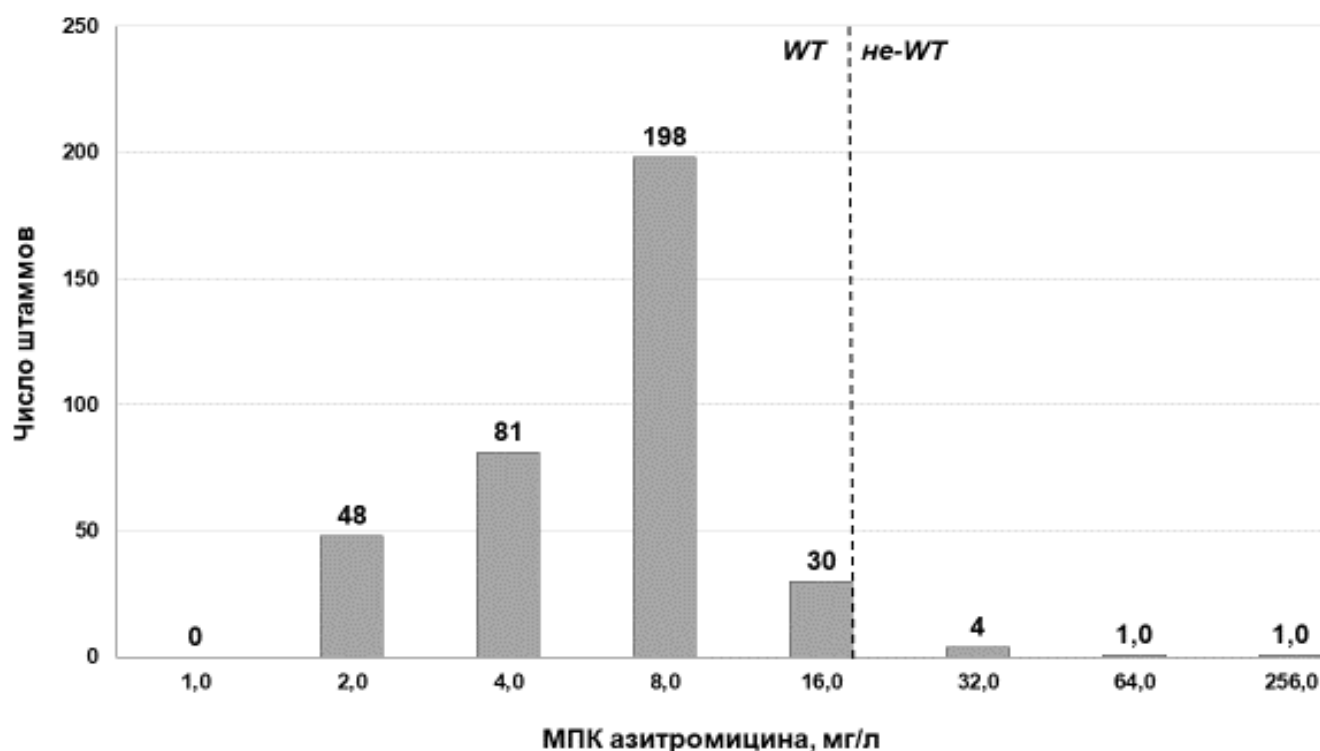


Рисунок 5 – Распределение штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг., по значениям МПК азитромицина (n = 363)

Примечание: WT– «дикий» тип, ECOFF = 16,0 мг/л.

В тоже время, в нашем исследовании для 30 штаммов МПК азитромицина имело пограничное значение равное ECOFF (16,0 мг/л), то есть эти штаммы требовали особого внимания при интерпретации и тестирования альтернативными методами для исключения технической и биологической вариабельности результатов, что затруднительно в условиях обычной бактериологической лаборатории.

В РФ для лечения ОКИ, в том числе сальмонеллезной этиологии, широко используют АМП из класса нитрофуранов (нифуроксазид). Клинические критерии интерпретации разработаны EUCAST для нитрофурантоина и только для штаммов *E. coli*, выделенных при инфекциях мочевых путей: S  $\leq$  64 мг/л или  $\geq$  11 мм; R > 64,0 мг/л или < 11 мм) ([http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Rationale\\_documents/Nitrofurantoin\\_rationale\\_1.0.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Rationale_documents/Nitrofurantoin_rationale_1.0.pdf)). Некоторые зарубежные авторы при изучении штаммов *Salmonella* расценивали МПК 64,0 мг/л и выше как низкую чувствительность к нитрофуранам [88, 112]. В ходе исследования методом градиентной диффузии (Е-тесты BioMerieux, Франция) мы оценили чувствительность к нитрофурантоину 435 штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге (Рисунок 6).

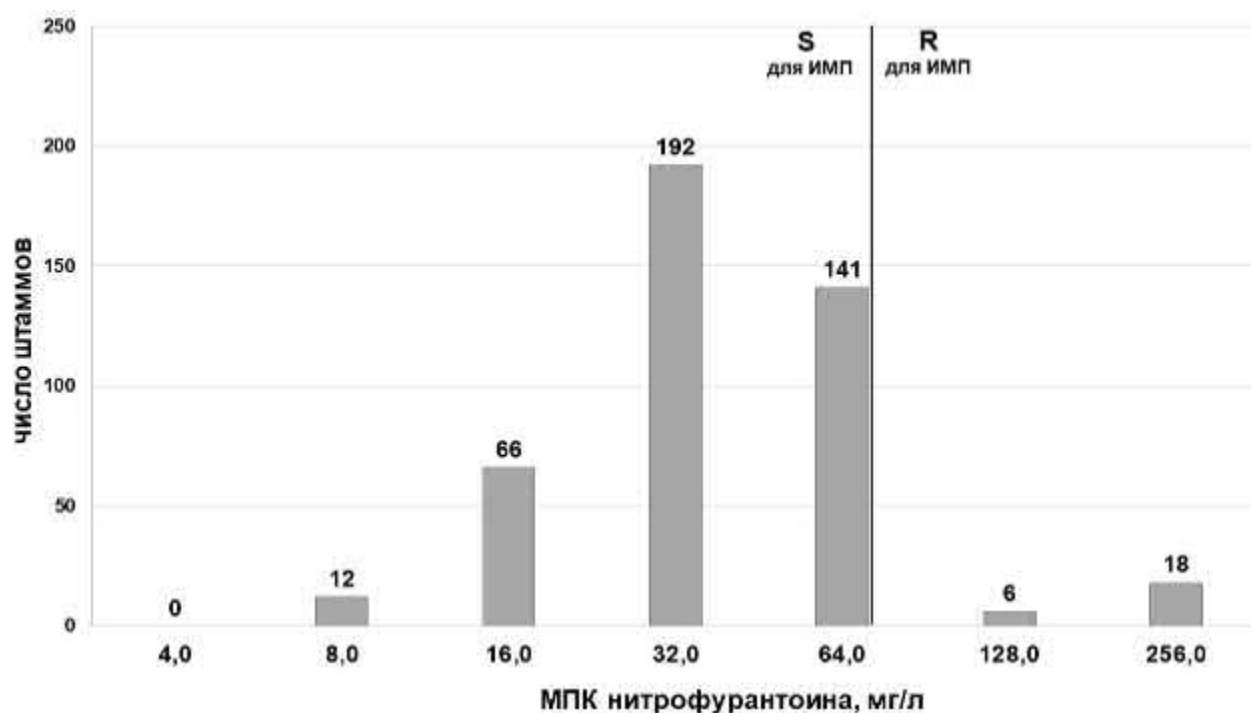


Рисунок 6 – Распределение штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг., по значениям МПК нитрофурантоина (n = 435)

Примечание: S  $\leq$  2,0 мг/л, R > 2 мг/л, критерии установлены только для штаммов *E. coli*, выделенных при инфекциях мочевых путей (ИМП)

При использовании критериев, приведенных в рекомендациях EUCAST и КР для штаммов, выделенных из мочи, 94,5% штаммов ориентировочно можно оценить, как чувствительные (категория «S») к этой группе препаратов, 5,5% – как устойчивые (категория «R»). В тоже время доля штаммов с МПК 64,0 мг/л

(пограничная концентрация) составила 32,4%. Учитывая возможность технической и биологической вариабельности результатов тестирования, нам представлялось целесообразным эту часть штаммов отнести в группу с низким уровнем чувствительности к нитрофуранам, которая в таком случае составила 37,9%. Одновременное тестирование штаммов методом определения МПК и ДДМ показало, что для штаммов с МПК 32,0-64,0 мг/л (чувствительных согласно МПК) разброс диаметров зон ингибиции роста составил от 9 до 13 мм, то есть штаммы попадали как в категорию чувствительных ( $S \geq 11$  мм), так и резистентных ( $R > 11$  мм) при тестировании ДДМ. Это свидетельствует о том, что ДДМ не позволяет адекватно оценить чувствительность штаммов *Salmonella* к этому классу АМП.

Выборочно оценили чувствительность штаммов *Salmonella* к препаратам резерва при лечении инфекций, вызванных полирезистентными штаммами – колистину и тигециклину. Изучение устойчивости к этим АМП в рутинной практике затруднено необходимостью использовать для тестирования только метода последовательных разведений в жидкой среде. Распределение штаммов *Salmonella* по значениям МПК колистина представлено на рисунке 7.

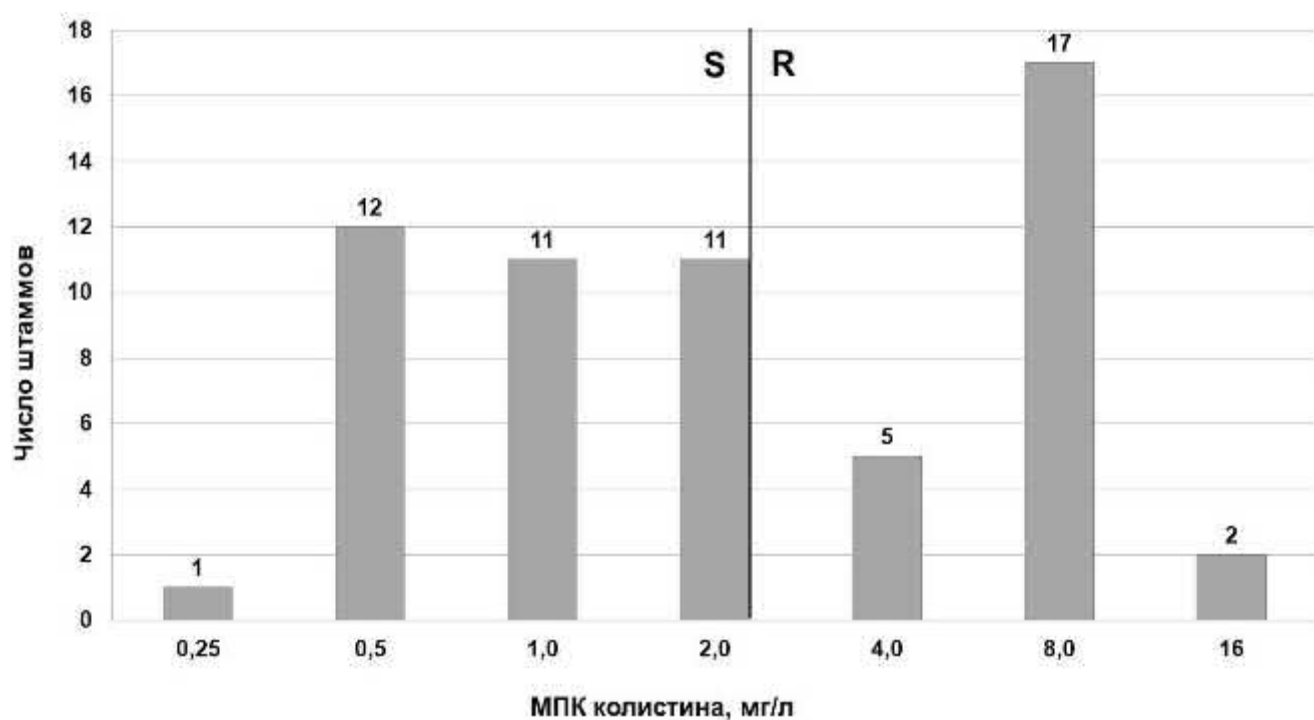


Рисунок 7 – Распределение штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг., по значениям МПК колистина (n = 59)

Примечание: WT – «дикий» тип,  $S \leq 2,0$  мг/л,  $R > 2$  мг/л, ECOFF для бактерий рода *Salmonella* не установлен

EUCAST установил значения ECOFF колистина только для штаммов *E.coli* (2,0 мг/л), для *Salmonella* этот показатель не разработан. Некоторые зарубежные авторы предложили относить к «дикой популяции» штаммы с МПК колистина  $\leq 2,0$  мг/л [320]. В нашем исследовании диапазон колебаний МПК колистина составил от 0,25 до 16,0 мг/л, при этом 35 штаммов из 59 изученных (59,3%) относились к категории «S» и имели МПК от 0,25 до 2,0 мг/л. К категории «R» относились 24 штамма (40,7%) со значениями МПК колистина 4,0-16,0 мг/л: все изученные штаммы *S. Enteritidis* (14 штаммов), а также по одному штамму *S. Typhimurium*, *S. Isangi*, *S. Fyris* и *S. Gallinarum*. В базе данных EUCAST представлены значения МПК колистина для 274 штаммов *Salmonella* (только штаммы серовара *S. Dublin* и *S. Enteritidis*), причем для 73,0% штаммов МПК составляет от 4,0 до 16,0 мг/л (категория «R») (<https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=396&Specium=-1>).

При изучении распределения штаммов *Salmonella* по МПК тигециклина, диапазон колебаний значений МПК составил от 0,12 до 2,0 мг/л (Рисунок 8).

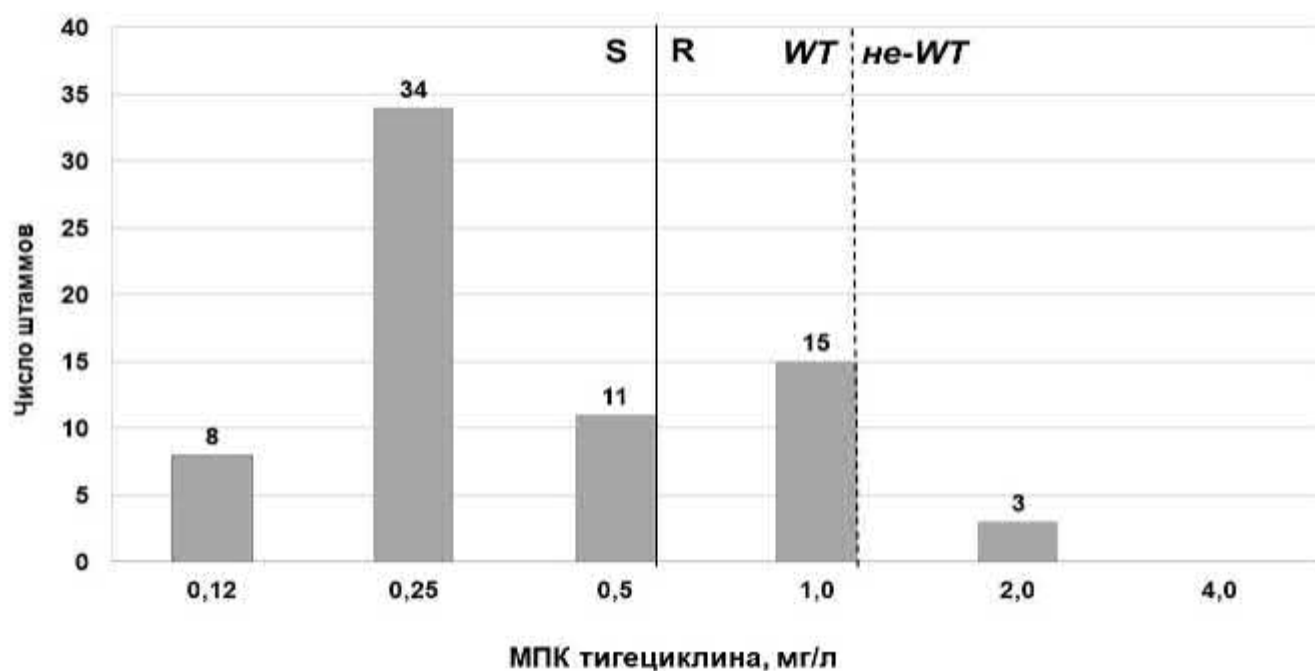


Рисунок 8 – Распределение штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг., по значениям МПК тигециклина (n = 71)

Примечание: WT – «дикий» тип, S  $\leq 0,5$  мг/л, R  $> 0,5$  мг/л, ECOFF = 1,0 мг/л

Практически все изученные нами штаммы относились к «дикому» типу (ECOFF  $\leq 1,0$  мг/л), для трех штаммов МПК составило 2,0 мг/л. Согласно клиническим пограничным значениям 53 штаммов (74,6%) относились к категории «S», а 18 штаммов (25,4%) – к категории «R». Согласно данным EUCAST 12,2% изученных европейских штаммов *Salmonella* относились к клинической категории «R»; к «дикому» типу принадлежали более 98,0% штаммов (МПК 0,125–1,0 мг/л), выявлены штаммы с МПК 2,0 мг/л. ([http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Rationale\\_documents/Tigecyclinerationale1.0.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Rationale_documents/Tigecyclinerationale1.0.pdf)).

#### **2.4 Распределение штаммов «дикой» популяции *Salmonella* по МПК цефотаксима, триметоприм/сульфаметоксазола и хлорамфеникола**

В ходе исследования оценили уровни чувствительности штаммов *Salmonella*, относящихся к «дикому» типу (у которых фенотипическими методами не было выявлено резистентности к данным препаратам), к некоторым АМП, используемым при лечении сальмонеллезов в качестве препаратов выбора или альтернативных: цефотаксиму, триметоприм/сульфаметоксазолу и хлорамфениколу. Для этого изучили распределение чувствительных штаммов по значениям МПК перечисленных препаратов.

Значения МПК цефотаксима для чувствительных штаммов колебались от менее 0,06 до 1,0 мг/л, и для 98,8% штаммов соответствовали «дикому» типу (ECOFF  $\leq 0,5$  мг/л). В тоже время 4 штамма, которые относились к клинической категории «S», тем не менее имели МПК 1,0 мг/л, то есть формально не являлись штаммами «дикого» типа (Рисунок 9). По данным EUCAST, полученным при изучении более 13 тыс. штаммов *Salmonella*, для 93,0% штаммов «дикого» типа МПК цефотаксима составляет 0,125-0,25 мг/л. (<https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=44&Specium=-1>). Следует отметить, что значение ECOFF цефотаксима, установленное EUCAST для штаммов *Salmonella* (0,5 мг/л), выше, чем для других энтеробактерий (0,125-0,25 мг/л), что свидетельствует о том, что уровень природной чувствительности штаммов *Salmonella* к цефотаксиму несколько ниже, чем у других энтеробактерий.

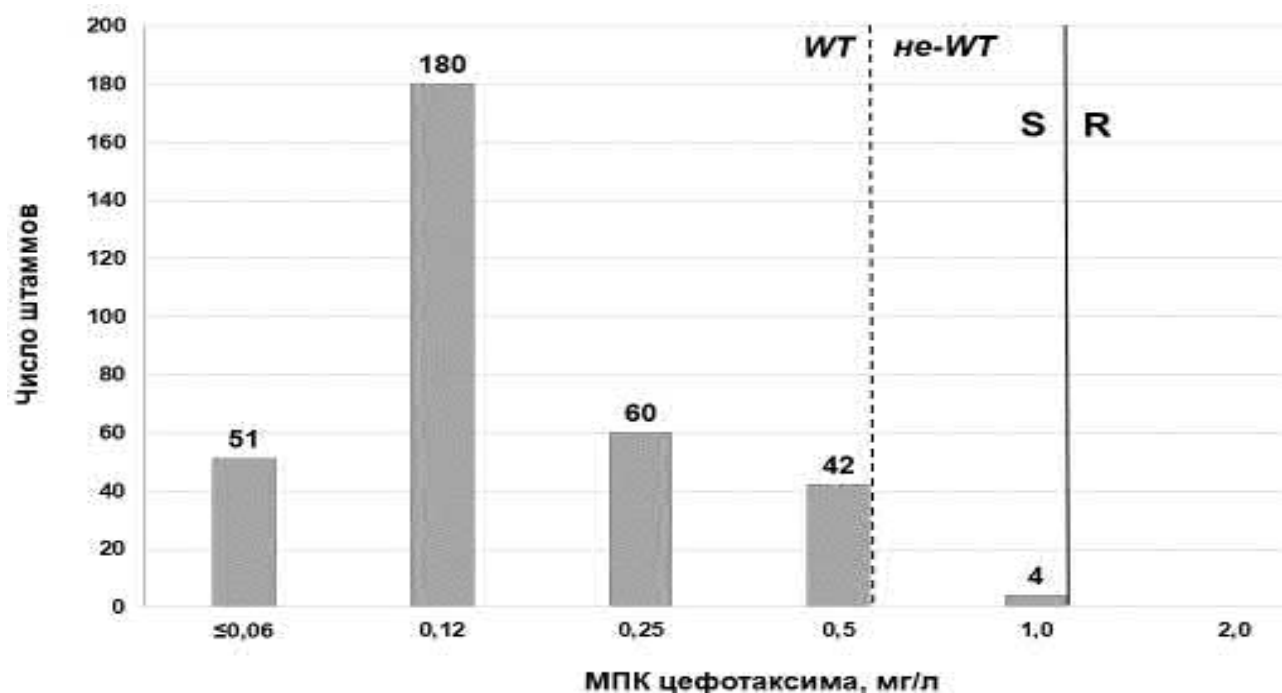


Рисунок 9 – Распределение штаммов *Salmonella* «дикого» типа, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг., по значениям МПК цефотаксима (n = 337)

Примечание: WT – «дикий» тип, S ≤1,0 мг/л, R >2,0 мг/л, ECOFF = 0,5 мг/л

Все штаммы, относящиеся к категории «S» к триметоприм/сульфаметоксазолу (Рисунок 10), соответствовали критериям «дикого» типа: значения МПК колебались от менее 0,06 до 1,0 мг/л, и для 95,40% штаммов не превышали 0,5 мг/л.

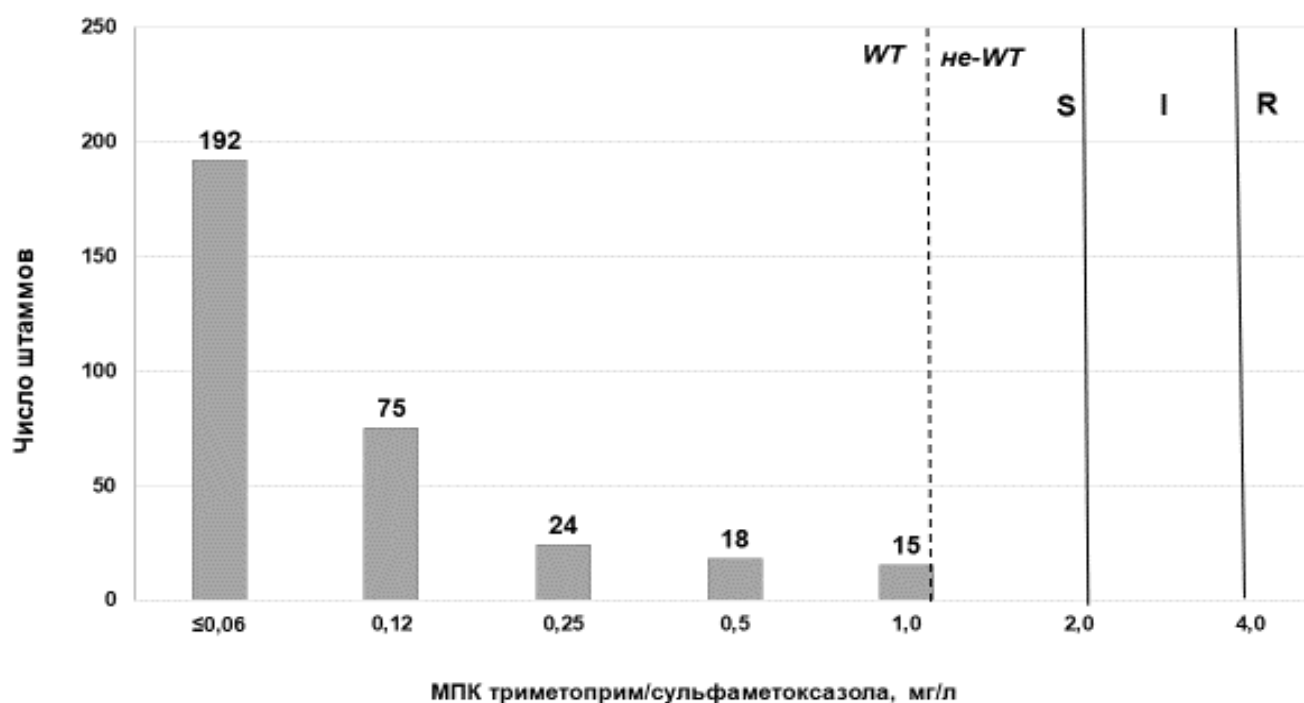


Рисунок 10 – Распределение штаммов *Salmonella* «дикого» типа, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг., по значениям МПК триметоприм/сульфаметоксазола (n = 324)

Примечание: Соотношение триметоприм: сульфаметоксазол - 1:19, пограничные значения представлены по триметоприму

WT – «дикий» тип, S ≤2,0 мг/л, I = 4,0 мг/л, R > 4 мг/л, ECOFF = 1,0 мг/л

По данным EUCAST для 95,0% европейских штаммов *Salmonella*, относящихся к «дикому» типу, МПК также попадали в диапазон от 0,06 до 0,5 мг/л. (<https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=45&Specium=-1>).

Учитывая высокую долю штаммов, устойчивых к современным АМП, используемым для лечения сальмонеллезов, оценили уровень чувствительности штаммов *Salmonella* к «старому» АМП – хлорамфениколу (Рисунок 11).

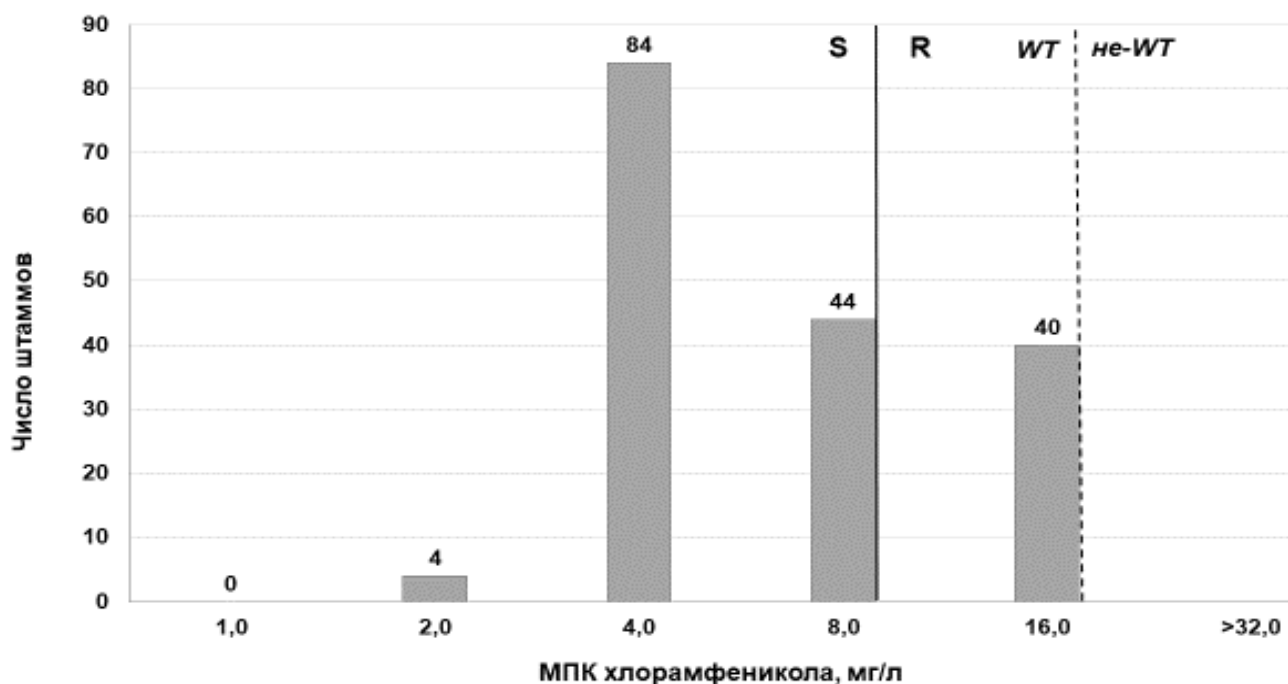


Рисунок 11 – Распределение штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг., по значениям МПК хлорамфеникола (n = 172)

Примечание: WT – «дикий» тип, S ≤ 8,0 мг/л, R > 8,0 мг/л, ECOFF= 16,0 мг/л

Следует отметить, что согласно значениям ECOFF «дикая» популяция *Salmonella* может включать штаммы, относящиеся к клинической категории «R» (МПК 16,0 мг/л). В нашем исследовании значения МПК хлорамфеникола колебались от 2,0 до 16,0 мг/л, причем доля штаммов с пограничным для «дикого» типа значением ECOFF была высока – 23,3%. Несмотря на то, что эти штаммы формально относились к «дикому» типу, в соответствии с клиническими критериями их следовало расценивать как «резистентные» к хлорамфениколу. Наши результаты коррелируют с данными EUCAST, согласно которым значения МПК этого препарата для 95,0% штаммов *Salmonella* «дикого» типа в европейских странах,



составляли 4,0-8,0 мг/л (<https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=236&Specium=-1>), что свидетельствует об относительно низкой природной чувствительности *Salmonella* к данному препарату.

## **2.5 Сравнение показателей устойчивости к антимикробным препаратам штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в периоды 2014-2019 гг. и 2002-2005 гг.**

Для выявления тенденций развития резистентности в популяции штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в разные временные периоды, сравнили данные, полученные в 2014-2019 гг. с материалами Северо-Западного регионального центра по сальмонеллезам (лаборатория кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера), полученными в ходе совместной научно-практической работы с клинической инфекционной больницей № 30 имени С.П. Боткина (г. Санкт-Петербург). В 2002-2005 гг. изучены 562 штамма *Salmonella* spp., выделенных в Санкт-Петербурге от пациентов, госпитализированных с гастроэнтероколитами. Штаммы относились к 32 сероварам, на долю ведущего серовара *S. Enteritidis* приходилось 80,1% штаммов (450 штаммов). Устойчивость к одному и более классам АМП обнаружена у 16,7% (95% ДИ 13,9-20,0) исследованных штаммов, 83,3% штамма (95% ДИ 80,0-86,1) оставались чувствительны ко всем тестируемым АМП. По суммарным данным для всех сероваров доля штаммов, устойчивых к отдельным классам АМП, была невысока: к тетрациклину – 9,6% (95% ДИ 7,4-12,3), аминопенициллинам – 9,3% (95% ДИ 7,1-11,9), хлорамфениколу – 7,3% (95% ДИ 5,4-9,7), хинолонам – 5,9% (95% ДИ 4,2-8,1), триметоприм/сульфаметоксазолу – 1,1% (95% ДИ 0,5-2,3), аминогликозидам и ЦРС – по 0,4% (95% ДИ 0,1-1,3) (Приложение 2).

По сравнению с 2002-2005 гг. в период 2014-2019 гг. выявлен достоверный рост суммарной устойчивости в 4 раза (с 16,7 до 65,5%), штаммов, устойчивых к хинолонам в 10 раз (с 5,9 до 60,9%), к триметоприм/сульфаметоксазолу в 6 раз (с 1,1 до 6,0%). Четырехкратный рост устойчивости к ЦРС (с 0,4, до 1,6%, соответственно) не являлся статистически значимым, тем не менее, обращает на

себя внимание тот факт, что в 2002-2005 гг. у штаммов доминирующего серовара *S. Enteritidis* не было выявлено устойчивости к ЦРС (такие штаммы были представлены сероварами *S. Virchow* и *S. Newport*), в то время как в период 2014-2019 гг. было выделено 12 устойчивых штаммов *Salmonella*, включая 7 штаммов серовара *S. Enteritidis* (Рисунок 12, Приложение 2).

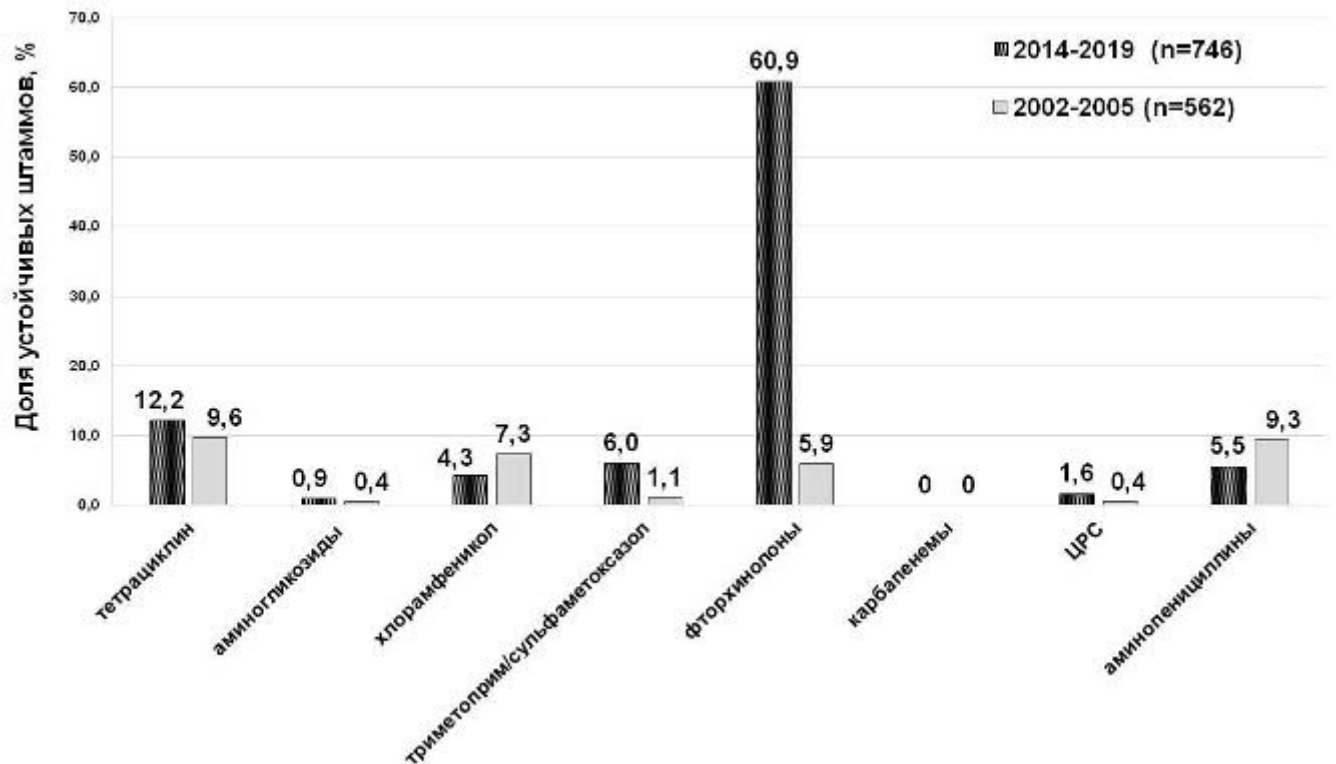


Рисунок 12 – Доля штаммов *Salmonella*, устойчивых к АМП, выделенных в Санкт-Петербурге в 2002-2005 гг. и 2014-2019 гг.

Не выявлены достоверные изменения доли штаммов, устойчивых к «старым» АМП, тем не менее, в 2014-2019 гг. отмечено снижение показателей устойчивости к аминопенициллинам (с 9,3 до 5,5% штаммов, соответственно) и хлорамфениколу (с 7,3 до 4,3%). В 2002-2005 гг. не было выявлено достоверных различий в показателях устойчивости к большинству АМП у штаммов *Salmonella* различных сероваров, в то время как в 2014-2019 гг. в популяции возбудителя сформировались выраженные серовароспецифические особенности.

### ГЛАВА 3 Характеристика чувствительности к антимикробным препаратам штаммов *S. Typhi*, возбудителя брюшного тифа, выделенных в РФ в 2005-2019 гг.

Показатели заболеваемости брюшным тифом в РФ в последние годы не превышали 0,03-0,1 на 100 тыс. населения [41, 42], заболевания брюшным тифом возникали как в виде спорадических единичных случаев, так и случаев групповых заболеваний – от небольших очагов (2-4 заболевших) до массовых случаев (Рисунок 13).

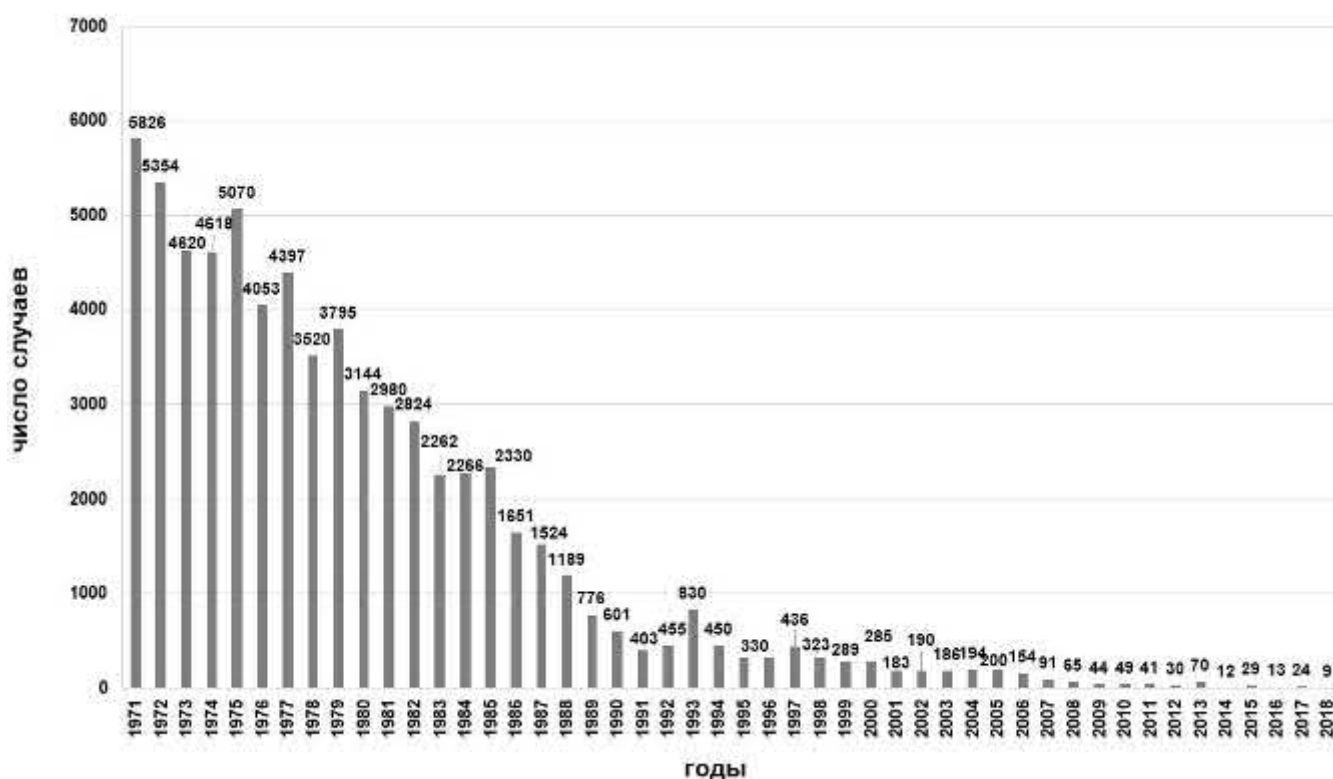


Рисунок 13 – Динамика заболеваний брюшным тифом в РФ с 1971 по 2018 гг (число случаев)

По данным Роспотребнадзора за период с 2005 г. по 2018 г. в РФ было зарегистрировано 798 случаев брюшного тифа. Начиная с 2007 г. ежегодно регистрировали менее 100 случаев, с 2009 г. – менее 50 (в 2013 г. большая часть заболеваний зарегистрированы при возникновении случая групповой заболеваемости в общежитии трудовых мигрантов в Московской области).

В Санкт-Петербурге в 2005-2007 гг. подъем заболеваемости брюшным тифом был обусловлен регулярным возникновением случаев заболевания среди лиц без

определенного места жительства, ведущих асоциальный образ жизни [13]. Вследствие проживания в антисанитарных условиях и поздней изоляции асоциальных заболевших граждан в этот период сформировались и зарегистрированы более 10 эпидемических очагов, включавших до 4 заболевших. В 2006 г. в городе возникла крупная вспышка брюшного тифа среди курсантов Военно-космической академии им. А.Ф. Можайского с числом пострадавших более 200 человек в результате употребления инфицированных на пищеблоке готовых блюд [6]. Проведение комплексных профилактических мероприятий, осуществляемых различными ведомствами, позволило в 2007 г. снять эпидемиологическую напряженность с брюшным тифом в Санкт-Петербурге. В настоящее время спорадическая заболеваемость в РФ формируется за счет завозных случаев заболевания, возникающих у лиц, посещавших страны, эндемичные по брюшному тифу (иностранных студентов и трудовых мигрантов, туристов).

Согласно приказам № 88 от 17.03.2008 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» и № 1116 от 01.12.2017 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на базе лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера организован референс-центр по мониторингу за возбудителем брюшного тифа. Штаммы *S. Typhi*, выделенные на административных территориях РФ в бактериологических лабораториях больниц и «Центров гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, поступают в референс-центр для дальнейшего изучения.

### **3.1 Общая характеристика чувствительности штаммов *S. Typhi***

#### **к антимикробным препаратам**

В исследование включили 299 штаммов *S. Typhi* из рабочей коллекции референс-центра по мониторингу за возбудителем брюшного тифа, выделенных на 22 административных территориях РФ в 2005-2019 гг. из различного клинического материала как при спорадических, так и при групповых случаях

брюшного тифа. Все штаммы *S. Typhi* имели культурально-ферментативные свойства типичные для возбудителя брюшного тифа: в отличие от *Salmonella* других сероваров ферментировали до кислоты (без газа) глюкозу, маннит, мальтозу и сорбит, слабо продуцировали сероводород. Подавляющее большинство штаммов (95,5%) принадлежали к биовару 1 (ферментировали ксилозу и не ферментировали арабинозу), 4,5% штаммов – к биовару 2 (отрицательная реакция на средах с арабинозой и ксилозой). Все штаммы обладали хорошо развитым Vi-антигеном, причем 36 штаммов (12,0%) содержали Vi-антиген в большом количестве, что не позволяло провести серологическую идентификацию O-группы, так как штаммы не давали агглютинации в сальмонеллезной сыворотке O9. Все изученные штаммы были подвижны и имели H- антиген первой фазы d.

Список тестируемых АМП включал препараты различных классов, рекомендованные для лечения брюшного тифа в качестве препаратов выбора или альтернативных препаратов (ципрофлоксацин, азитромицин, цефотаксим, ампициллин, хлорамфеникол); являющиеся индикаторами клинически важных механизмов резистентности (амоксициллин/клавулановая кислота, цефтазидим, налидиксовая кислота, пefлоксацин); перспективные в отношении штаммов с множественной устойчивостью (меропенем); препараты, устойчивость к которым может быть использована в качестве эпидемиологической метки штамма (аминогликозиды, тетрациклин).

Структура изученной популяции штаммов возбудителя брюшного тифа была представлена как чувствительными (S) к АМП (9,4%), так и устойчивыми (R) штаммами (90,6%) (Таблица 14). Выявлена резистентность штаммов *S. Typhi* к фторхинолонам (89,6% штаммов), триметоприм/сульфаметоксазолу (2,7%), ампициллину (2,7%), хлорамфениколу (2,3%) и тетрациклину (3,0%). Штаммы, устойчивые к ЦРС, карбапенемам, аминогликозидам и азитромицину, не обнаружены.

Таблица 14 – Чувствительность к АМП штаммов *S. Typhi*, выделенных в РФ в 2005-2019 гг. (n = 299)

Антимикробные препараты		Клиническая категория чувствительности	Число штаммов		
			абс.	%	95% ДИ
Бета-лактамы	Аминопенициллины	Чувствительные	291	97,3	94,8-98,6
		Устойчивые	8	2,7	1,4-5,2
	ЦРС	Чувствительные	299	100	98,7-100
		Устойчивые	0	0	0-1,3
	Карбапенемы	Чувствительные	299	100	98,7-100
		Устойчивые	0	0	0-1,3
Фторхинолоны		Чувствительные	31	10,4	7,4-14,3
		Устойчивые:	268	89,6	85,7-92,6
		- устойчивость низкого уровня: МПК ципрофлоксацина 0,12-0,5 мг/л	246	82,3	77,5-86,2
		-устойчивость высокого уровня: МПК ципрофлоксацина 4,0-32,0 мг/л	22	7,3	4,9-10,9
Аминогликозиды		Чувствительные	299	100	98,7-100
		Устойчивые	0	0	0-1,3
Хлорамфеникол		Чувствительные	292	97,7	95,2-98,9
		Устойчивые	7	2,3	1,4-5,2
Триметоприм/ сульфаметоксазол		Чувствительные	291	97,3	94,8-98,6
		Устойчивые	8	2,7	1,1-4,8
Тетрациклины		Чувствительные	290	97,0	94,4-98,4
		Устойчивые	9	3,0	1,6-5,6
Азитромицин		Чувствительные: МПК <sub>50</sub> – 4,0 мг/л, МПК <sub>90</sub> – 8,0 мг/л	285 <sup>1</sup>	100	98,7-100
		Устойчивые	0	0	0-1,3

Примечание: ДИ – доверительный интервал, чувствительные штаммы соответствуют категории «S», устойчивые – категории «R»; ЦРС – цефалоспорины расширенного спектра; <sup>1</sup>определили МПК азитромицина для 285 штаммов *S. Typhi*

### 3.2 Уровни чувствительности штаммов *S. Typhi* к клинически значимым антимикробным препаратам

В ходе исследования у 89,6% штаммов *S. Typhi* выявлена устойчивость к хинолонам – препаратам «первой линии» при лечении брюшного тифа. При определении чувствительности *S. Typhi* к хинолонам оценивали три препарата из этой группы (ципрофлоксацин, пефлоксацин и налидиксовую кислоту), результаты интерпретировали согласно рекомендациям EUCAST (версия 9.0) и российским Клиническим рекомендациям (версия 2018 гг.) [20, 163]. К категории устойчивых (R) относили штаммы *S. Typhi* с МПК ципрофлоксацина  $> 0,06$  мг/л (значение соответствует «эпидемиологической точке отсечения», ECOFF, для «дикой» популяции штаммов *S. Typhi*). МПК ципрофлоксацина определяли методом градиентной диффузии с использованием E-теста (bioMeriux) и MICЕ-теста (Oxoid, Великобритания). Для скрининга устойчивых штаммов ДДМ согласно КР использовали диск пефлоксацина (5 мкг), расценивали как устойчивые ко всем фторхинолонам штаммы с диаметром зоны менее 24 мм. Для повышения достоверности исследования в тестирование включили налидиксовую кислоту как высокочувствительный индикатор наиболее распространенного (хромосомного) механизма резистентности к хинолонам: МПК более 16,0 мг/л и зона задержки роста вокруг диска менее 16 мм указывали на вероятный хромосомный механизм устойчивости.

У 31 чувствительного штамма *S. Typhi* значения МПК ципрофлоксацина колебались от 0,006 до 0,06 мг/л (Рисунок 14). У большей части штаммов (246 штаммов, 82,3%) выявлена устойчивость к хинолонам низкого уровня: МПК ципрофлоксацина составляла от 0,125 до 0,5 мг/л. Устойчивость высокого уровня (МПК от 4,0 до 32,0 мг/л и более) отмечена у 22 штаммов (7,3%). Установлено, что МПК<sub>50</sub> ципрофлоксацина составляла 0,125 мг/л; МПК<sub>90</sub> – 0,25 мг/л.

Учитывая тот факт, что налидиксовая кислота является высокочувствительным маркером хромосомной резистентности к хинолонам у грамотрицательных бактерий, в ходе исследования оценили чувствительность к

этому препарату не только диско-диффузионным методом, но и определяя МПК: МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> составили 256,0 мг/л и более (Рисунок 15).

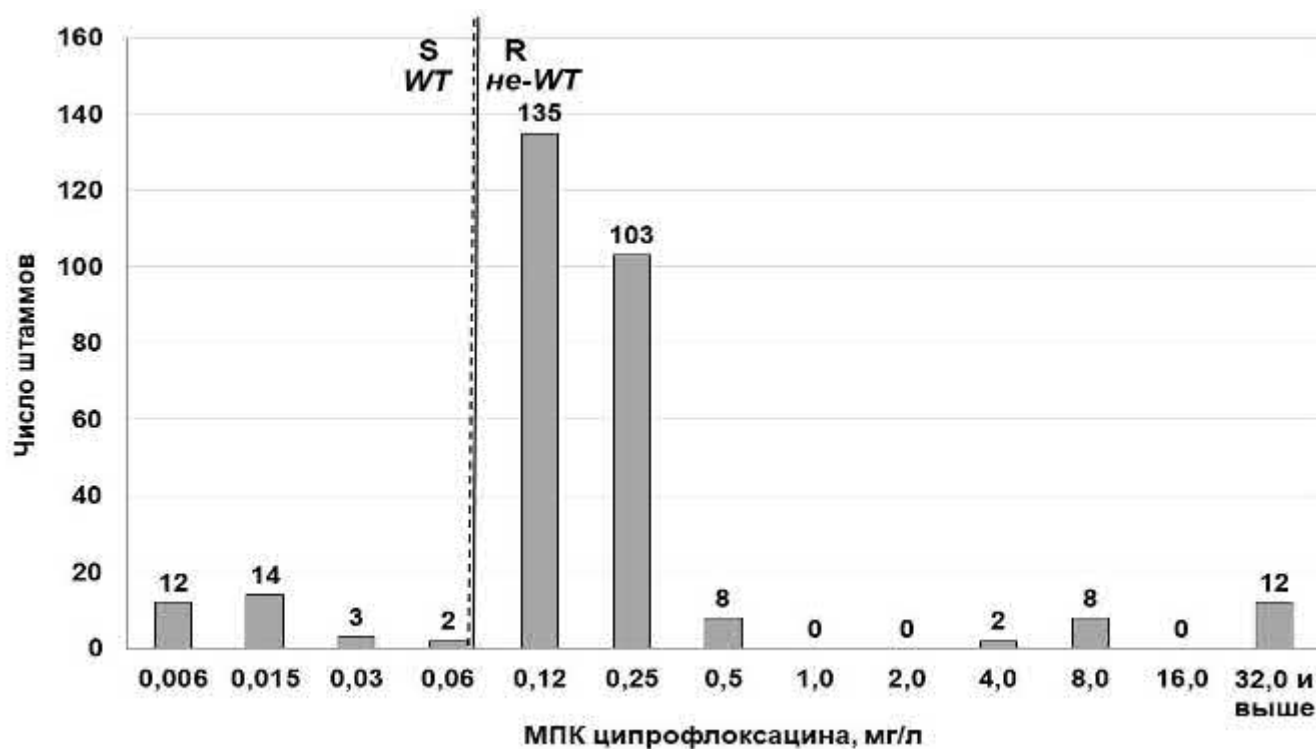


Рисунок 14 – Распределение штаммов *S. Typhi*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2005-2019 гг., по значениям МПК ципрофлоксацина (n = 299)

Примечание: WT– «дикий» тип, S ≤ 0,06 мг/л, R > 0,06 мг/л, ECOFF ≤ 0,06 мг/л

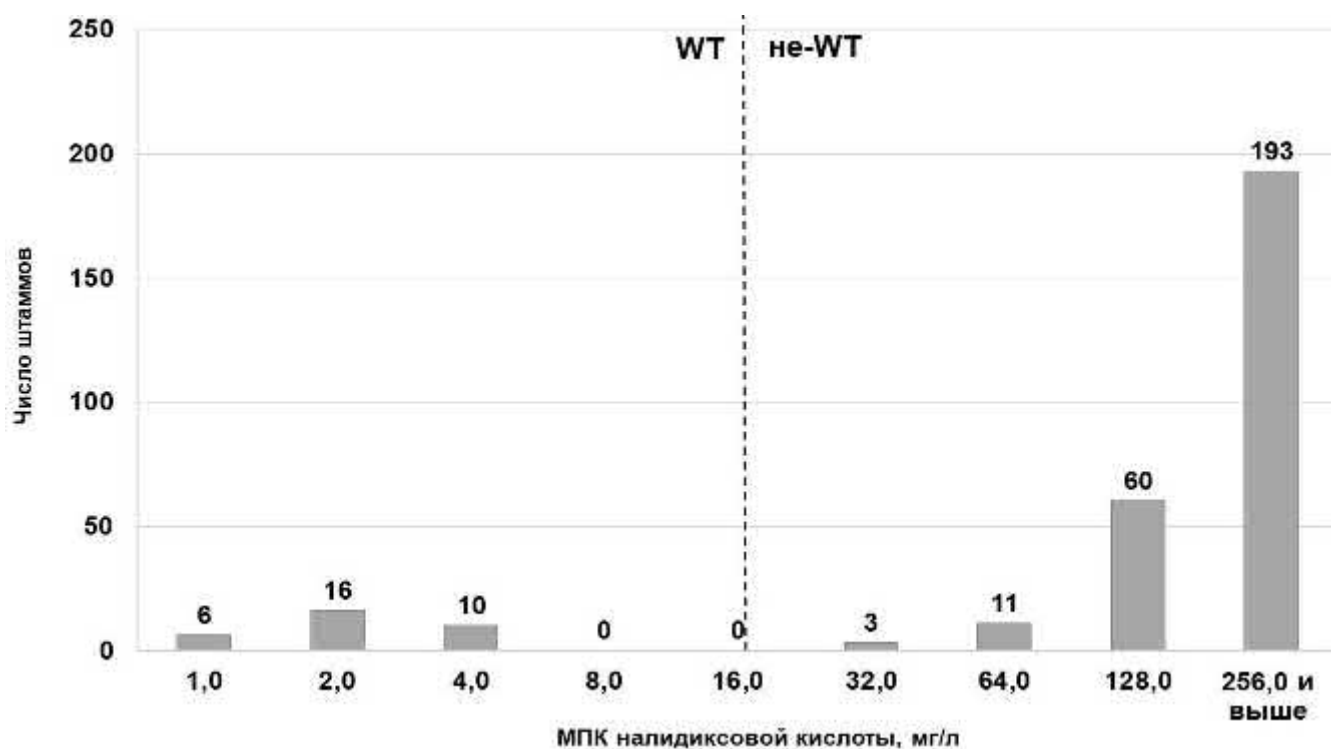


Рисунок 15 – Распределение штаммов *S. Typhi*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2005-2019 гг., по значениям МПК налидиксовой кислоты (n = 299)

Примечание: WT– «дикий» тип, ECOFF ≤ 16,0 мг/л



Для штаммов *S. Typhi* устойчивость низкого уровня расценивается как клинически значимая, поскольку клиническая неэффективность фторхинолонов, используемых в стандартной дозировке, для лечения брюшного тифа, вызванного такими штаммами, подтверждена с позиций доказательной медицины. Некоторые авторы считают возможным использованием фторхинолонов (гatifлоксацина) в повышенной дозировке курсом 10-14 дней для лечения брюшного тифа, вызванного штаммами с устойчивостью низкого уровня.

У штаммов *S. Typhi* не выявлена устойчивость к ЦРС: МПК индикаторного препарата из этой группы (цефотаксима) колебалась от 0,03 до 0,5 мг/л, то есть все изученные штаммы относились к «дикий» популяции ( $ECOFF \leq 0,5$  мг/л). МПК<sub>50</sub> составляла 0,12 мг/л; МПК<sub>90</sub> – 0,25 мг/л. (Рисунок 16).

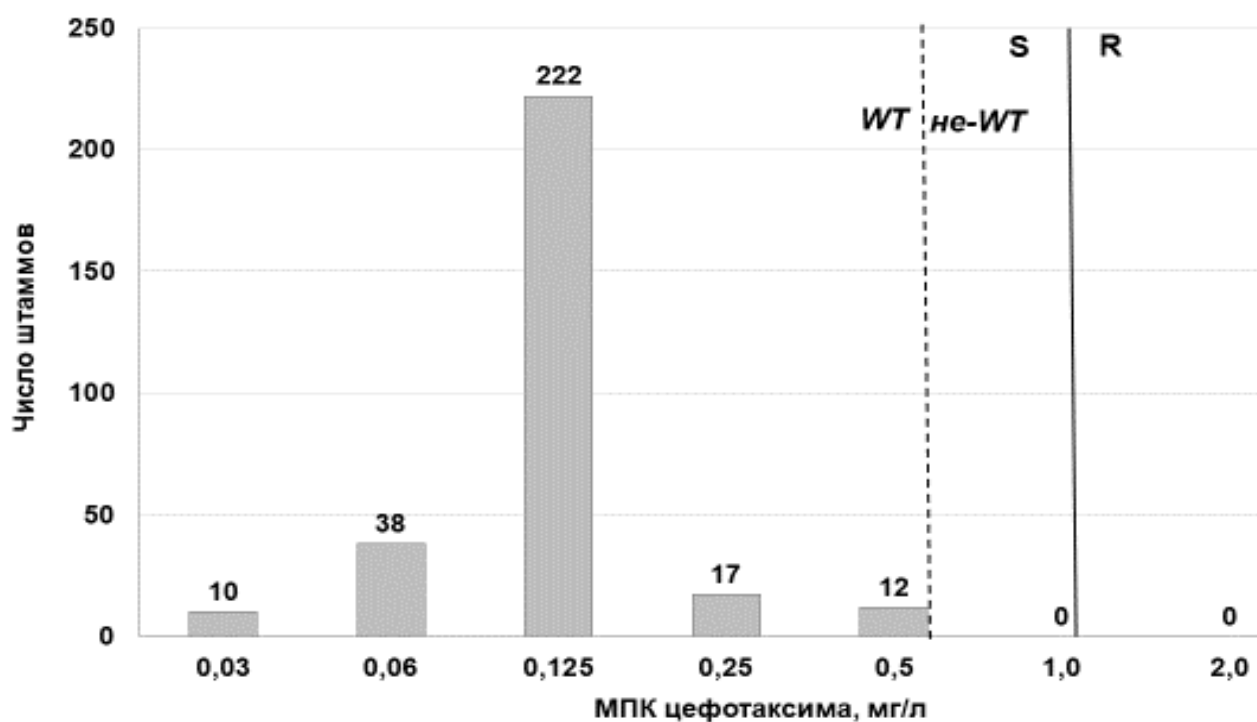


Рисунок 16 – Распределение штаммов *S. Typhi*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2005-2019 гг., по значениям МПК цефотаксима (n = 299)

Примечание: WT – «дикий» тип, S  $\leq 1,0$  мг/л, R  $> 2,0$  мг/л,  $ECOFF \leq 0,5$  мг/л

Для лечения брюшного тифа, вызванного штаммами с устойчивостью к хинолонам, в качестве альтернативного препарата рекомендовано использование азитромицина (АМП из группы макролидов). В тоже время определение чувствительности к этому препарату в лабораторных условиях затруднено,

поскольку в настоящее время отсутствуют критерии интерпретации (пограничные значения) чувствительности энтеробактерий к азитромицину. Согласно рекомендациям EUCAST и КР, возможно использование азитромицина для лечения брюшного тифа, если МПК для штамма возбудителя не превышает 16,0 мг/л (ЕСOFF для «дикий» популяции). В ходе исследования у 285 штаммов *S. Typhi* определили МПК азитромицина методом градиентной диффузии (Рисунок 17).

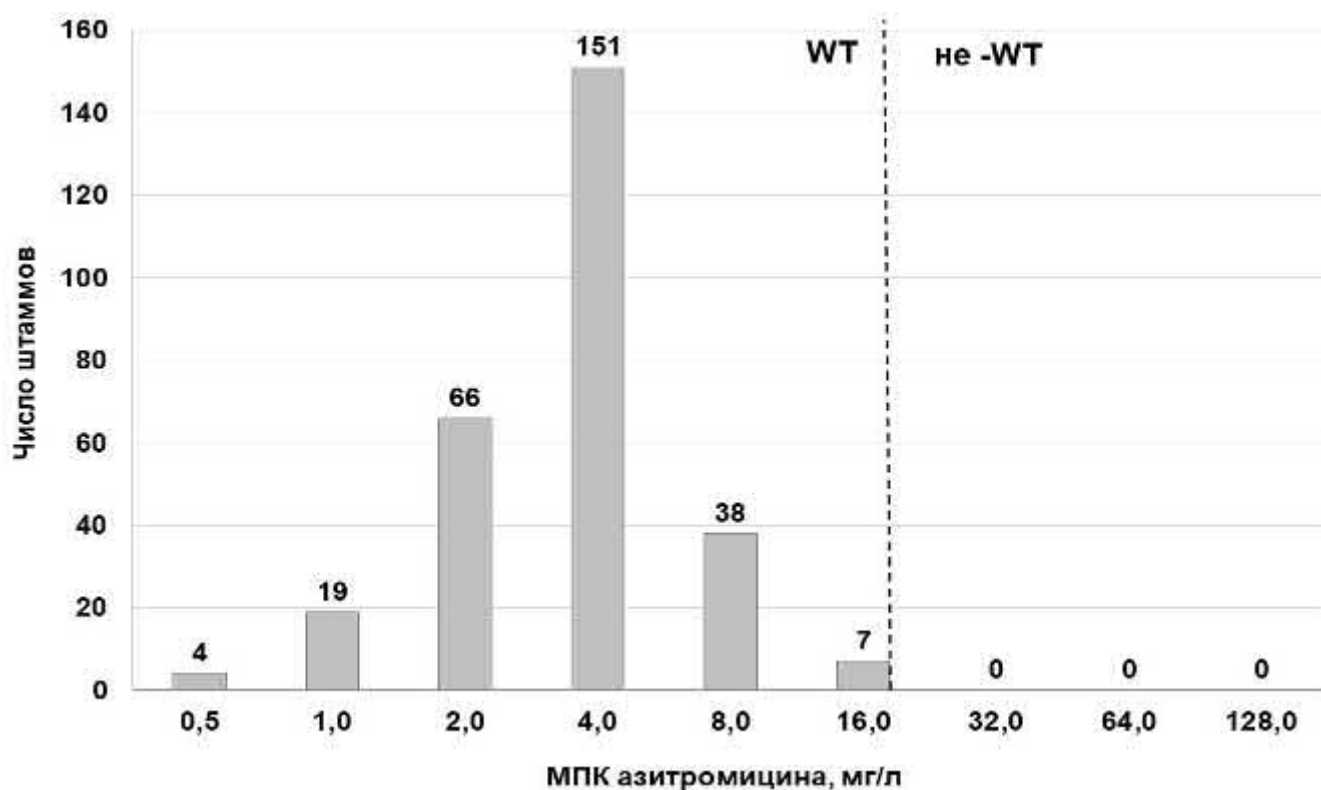


Рисунок 17 – Распределение штаммов *S. Typhi*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2005-2019 гг., по значениям МПК азитромицина (n = 285)

Примечание: WT– «дикий тип», ЕСOFF ≤ 16,0 мг/л

Установлено, что МПК<sub>50</sub> азитромицина составляла 4,0 мг/л, МПК<sub>90</sub> – 8,0 мг/л. Выявлено семь штаммов с «пограничным» значением МПК для дикой популяции 16,0 мг/л. Таким образом, все изученные штаммы возбудителя относились к «дикому» типу по чувствительности к азитромицину.

Доля штаммов, устойчивых к «старым» АМП (амипициллин, хлорамфеникол, триметоприм/сульфаметоксазол), использовавшимся ранее для лечения брюшного тифа, была невысока и выявлена у 7-8 штаммов. Следует отметить, что устойчивость к этим АМП встречалась только сочетано в составе

MDR-фенотипа вместе с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам. Для ампициллина МПК<sub>50</sub> составляла 0,5 мг/л, МПК<sub>90</sub> – 1,0 мг/л; хлорамфеникола - 2,0 мг/л и 4,0 мг/л, соответственно; триметоприм/сульфаметоксазола - 0,03 мг/л и 0,12 мг/л, соответственно (Рисунки 18-20). Таким образом, практически все изученные штаммы *S. Typhi* относились к «дикому» типу и характеризовались высокой чувствительностью к АМП, используемым ранее для лечения брюшного тифа.

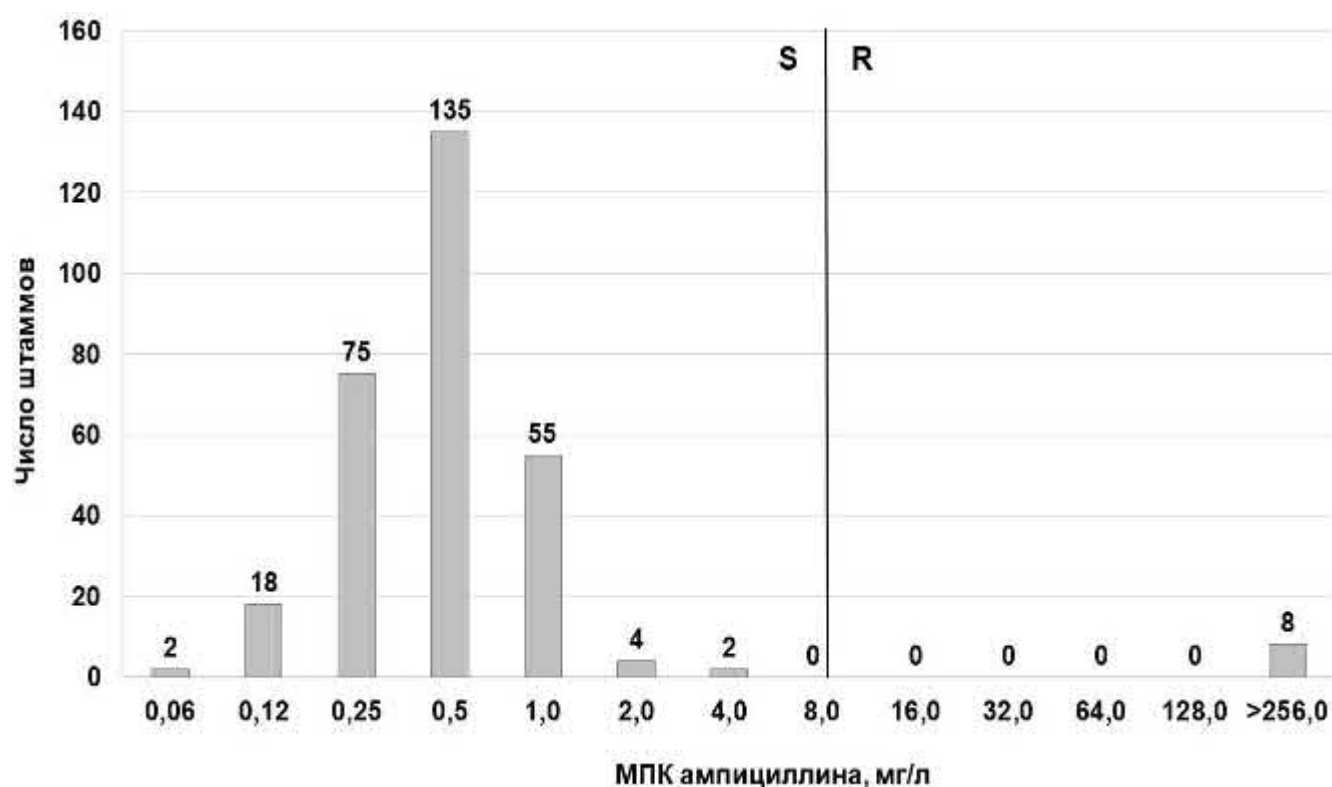


Рисунок 18 – Распределение штаммов *S. Typhi*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2005-2019 гг., по значениям МПК ампициллина (n = 299)

Примечание: S ≤ 8,0 мг/л, R > 8,0 мг/л, ЕСOFF для бактерий рода *Salmonella* не установлен

### 3.3 Фенотипы резистентности штаммов *S. Typhi*

Изученные штаммы по фенотипу резистентности к АМП распределились на 3 группы: чувствительные ко всем тестируемым АМП; устойчивые к хинолонам; устойчивые к нескольким группам АМП (хинолонам, ампициллину, хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу, тетрациклину), характеризующиеся MDR-фенотипом (multidrug resistance) (Таблица 15).

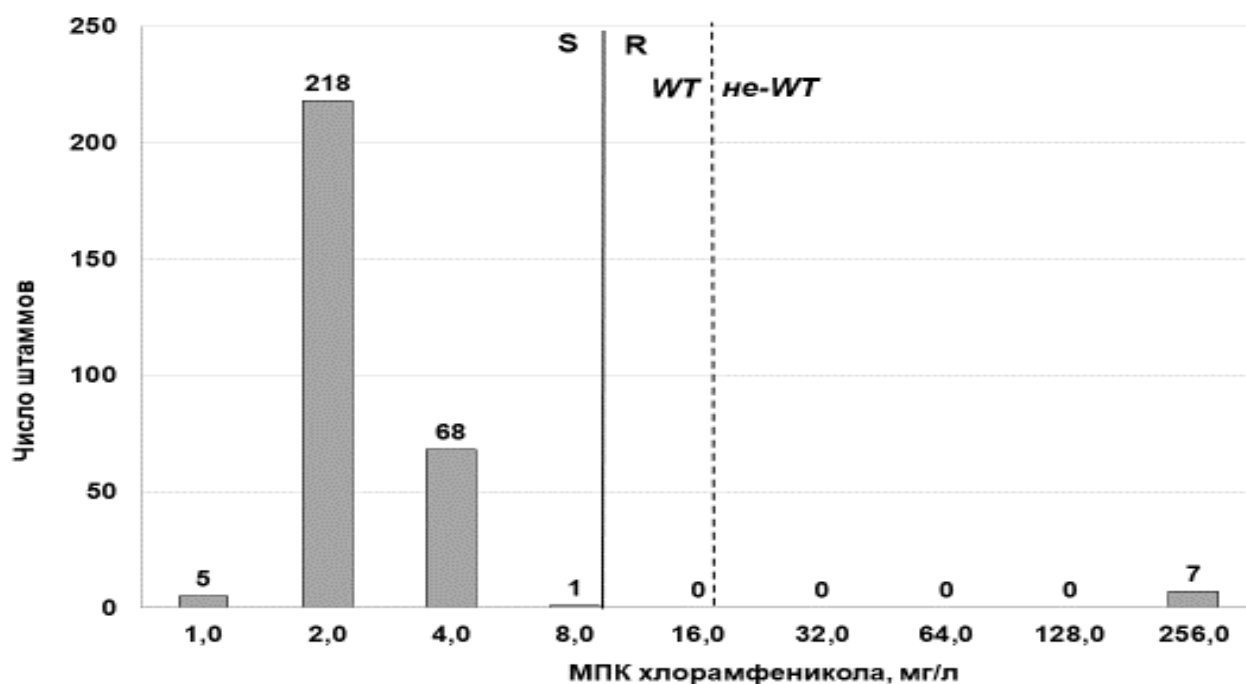


Рисунок 19 – Распределение штаммов *S. Typhi*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2005-2019 гг., по значениям МПК хлорамфеникола (n = 299)

Примечание: WT–«дикий тип», S ≤ 8,0 мг/л, R > 8,0 мг/л, ECOFF ≤ 16,0 мг/л

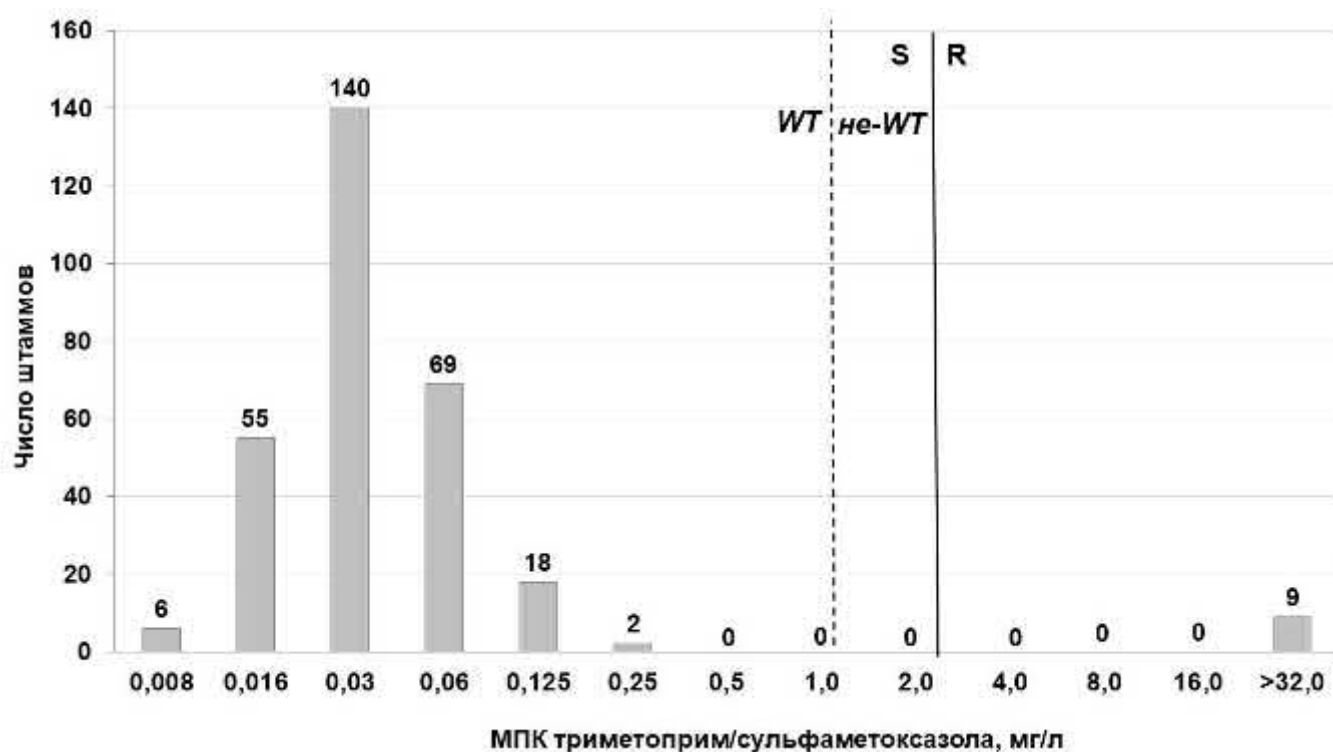


Рисунок 20 – Распределение штаммов *S. Typhi*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2005-2019 гг., по значениям МПК триметоприм/ сульфаметоксазола (n = 299)

Примечание: WT– «дикий тип», S ≤ 2,0 мг/л, R > 4,0 мг/л, ECOFF ≤ 1,0 мг/л

Таблица 15 – Структура популяции штаммов *S. Typhi*, выделенных на территориях РФ в 2005-2019 гг., по фенотипам чувствительности/резистентности к АМП (n = 299)

Характеристика чувствительности/резистентности	Штаммы		
	абс.	%	95% ДИ
Чувствительные	28	9,4	6,6 - 13,2
Устойчивые к 1 и более классам АМП	271	90,6	86,8 - 93,4
<b>Фенотипы резистентности:</b>			
к хинолонам	262	87,6	83,4 - 90,9
MDR:	9	3,0	1,6 - 5,6
- к хинолонам, ампициллину, хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу, тетрациклину	7	2,3	1,1- 4,8
- к хинолонам, ампициллину, триметоприм/сульфаметоксазолу, тетрациклину	1	0,3	0,1-1,9
-хинолонам, триметоприм/ сульфаметоксазолу, тетрациклину	1	0,3	0,1-1,9

Примечание: ДИ- доверительный интервал; MDR, multi drug resistance – множественная устойчивость

В популяции возбудителя брюшного тифа, выделенного в 2005-2019 гг. в РФ, чувствительные ко всем тестируемым АМП штаммы составили 9,4% и были выделены на девяти административных территориях: в Санкт-Петербурге (2005-2012 гг., 2014 г.), а также в Ленинградской (2009 г., 2014 г.), Московской (2011 г.), Иркутской (2005 г., 2012 г.), Орловской (2009 г.), Воронежской (2015 г.), Новгородской (2009 г.), Ульяновской (2010 г.) и Кемеровской (2012 г.) областях. Большинство штаммов в изученной коллекции характеризовалось устойчивостью к хинолонам (87,6%), но чувствительностью к другим АМП. Такие штаммы выделяли в течение всего изучаемого периода на всех территориях РФ.

Девять штаммов (3,0%) обладали устойчивостью к нескольким классам АМП. Из них семь штаммов (2,3%) характеризовались «классическим» для возбудителя брюшного тифа MDR-фенотипом, описанным в литературе: резистентность к АМП первой линии (ампициллину, хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу), тетрациклину и хинолонам (устойчивость низкого уровня) и были выделены в 2005 г. (Иркутская область), 2006 г. (Санкт-Петербург и Ленинградская область) и 2013 г. (Санкт-Петербург). Кроме того, в 2015 г. были выделены два штамма *S. Typhi*, отличающиеся от «классического» MDR-фенотипа: один штамм, устойчивый к ампициллину, триметоприм/

сульфаметоксазолу, тетрациклину и хинолонам (Санкт-Петербург), второй штамм – к хинолонам, триметоприм/сульфаметоксазолу и тетрациклину (Архангельская область). Эпидемиологическое расследование показало, что появление MDR-штаммов в РФ было связано с их «завозом» трудовыми мигрантами из стран Средней Азии (Таджикистана и Узбекистана), штамм в Архангельской области был выделен от студента индийского происхождения.

Таким образом, в РФ популяция возбудителя брюшного тифа, которая долгое время характеризовалась относительной мономорфностью, становится более гетерогенной за счет завоза штаммов с территорий эндемичных стран.

Учитывая особенности современной популяции *S. Typhi* в РФ, которая почти на 90,0% представлена штаммами, устойчивыми к фторхинолонам (препаратам выбора при лечении брюшного тифа), в нашей стране эти препараты не могут быть рекомендованы для стартовой эмпирической терапии брюшного тифа. Учитывая тот факт, что за период нашего наблюдения с 2005 г. в РФ не выявлено штаммов, устойчивых к ЦРС и азитромицину, эти препараты могут быть рекомендованы для стартовой терапии брюшного тифа.

Результаты исследования вошли в базу данных «*S.Typhi*-Museum: биологические свойства возбудителя брюшного тифа», свидетельство о регистрации базы данных № 2019621507 (Приложение 3).

## ГЛАВА 4 Характеристика молекулярных механизмов резистентности штаммов *Salmonella* к бета-лактамным антимикробным препаратам

В ходе исследования в популяции штаммов *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг., были выявлены штаммы, устойчивые к бета-лактамным АМП: 41 штамм, устойчивый к аминопенициллинам (сохраняющие чувствительность к ЦРС) и 12 штаммов, устойчивых к аминопенициллинам и ЦРС. Кроме того, для определения механизма резистентности в исследование были включены еще 6 штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС, выделенные в Санкт-Петербурге в 2008-2013 гг. Таким образом, общее число изученных штаммов, устойчивых к ЦРС, включенных в исследование, составило 18. Все штаммы *Salmonella* были чувствительны к карбапенемам: определение уровня чувствительности для 244 штаммов показало, что МПК меропенема составляла  $\leq 0,015$  мг/л для штаммов, чувствительных к ампициллину и ЦРС, и колебалась от 0,015 до 0,06 мг/л для БЛРС-продуцирующих штаммов.

### 4.1 Механизмы резистентности к аминопенициллинам

Из 41 штамма, устойчивого к аминопенициллинам, 22 штамма принадлежали к серовару *S. Typhimurium* (43,1% штаммов данного серовара), 13 штаммов – *S. Enteritidis* (2,2%), 2 штамма – *S. Infantis* (7,1%), 2 штамма – *S. Kentucky* (из 4 изученных штаммов данного серовара) по 1 штамму – *S. Bredeney* (из 4 штаммов) и *S. London* (из 3 штаммов). Ампициллин был единственным маркером устойчивости только у 9 штаммов (22,0%), у большинства штаммов (32,78,0%) он входил в профиль сочетанной устойчивости к 2-5 классам АМП.

Изучение механизма резистентности у штаммов, устойчивых к аминопенициллинам, не требовало выполнения дополнительных фенотипических тестов. Учитывая тот факт, что ведущим механизмом устойчивости энтеробактерий к бета-лактамам является продукция бета-лактамаз, проведена детекция фрагментов *bla*-генов наиболее распространенных бета-лактамаз широкого спектра (БЛШС) методом ПЦР в различных форматах.

Детекцию фрагментов генов  $bla_{TEM}$ ,  $SHV$ ,  $OXA$  проводили на амплификаторе CFX96 (BioRad, США) в мультиплексной ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с интеркалирующим красителем SYBR GREEN, используя ранее опубликованные праймеры (производства ЗАО Евроген, РФ) и ПЦР-смесь SsoAdvanced™Universal SYBR®Green Supermix (Bio-Rad, США). Специфичность полученных ампликонов оценивали, сравнивая кривые плавления продуктов амплификации исследуемых штаммов по сравнению с контрольными, продуцирующими известные бета-лактамазы. При трехкратном тестировании контрольных штаммов, продуцирующих детектируемые БЛШС, температуры плавления продуктов амплификации составили:

- для гена  $bla_{TEM-1}$  (штамм *E. coli* NCTC13351) – 87-87,4°C,
- для гена  $bla_{SHV-1}$  (*E. coli* NEQAS U2A1789) – 92,8-93°C,
- для гена  $bla_{OXA-1}$  (*S. Navana* 09-2913) – 80,8-81,2°C.

У 38 из 41 изученного штамма (92,7%) выявлен ген  $bla_{TEM-1}$ ; гены, кодирующие продукцию бета-лактамаз генетических семейств SHV и OXA не выявлены (Рисунок 21).

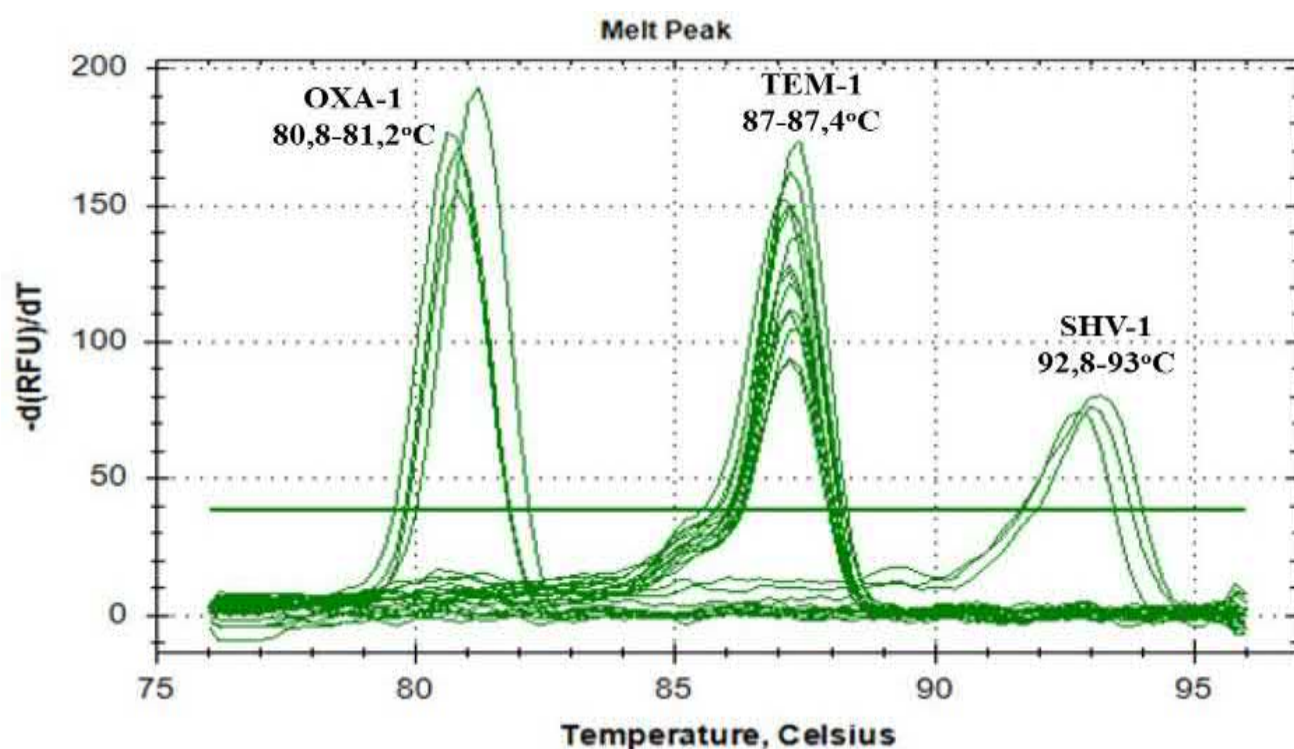


Рисунок 21 – Результаты детекции генов  $bla_{TEM}$ ,  $SHV$ ,  $OXA$  в мультиплексной ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с интеркалирующим красителем SYBR GREEN и анализом кривых плавления продуктов амплификации



## 4.2 Механизмы резистентности к цефалоспорином расширенного спектра

Основным механизмом устойчивости энтеробактерий к ЦРС является продукция бета-лактамаз. В тексте диссертационного исследования использовали термин «бета-лактамаза расширенного спектра» (БЛРС) в отношении любых бета-лактамаз, обуславливающих устойчивость к аминопенициллинам и ЦРС: то есть к БЛРС относили бета-лактамазы как молекулярного класса А (называя их «классическими» БЛРС), так и цефалоспориназы молекулярного класса С (называя их AmpC-цефалоспориназы). Изучение механизма резистентности к ЦРС включало фенотипическую детекцию БЛРС (скрининг «подозрительных» штаммов и выполнение фенотипического подтверждающего теста для предварительного определения молекулярного класса продуцируемой бета-лактамазы) и молекулярную детекцию *bla*-генов, кодирующих БЛРС различных генетических семейств и групп.

Для фенотипической детекции БЛРС нами был модифицирован алгоритм, предложенный EUCAST ([http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_170711.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf)) (Рисунок 22).



Рисунок 22 – Алгоритм фенотипической детекции БЛРС у штаммов *Salmonella*

Примечание: МПК – минимальная подавляющая концентрация, d – диаметр зоны подавления роста

Скрининг «подозрительных» штаммов проводили в рамках рутинного тестирования, используя два индикаторных АМП из группы ЦРС: цефтазидим (диск 10 мкг) и цефотаксим (диск 5 мкг). Для отбора «подозрительных» на продукцию БЛРС штаммов использовали критерии, предложенные в руководстве EUCAST по детекции механизмов резистентности и КР. Согласно критериям скрининга для дальнейшего исследования были отобраны 18 штаммов *Salmonella*, устойчивых к аминопеницилинам и ЦРС (цефтазидиму и цефотаксиму), которые были представлены сероварами: *S. Enteritidis* (7 штаммов), *S. Typhimurium* (7 штаммов), *S. Abony* (1 штамм), *S. Coeln* (1 штамм), *S. Virchow* (1 штамм), *S. Newport* (1 штамм).

Для постановки фенотипического теста, подтверждающего продукцию БЛРС на основе определения чувствительности бета-лактамаз к ингибиторам – клавулановой кислоте (ингибитор «классических» БЛРС) и клоксациллина (ингибитор AmpC-цефалоспориноаз), использовали метод комбинированных дисков и набор реагентов “ESBL+AmpC Screen Kit” (Rosco Diagnostica, Дания). Фенотипический тест выявил синергизм между ЦРС (цефотаксимом и/или цефтазидимом) и клавулановой кислотой у 16 штаммов: диаметр зоны подавления роста вокруг таблеток с комбинированными препаратами (цефтазидим+клавулановая кислота и цефотаксим+клавулановая кислота) более чем на 5 мм превышал диаметр зоны вокруг цефтазидима и цефотаксима. Это позволило предположить продукцию этими штаммами «классических» БЛРС молекулярного класса А.

У двух штаммов (*S. Newport* и *S. Enteritidis*) выявлен синергизм между ЦРС и клоксациллином: диаметр зоны подавления роста вокруг таблеток с комбинированными препаратами (цефтазидим+клоксациллин и цефотаксим+клоксациллин) более чем на 5 мм превышал диаметр зоны вокруг цефтазидима и цефотаксима), что указывало на вероятную продукцию этими штаммами AmpC-цефалоспориноаз молекулярного класса С.

Во избежание ложных результатов в том случае, если штамм одновременно продуцировал БЛРС молекулярных классов А и С, дополнительно оценили синергизм между цефепимом (не подвергающимся гидролизу цефалоспориноазами AmpC) и

клавулановой кислотой в тесте синергизма с двумя дисками (цефепим и амоксилав). Результаты совпали с результатами метода комбинированных дисков.

В рамках разработанного алгоритма кроме выявления чувствительности к ингибиторам, у штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС, определяли МПК цефокситина. Согласно рекомендациям EUCAST и КР, этот цефалоспорин может быть использован как высокочувствительный маркер для дополнительного скрининга штаммов энтеробактерий, продуцирующих AmpC-цефалоспорины. Так как МПК цефокситина может повышаться при других механизмах резистентности, не связанных с продукцией AmpC (снижение проницаемости клеточной стенки или продукция некоторых карбапенемаз), этот тест целесообразно использовать в комбинации с выявлением чувствительности к ингибиторам. Штаммы энтеробактерий, не продуцирующие AmpC, относятся к «дикому типу» и имеют МПК цефокситина  $\leq 8,0$  мг/л (ЕСOFF); штаммы, характеризующиеся гиперпродукцией хромосомных AmpC или продукцией плазмидных AmpC, имеют МПК цефокситина более 8,0 мг/л. В нашем исследовании 14 из 18 штаммов по чувствительности к цефокситину относились к «дикому» типу (МПК цефокситина  $\leq 8,0$  мг/л); у 4 штаммов МПК цефокситина превышала ЕСOFF и составила от 16,0 до 256,0 мг/л, что указывало на вероятную продукцию AmpC.

На следующем этапе у штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС, была проведена детекция фрагментов генов, кодирующих БЛРС различных генетических семейств, методом ПЦР в нескольких форматах. Гены, кодирующие БЛРС генетического семейства СТХ-М групп СТХ-М1, -2, -8/25 и -9, выявляли на амплификаторе CFX96 (BioRad, США) в мультиплексной ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с интеркалирующим красителем SYBR GREEN с последующим анализом кривых плавления продуктов амплификации исследуемых штаммов по сравнению с контрольными, продуцирующими детектируемые БЛРС. Использовали ранее опубликованные праймеры (производства ЗАО Евроген, РФ) и ПЦР-смесь SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, США).

Диапазон температур плавления продуктов амплификации контрольных штаммов при трехкратном тестировании составил:

- для фрагмента гена *bla*<sub>CTX-M1-like</sub> (штамм *S. Typhimurium* 04-7488) – 85,2°C;
  - для фрагмента гена *bla*<sub>CTX-M2-like</sub> (*S. Djakarta* 04-4335) - 88,8°C;
  - для фрагмента гена *bla*<sub>CTX-M8-like</sub> (*E. coli* BARN-ESBL-04) - 90,4-90,6°C;
  - для фрагмента гена *bla*<sub>CTX-M9-like</sub> (*Salmonella* 1,4,12:i:- 09-1987) – 89,4- 89,6°C
- (Рисунок 23).

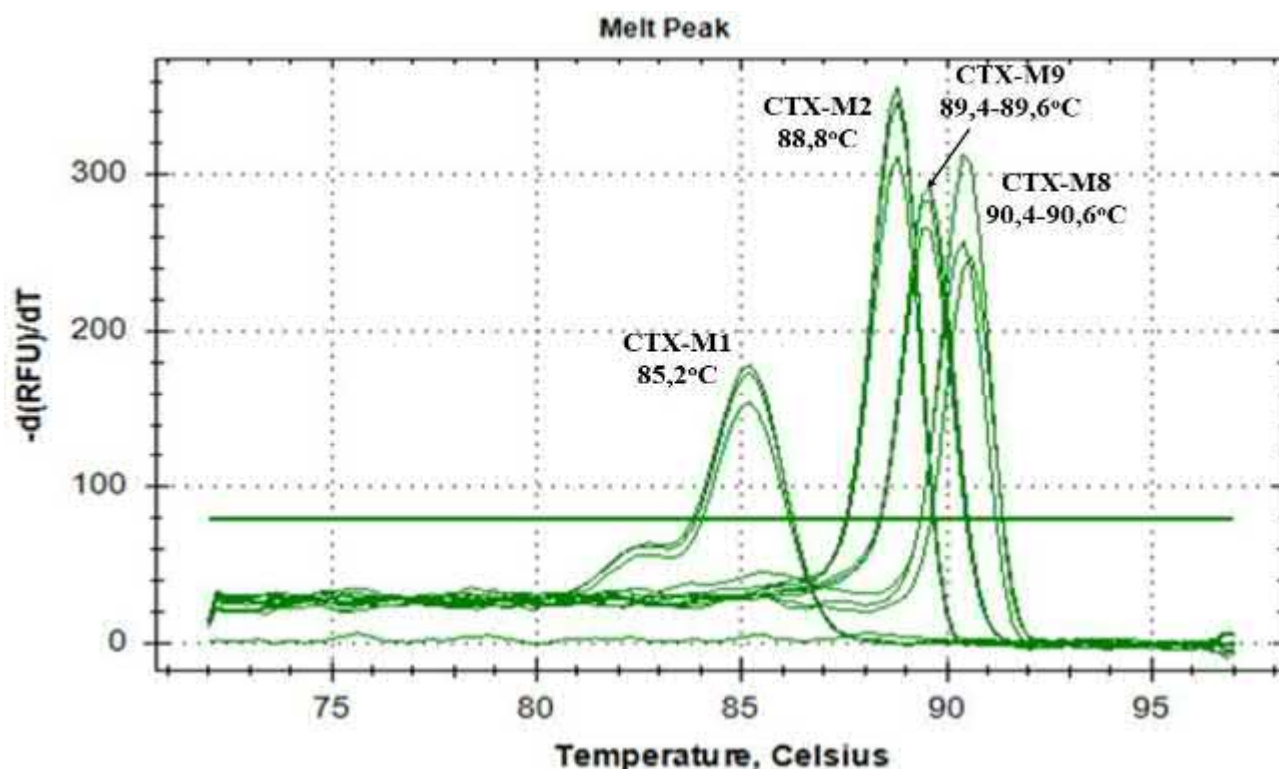


Рисунок 23 – Результаты детекции генов *bla*<sub>CTX-M1,-2,-8/25,-9</sub> в мультиплексной ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с интеркалирующим красителем SYBR GREEN и анализом кривых плавления продуктов амплификации

Методом ПЦР в мультиплексном формате с электрофоретической детекцией продуктов амплификации проводили детекцию генов, кодирующих продукцию AmpC-цефалоспориноз генетических семейств ACC, FOX, MOX, DNA, CIT и EBC.

При изучении 18 штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС, у 16 штаммов, предположительно продуцирующих «классические» БЛРС по результатам фенотипических тестов, выявлены гены, кодирующие продукцию БЛРС генетического семейства CTX-M трех генетических групп: CTX-M1 (10 штаммов), CTX-M2 (2 штамма), CTX-M9 (3 штамма), у одного штамма *S. Typhimurium* выявлены гены двух генетических групп – CTX-1 и CTX-M2. У двух штаммов,

предположительно продуцирующих AmpC-цефалоспорины по результатам фенотипических тестов (*S. Newport* и *S. Enteritidis*), выявлены гены цефалоспоринозного молекулярного класса C генетической группы CMY-2. Результаты молекулярных исследований штаммов *Salmonella* представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Гены бета-лактамаз различных молекулярных классов, выявленные у штаммов *Salmonella*, устойчивых к бета-лактамам антибиотикам

Генетическое семейство бета-лактамаз	Число штаммов	Доля от числа устойчивых к ЦРС, %	Серовары (количество штаммов)
<b>Штаммы, устойчивые к аминопенициллинам</b>			
Всего штаммов	41	100	
TEM	38	92,7	<i>S. Enteritidis</i> (12) <i>S. Typhimurium</i> (21) <i>S. Kentucky</i> (2) <i>S. Bredeney</i> (1) <i>S. Infantis</i> (1) <i>S. London</i> (1)
SHV, OXA, PSE	0	0	-
Бета-лактамаза не идентифицирована	3	7,3	<i>S. Enteritidis</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Infantis</i>
<b>Штаммы, устойчивые к аминопенициллинам и ЦРС</b>			
Всего штаммов	18	100	
TEM, SHV (БЛРС)	0	0	-
AmpC из них генетические группы:	2	11,1	<i>S. Newport</i> <i>S. Enteritidis</i>
- CMY-2	2	11,1	<i>S. Newport</i> <i>S. Enteritidis</i>
- ACC, FOX, MOX, DNA, EBC	0	0	-
CTX-M из них генетические группы:	16	88,9	
- CTX-M1	10	55,6	<i>S. Typhimurium</i> (4) <i>S. Enteritidis</i> (3) <i>S. Abony</i> (1) <i>S. Virchow</i> (1) <i>S. Coeln</i> (1)
- CTX-M2	2	11,1	<i>S. Typhimurium</i> (2)
- CTX-M9	3	16,7	<i>S. Enteritidis</i> (3)
- CTX-M1+ CTX-M2	1	5,5	<i>S. Typhimurium</i> (1)

Примечание: ЦРС – цефалоспорины расширенного спектра

Фенотипическая характеристика штаммов *Salmonella*, продуцирующих БЛРС различных генетических семейств, в отношении чувствительности и устойчивости к широкому спектру бета-лактамов (ЦРС, комбинациям с ингибиторами, карбапенемам, азтреонаму) и значениями МПК представлена в таблице 17. Все штаммы, вне зависимости от вида продуцируемой БЛРС, относились к категории «R» к азтреонаму (МПК от 4,0 до более 32,0 мг/л) и цефотаксиму (МПК более 32,0 мг/л). В отношении цефтазидима для 7 штаммов, продуцирующих «классические» БЛРС, значения МПК (2,0-4,0 мг/л) соответствовали категории «I» (чувствительный при увеличенной экспозиции), для 9 штаммов – категории «R» (6,0 – более 256,0 мг/л). В отношении цефепима для двух штаммов, продуцирующих AmpC-цефалоспориноазу CMY-2, значения МПК (1,0 мг/л) соответствовали категории «S» (чувствительный при стандартном режиме дозирования), что соответствовало особенностям субстратной специфичности цефалоспориноаз молекулярного класса C, а штаммы, продуцирующие «классические» БЛРС, имели МПК от 16,0 до более 256,0 мг/л и попадали в категорию «R». 14 из 18 штаммов по чувствительности к цефокситину относились к «дикому» типу (МПК цефокситина  $\leq 8,0$  мг/л); у 4 штаммов МПК цефокситина превышала ЕСOFF и составила от 16,0 до 256,0 мг/л, что также свидетельствовало о вероятной продукции AmpC. У двух из этих штаммов она была подтверждена молекулярно-генетическими методами (CMY-2), у двух других штаммов выявлена продукция БЛРС группы CTX-M2.

При тестировании комбинаций бета-лактамов с ингибиторами бета-лактамаз установлено, что амоксициллин/клавуланат оставался активным (категория «S») в отношении 8 штаммов, продуцирующих «классические» БЛРС (МПК от  $\leq 4,0$  до 8,0 мг/л), остальные штаммы были резистентны (МПК от 16,0 до более 64,0 мг/л). Выявлена высокая активность цефтазидим/авибактама вне зависимости от вида продуцируемой БЛРС: для всех штаммов МПК составило менее 0,5 (категория «S»). Активность цефтолазан/тазобактама была ниже: к категории «S» относились 14 штаммов (МПК  $\leq 0,5 - 1,0$  мг/л), к категории «R» – 4 штамма.

Таблица 17 – МПК (мг/л) бета-лактамовых антибиотиков для штаммов *Salmonella*, продуцирующих БЛРС

№ п/п	№ штамма	Серovar	БЛРС (генетическая группа)	МПК, мг/л									
				АЗТР	Цефалоспорины расширенного спектра				«Защищенные» бета-лактамы			Карбапенемы	
					ЦАЗ	ЦТК	ЦФП	ЦКС	АКК	ЦАВ	ЦТЗ	МПИ	ЭРТ
1.	B-7744	S. Virchow	CTX-M1	4,0 (R)	2,0 (I)	>32,0 (R)	>256,0 (R)	1,0 (WT)	64,0 (R)	≤0,5 (S)	2,0 (R)	0,03 (S)	0,03 (S)
2.	B-9042	S. Abony	CTX-M1	>32,0 (R)	16,0 (R)	>32,0 (R)	>256,0 (R)	2,0 (WT)	16,0 (R)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,06 (S)	0,06 (S)
3.	B-9053	S. Typhimurium	CTX-M1+ CTX-M2	>32,0 (R)	>256,0 (R)	>32,0 (R)	>256,0 (R)	4,0 (WT)	32,0 (R)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,06 (S)	0,12 (S)
4.	B-9054	S. Typhimurium	CTX-M2	16,0 (R)	2,0 (I)	>32,0 (R)	16,0 (R)	24,0 (не-WT)	≤4,0 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	0,015 (S)	0,06 (S)
5.	B-9055	S. Typhimurium	CTX-M2	32,0 (R)	6,0 (R)	>32,0 (R)	24,0 (R)	32,0 (не-WT)	>64,0 (R)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,03 (S)	0,12 (S)
6.	B-8314	S. Typhimurium	CTX-M1	>32,0 (R)	>256,0 (R)	>32,0 (R)	>256,0 (R)	2,0 (WT)	≤4,0 (S)	≤0,5 (S)	2,0 (R)	0,015 (S)	0,06 (S)
7.	B-9047	S. Enteritidis	CTX-M1	>32,0 (R)	96,0 (R)	>32,0 (R)	24,0 (R)	1,5 (WT)	≤4,0 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	0,03 (S)	0,03 (S)
8.	B-9056	S. Typhimurium	CTX-M1	32,0 (R)	8,0 (R)	>32,0 (R)	64,0 (R)	4,0 (WT)	≤4,0 (S)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,03 (S)	0,06 (S)
9.	B-9048	S. Enteritidis	CTX-M9	16,0 (R)	4,0 (I)	>32,0 (R)	>256,0 (R)	2,0 (WT)	16,0 (R)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,03 (S)	0,06 (S)
10.	B-9049	S. Enteritidis	CTX-M1	>32,0 (R)	>256,0 (R)	>32,0 (R)	>256,0 (R)	4,0 (WT)	8,0 (S)	≤0,5 (S)	2,0 (R)	0,015 (S)	0,03 (S)
11.	B-9050	S. Enteritidis	CTX-M9	32,0 (R)	4,0 (I)	>32,0 (R)	16,0 (R)	1,5 (WT)	16,0 (R)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,015 (S)	0,06 (S)
12.	B-9051	S. Enteritidis	CTX-M9	16,0 (R)	4,0 (I)	>32,0 (R)	16,0 (R)	2,0 (WT)	16,0 (R)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,03 (S)	≤0,015 (S)
13.	B-9043	S. Coeln	CTX-M1	8,0 (R)	12,0 (R)	>32,0 (R)	48,0 (R)	1,0 (WT)	≤4,0 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	0,06 (S)	0,12 (S)
14.	B-9057	S. Typhimurium	CTX-M1	16,0 (R)	2,0 (I)	>32,0 (R)	32,0 (R)	2,0 (WT)	8,0 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	0,03 (S)	≤0,015 (S)
15.	B-9058	S. Typhimurium	CTX-M1	>32,0 (R)	>256,0 (R)	>32,0 (R)	64,0 (R)	6,0 (WT)	16,0 (R)	≤0,5 (S)	1,0 (S)	0,03 (S)	0,06 (S)
16.	B-9052	S. Enteritidis	CTX-M1	32,0 (R)	4,0 (I)	>32,0 (R)	16,0 (R)	1,5 (WT)	≤4,0 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	0,015 (S)	0,03 (S)
17.	B-9044	S. Newport	CMY-2	8,0 (R)	>256,0 (R)	>32,0 (R)	1,0 (S)	>256,0 (не-WT)	>64,0 (R)	≤0,5 (S)	2,0 (R)	0,03 (S)	0,06 (S)
18.	B-9046	S. Enteritidis	CMY-2	8,0 (R)	48,0 (R)	>32,0 (R)	1,0 (S)	64,0 (не-WT)	>64,0 (R)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	0,03 (S)	0,06 (S)

Примечание: ЦАЗ – цефтазидим, ЦТК – цефотаксим, ЦФП – цефепим, ЦКС – цефокситин, АКК – амоксициллин/клавулановая кислота (концентрация клавулановой кислоты 2,0 мг/л), ЦАВ – цефтазидим/авибактам (концентрация авибактама 4,0 мг/л), ЦТЗ – цефталозан/тазобактам (концентрация тазобактама 4,0 мг/л), МПИ – меропенем, ЭРТ – эртапенем, но – не обнаружен, WT – «дикий» тип (wild type), не-WT – «не-дикий» тип (non-wild type),

S – чувствительный (при стандартной дозировке) , I – чувствительный при увеличенной экспозиции , R – резистентный

Все штаммы оставались высоко чувствительны к карбапенемам при стандартном режиме дозирования (категория «S»): МПК меропенема колебалось от 0,015 до 0,06 мг/л, эртапенема – от  $\leq 0,015$  до 0,12 мг/л.

Практически все штаммы *Salmonella*, продуцирующие БЛРС (17 штаммов из 18), характеризовались устойчивостью к 1-7 не-лактамным классам АМП (Рисунок 24).

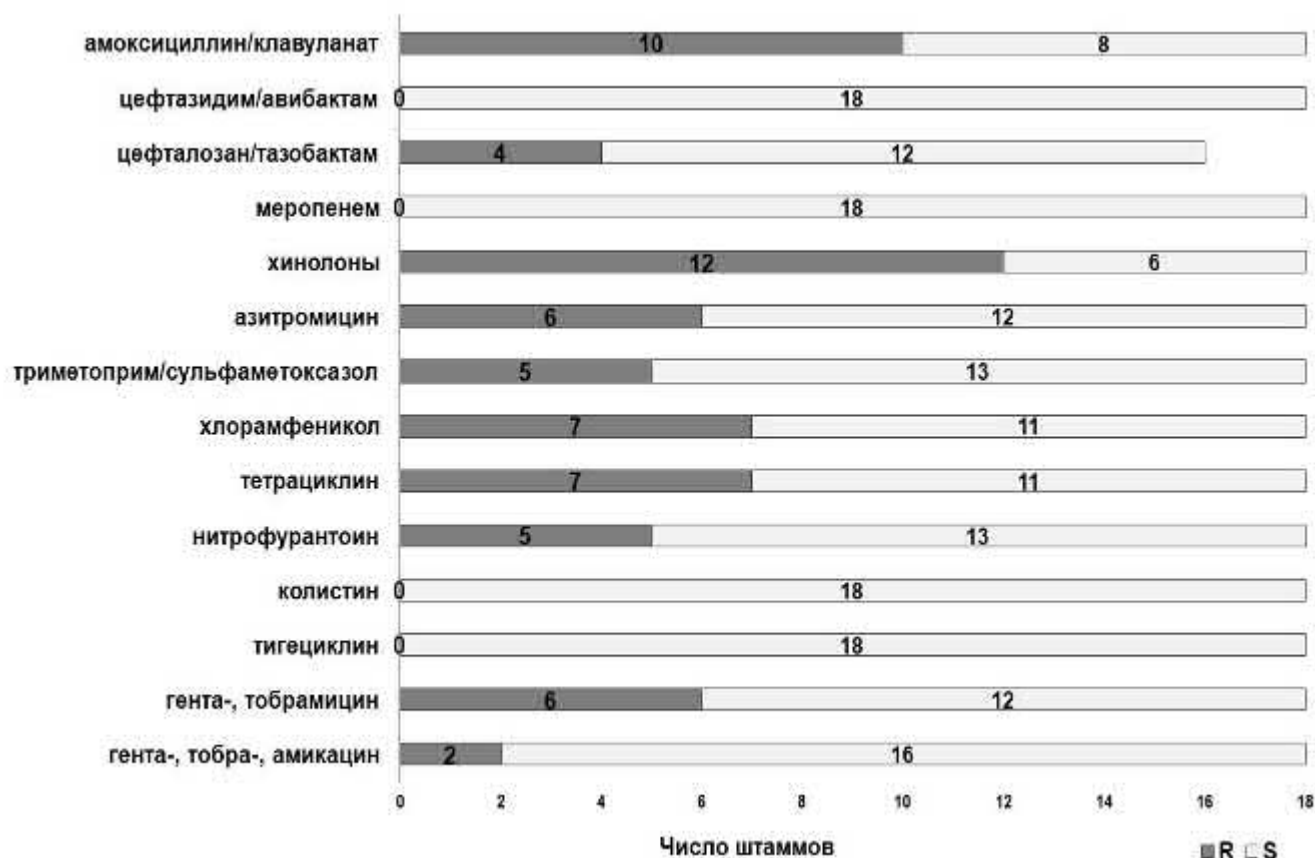


Рисунок 24 – Устойчивость штаммов *Salmonella*, продуцирующих БЛРС, к АМП различных классов (абс. число штаммов)

Наиболее часто устойчивость к ЦРС сочеталась с устойчивостью к хинолонам: 12 штаммов из 18 характеризовались устойчивостью низкого уровня к ципрофлоксацину (МПК 0,12-0,5 мг/л). Из других классов не-лактамных АМП отмечена резистентность: к хлорамфениколу (МПК от 16,0 до более 32,0 мг/л) – у 7 штаммов; тетрациклину (МПК выше 32,0 мг/л) – 7 штаммов; азитромицину (МПК выше ЕСOFF- 24,0-256,0 мг/л) – 6 штаммов; гентамицину и тобрамицину (МПК 16,0-32,0 мг/л и более 8,0 мг/л, соответственно) – 6 штаммов; триметоприм/сульфаметоксазолу (МПК выше 8,0 мг/л) – 5 штаммов;



нитрофурантоину (МПК от 96,0 до 256,0 мг/л) – 5 штаммов; ко всем тестированным аминогликозидам, включая амикацин (МПК 32,0 мг/л) – 2 штамма. При анализе профилей чувствительности штаммов *Salmonella*, продуцирующих БЛРС, установлено, что наибольшей активностью в отношении таких штаммов обладали из бета-лактамовых препаратов цефтазидим/авибактам и карбапенемы, из не-лактамовых препаратов – колистин и тигециклин, к которым все штаммы сохраняли чувствительность. Характеристика профилей устойчивости штаммов *Salmonella* к не-лактамовым АМП представлена в таблице 18.

Для штамма *S. Newport*, выделенного в Санкт-Петербурге в 2008 г., продуцирующего цефалоспоринозу CMY-2, диско-диффузионным методом провели дополнительное определение чувствительности к стрептомицину и сульфаниламидам. Установлено, что штамм характеризовался MDR-фенотипом, включающим устойчивость к аминопеницилинам, ЦРС (кроме цефепима), хлорамфениколу, тетрациклину, стрептомицину и сульфаниламидам.

У штамма методом щелочного лизиса выделена плазида размером около 125 kb, которая содержала ген *bla*<sub>CMY-2</sub>. Плазмиду подвергли рестрикции рестриктазой *Pst*I и сравнили ее профиль с профилями плазмид штаммов международного клона высокого риска *S. Newport* MDR-AmpC/CMY-2 из коллекции Коллаборативного центра ВОЗ по сальмонеллам (Парижский Институт Пастера, Франция), которые вызывали спорадические случаи и небольшие вспышки сальмонеллеза во Франции в 2000-2005 г. [156, 182, 279]. Установлено, что плазида «русского» штамма *S. Newport* относилась к группе несовместимости A/C2 согласно Caratolli et al., 2006 имела рестрикционный профиль R1 – один из наиболее распространенных у штаммов клона *S. Newport* MDR-AmpC/CMY-2.

После электропорации плазмидной ДНК штамма *S. Newport* в электрокомпетентные клетки *E. coli* DH10B у штамма-трансформанта обнаружена плазида того же размера и профиля рестрикции (содержащая ген *bla*<sub>CMY-2</sub>), а также идентичный фенотип резистентности к АМП (бета-лактамам, тетрациклину, хлорамфениколу, сульфаниламидам, стрептомицину), как и у штамма-донора.

Таблица 18 – Чувствительность штаммов *Salmonella*, продуцирующих БЛРС, к не-лактамым АМП

№ п/п	№ штамма	Серovar	БЛРС (генетическая группа)	МПК, мг/л											Аминогликозиды		
				ЦИП	АЗМ	ТСМ	НФ	ХЛФ	ТЕТ	КЛС	ТГЦ	ГЕН	ТОБ	АМК			
1.	B-7744	S. Virchow	CTX-M1	0,12 (R)	4,0 (WT)	0,06 (S)	96,0 (R)	4,0 (S)	≤0,5 (S)	0,5 (S)	≤0,25 (S)	>32,0 (R)	> 8,0 (R)	2,0 (S)			
2.	B-9042	S. Abony	CTX-M1	0,06 (S)	32,0 (не-WT)	>8,0 (R)	12,0 (S)	8,0 (S)	2,0 (S)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	>32,0 (R)	>8,0 (R)	>32,0 (R)			
3.	B-9053	S. Typhimurium	CTX-M1+ CTX-M2	0,5 (R)	48,0 (не-WT)	>8,0 (R)	96,0 (R)	>32,0 (R)	>32,0 (R)	0,5 (S)	≤0,25 (S)	>32,0 (R)	>8,0 (R)	≤1,0 (S)			
4.	B-9054	S. Typhimurium	CTX-M2	0,5 (R)	24,0 (не-WT)	0,12 (S)	256,0 (R)	16,0 (R)	4,0 (S)	0,5 (S)	≤0,25 (S)	≤0,5 (S)	≤1,0 (S)	≤1,0 (S)			
5.	B-9055	S. Typhimurium	CTX-M2	0,5 (R)	24,0 (не-WT)	>8,0 (R)	192,0 (R)	>32,0 (R)	>32,0 (R)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	16,0 (R)	>8,0 (R)	2,0 (S)			
6.	B-8314	S. Typhimurium	CTX-M1	0,5 (R)	8,0 (WT)	0,12 (S)	12,0 (S)	>32,0 (R)	>32,0 (R)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	>32,0 (R)	8,0 (R)	2,0 (S)			
7.	B-9047	S. Enteritidis	CTX-M1	0,08 (S)	4,0 (WT)	0,12 (S)	8,0 (S)	>32,0 (R)	2,0 (S)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	>32,0 (R)	>8,0 (R)	32,0 (R)			
8.	B-9056	S. Typhimurium	CTX-M1	0,25 (R)	6,0 (WT)	>8,0 (R)	24,0 (S)	4,0 (S)	>32,0 (R)	0,5 (S)	≤0,25 (S)	≤0,5 (S)	≤1,0 (S)	2,0 (S)			
9.	B-9048	S. Enteritidis	CTX-M9	0,25 (R)	6,0 (WT)	0,12 (S)	64,0 (S)	8,0 (S)	2,0 (S)	2,0 (S)	≤0,25 (S)	≤0,5 (S)	≤1,0 (S)	4,0 (S)			
10.	B-9049	S. Enteritidis	CTX-M1	0,5 (R)	8,0 (WT)	0,25 (S)	32,0 (S)	16,0 (R)	4,0 (S)	2,0 (S)	≤0,25 (S)	≤0,5 (S)	≤1,0 (S)	≤1,0 (S)			
11.	B-9050	S. Enteritidis	CTX-M9	0,25 (R)	6,0 (WT)	0,12 (S)	32,0 (S)	4,0 (S)	2,0 (S)	1,0 (S)	≤0,25 (S)	≤0,5 (S)	≤1,0 (S)	4,0 (S)			
12.	B-9051	S. Enteritidis	CTX-M9	0,5 (R)	6,0 (WT)	0,25 (S)	64,0 (S)	4,0 (S)	2,0 (S)	2,0 (S)	≤0,25 (S)	≤0,5 (S)	≤1,0 (S)	2,0 (S)			
13.	B-9043	S. Coeln	CTX-M1	0,016 (S)	3,0 (WT)	0,12 (S)	24,0 (S)	4,0 (S)	2,0 (S)	1,0 (S)	≤0,25 (S)	≤0,5 (S)	≤1,0 (S)	2,0 (S)			
14.	B-9057	S. Typhimurium	CTX-M1	0,03 (S)	4,0 (WT)	0,25 (S)	6,0 (S)	4,0 (S)	>32,0 (R)	0,5 (S)	≤0,25 (S)	≤0,5 (S)	≤1,0 (S)	2,0 (S)			
15.	B-9058	S. Typhimurium	CTX-M1	0,03 (S)	8,0 (WT)	>8,0 (R)	24,0 (S)	4,0 (S)	>32,0 (R)	1,0 (S)	≤0,25 (S)	≤0,5 (S)	≤1,0 (S)	2,0 (S)			
16.	B-9052	S. Enteritidis	CTX-M1	0,12 (R)	>256,0 (P)	0,12 (S)	128,0 (R)	4,0 (S)	2,0 (S)	1,0 (S)	≤0,25 (S)	≤0,5 (S)	≤1,0 (S)	2,0 (S)			
17.	B-9044	S. Newport	CMY-2	0,03 (S)	8,0 (WT)	0,25 (S)	12,0 (S)	>32,0 (R)	>32,0 (R)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	≤0,5 (S)	≤1,0 (S)	2,0 (S)			
18.	B-9046	S. Enteritidis	CMY-2	0,5 (R)	24,0 (не-WT)	0,5 (S)	48,0 (S)	8,0 (S)	4,0 (S)	1,0 (S)	≤0,25 (S)	≤0,5 (S)	≤1,0 (S)	4,0 (S)			

Примечание: ЦИП – ципрофлоксацин, АЗМ – азитромицин, ТСМ – триметоприм/сульфаметоксазол, НФ – нитрофурантоин, ХЛФ – хлорамфеникол, ТЕТ – тетрациклин, КЛС – колистин, ТГЦ – тигециклин, ГЕН – гентамицин, ТОБ – тобрамицин, АМК – амикацин WT – «дикий» тип (wild type), не-WT – «не-дикий» тип (non-wild type), S – чувствительный (при стандартной дозировке) □ R – резистентный ■

Это свидетельствовало о локализации детерминант резистентности к указанным АМП, включая ЦРС, на данной плазмиде. Таким образом, выделенный в ходе нашего исследования штамм *S. Newport* по MDR-фенотипу, продуцируемой цефалоспоринозой CMY-2 и профилю рестрикции плазмиды резистентности соответствовал международному полирезистентному клону высокого риска *S. Newport* MDR-AmpC/CMY-2. Полученные нами результаты позволили предположить факт завоза штаммов этого клона на территорию РФ из стран ЕС или США. Штамм депонирован в «ГКПМ-Оболенск» под номером В-9044.

Наше исследование показало, что устойчивость к бета-лактамам у штаммов *Salmonella* была обусловлена механизмом резистентности, характерным для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*: продукцией бета-лактамаз различных молекулярных классов и генетических семейств, отличающихся спектром ферментативной активности и специфичностью. Практически все штаммы, устойчивые к аминопенициллинам, представленные различными сероварами (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Kentucky*, *S. Bredeney* и *S. London*), продуцировали бета-лактамазу широкого спектра TEM-1, обуславливающую устойчивость к этой группе АМП у большинства штаммов энтеробактерий, включая *Salmonella*, бета-лактамазы других генетических семейств не были обнаружены. Большинство штаммов, устойчивых к ЦРС (16 из 18 штаммов), представленные сероварами *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Virchow*, *S. Abony*, *S. Coeln* и *Salmonella* 1,4,12:i:-, продуцировали «классические» БЛРС молекулярного класса А генетического семейства CTX-M: CTX-M1 (10 штаммов), CTX-M9 (три штамма), CTX-M2 (два штамма) и один штамм – одновременно CTX-M1 и -2. Два штамма, устойчивых к ЦРС (*S. Newport* и *S. Enteritidis*) продуцировали цефалоспориноазы молекулярного класса С генетической группы CMY-2.

Фенотипическая характеристика штаммов полностью соответствовала молекулярному механизму резистентности и была обусловлена спектром ферментативной активности выявленных БЛРС. Штаммы, продуцирующие «классические» БЛРС генетического семейства CTX-M, характеризовались устойчивостью высокого уровня к цефотаксиму (МПК более 32,0 мг/л),

устойчивостью различного уровня к цефтазидиму (МПК от 2,0 до более 256,0 мг/л), устойчивостью к цефепиму (МПК от 6,0 до 256,0 мг/л), чувствительностью к цефокситину (МПК не превышали значение ECOFF 8,0 мг/л), чувствительностью к ингибитору клавулановой кислоте. Два штамма (*S. Newport* и *S. Enteritidis*), продуцирующие AmpC-цефалоспорины CMY-2 характеризовались устойчивостью высокого уровня к цефотаксиму (МПК более 32,0 мг/л) и цефтазидиму (МПК 48,0 и более 256,0 мг/л), чувствительностью к цефепиму (МПК 0,5 и 1,0 мг/л), устойчивостью к цефокситину (МПК значительно превышали «эпидемиологическую точку отсечения» – 64,0 и более 256,0 мг/л), чувствительностью к ингибитору клоксациллину.

Полученные данные подтвердили диагностическую ценность предложенного алгоритма фенотипической детекции БЛРС («классических» и AmpC) у штаммов *Salmonella*. Адекватный выбор индикаторных препаратов из группы ЦРС (цефтазидима и цефотаксима), использование цефокситина в качестве дополнительного маркера при детекции AmpC-цефалоспоринов, а также подтверждающие фенотипические тесты с ингибиторами позволяют с высокой вероятностью предположить продукцию БЛРС определенного молекулярного класса (А или С). Установлена высокая активность цефтазидим/авибактама, карбапенемов, колистина и тигециклина в отношении БЛРС-продуцирующих штаммов. Подтверждена потенциальная возможность использования цефалоспоринов 4 поколения (цефепима) при лечении инфекций, вызванных штаммами *Salmonella*, продуцирующими AmpC-цефалоспорины.

18 штаммов, продуцирующих «классические» БЛРС и AmpC-цефалоспорины, депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» (В-7744, В-8314, В-9042, В-9043, В-9044, В-9046, В-9047, В-9048, В-9049, В-9050, В-9051, В-9052, В-9053, В-9054, В-9055, В-9056, В-9057, В-9058). Результаты исследования вошли в базу данных «*Salmonella*-Museum: антибиотикочувствительность и механизмы резистентности», свидетельство о регистрации № 2019622278 (Приложение 3).

## ГЛАВА 5 Фенотипическая детекция устойчивости штаммов *Salmonella* к хинолонам

### 5.1. Методические особенности определения чувствительности штаммов *Salmonella* к хинолонам

В современных международных и отечественных руководствах по определению чувствительности микроорганизмов к АМП (EUCAST, CLSI, КР) рекомендован особый подход к определению чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам, отличающийся от процедуры тестирования штаммов других *Enterobacteriaceae*. Наиболее достоверным показателем для прогнозирования эффективности терапии сальмонеллезной инфекции фторхинолонами является значение МПК ципрофлоксацина, определенное методом последовательных разведений или градиентной диффузии. В рекомендациях EUCAST и российских КР отсутствуют пограничные значения диаметров зон подавления роста для ципрофлоксацина при тестировании штаммов *Salmonella*. Для штаммов *S. Typhi* (и других *Salmonella*, вызывающих инвазивные инфекции) используются особые критерии интерпретации для ципрофлоксацина ( $S \leq 0,06$  мг/л;  $R > 0,06$  мг/л), отличающиеся от критериев, используемых для других бактерий порядка *Enterobacteriales* ( $S \leq 0,25$  мг/л;  $R > 0,5$  мг/л). Штаммы *Salmonella*, для которых МПК ципрофлоксацина превышает 0,06 мг/л, следует считать устойчивыми ко всем фторхинолонам. При определении чувствительности диско-диффузионным методом в качестве предиктора чувствительности/резистентности к хинолонам рекомендован диск с пефлоксацином (5 мкг): штамм *Salmonella* расценивают как «чувствительный» к фторхинолонам, если диаметр зоны подавления роста составляет 24 мм и выше, «устойчивый» – менее 24 мм.

Фенотип устойчивости штамма к различным препаратам из группы хинолонов зависит от молекулярного механизма резистентности. Для наиболее частого механизма, мутаций в хромосомных генах *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*, высокочувствительным индикатором является налидиксовая кислота – у

штаммов, приобретших мутации в QRDR-регионе указанных генов, зона задержки роста вокруг диска с налидиксовой кислотой практически отсутствует (МПК достигает 256,0 мг/л). При возникновении устойчивости к хинолам вследствие плазмидопосредованных механизмов (гены *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*) у штамма, как правило, формируется «парадоксальный» фенотип устойчивости: несмотря на то что МПК цiproфлоксацина повышается до 0,12-0,5 мг/л (устойчивость низкого уровня), штамм остается чувствительным к налидиксовой кислоте (МПК менее 16,0 мг/л; диаметр зоны подавления роста 16 мм и более). Таким образом, использование диска налидиксовой кислоты в дополнение к пefлоксацину при тестировании штаммов *Salmonella* помогает дифференцировать механизмы устойчивости.

Учитывая возможность наличия у штаммов различных молекулярных механизмов резистентности к хинолонам (как хромосомных, так и плазмидных), для повышения достоверности тестирования при изучении чувствительности штаммов *Salmonella* диско-диффузионным методом нами был предложен алгоритм тестирования, включающий налидиксовую кислоту и пefлоксацин (Рисунок 25).



Рисунок 25 – Алгоритм скрининга штаммов *Salmonella*, устойчивых к хинолонам, диско-диффузионным методом

Примечание: d – диаметр зоны подавления роста

Также, для всех штаммов была определена МПК ципрофлоксацина методом градиентной диффузии.

В ходе работы оценили конкордантность результатов тестирования чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам, полученных различными методами, рекомендованными EUCAST и КР. Для этого оценили соответствие значений МПК ципрофлоксацина (как наиболее объективного критерия чувствительности к фторхинолонам) и результатов скрининговых исследований диско-диффузионным методом – диаметров зон подавления роста вокруг диска с пефлоксацином (5 мкг) и налидиксовой кислоты (30 мкг).

В отношении скринингового ДДМ с пефлоксацином совпадение результатов тестирования с МПК ципрофлоксацина получено для 299 из 310 тестируемых штаммов (96,5%): у 231 штамма с МПК ципрофлоксацина  $\leq 0,06$  мг/л (категория S) диаметр зоны подавления роста вокруг диска с пефлоксацином составлял 24 мм и более (категория S); у 68 штаммов с МПК ципрофлоксацина выше 0,06 мг/л (категория R) диаметр зоны подавления роста вокруг диска с пефлоксацином составлял менее 24 мм (категория R), что подтвердило целесообразность использования пефлоксацина как индикатора устойчивости, при тестировании штаммов *Salmonella* (Рисунок 26, Приложение 4).

В тоже время, для 11 штаммов (3,5%) отмечены расхождения в результатах тестирования. Для шести штаммов с МПК ципрофлоксацина 0,12-0,25 мг/л (категория R), диаметр зоны подавления роста вокруг диска с пефлоксацином составил 24 мм (категория S). При повторном тестировании этих штаммов, значения диаметров зоны пефлоксацина колебались в пределах от 22 до 24 мм. Для этих штаммов зона подавления роста для налидиксовой кислоты колебалась от 6 до 12 мм (категория R), то есть налидиксовая кислота, в отличие от пефлоксацина, позволила выявить устойчивость к фторхинолонам, соответствующую значениям МПК ципрофлоксацина. Пять штаммов, чувствительных к ципрофлоксацину согласно МПК, по результатам скрининга с пефлоксацином относились к категории «устойчивый» (значения диаметров зон подавления роста составили 18-22 мм).

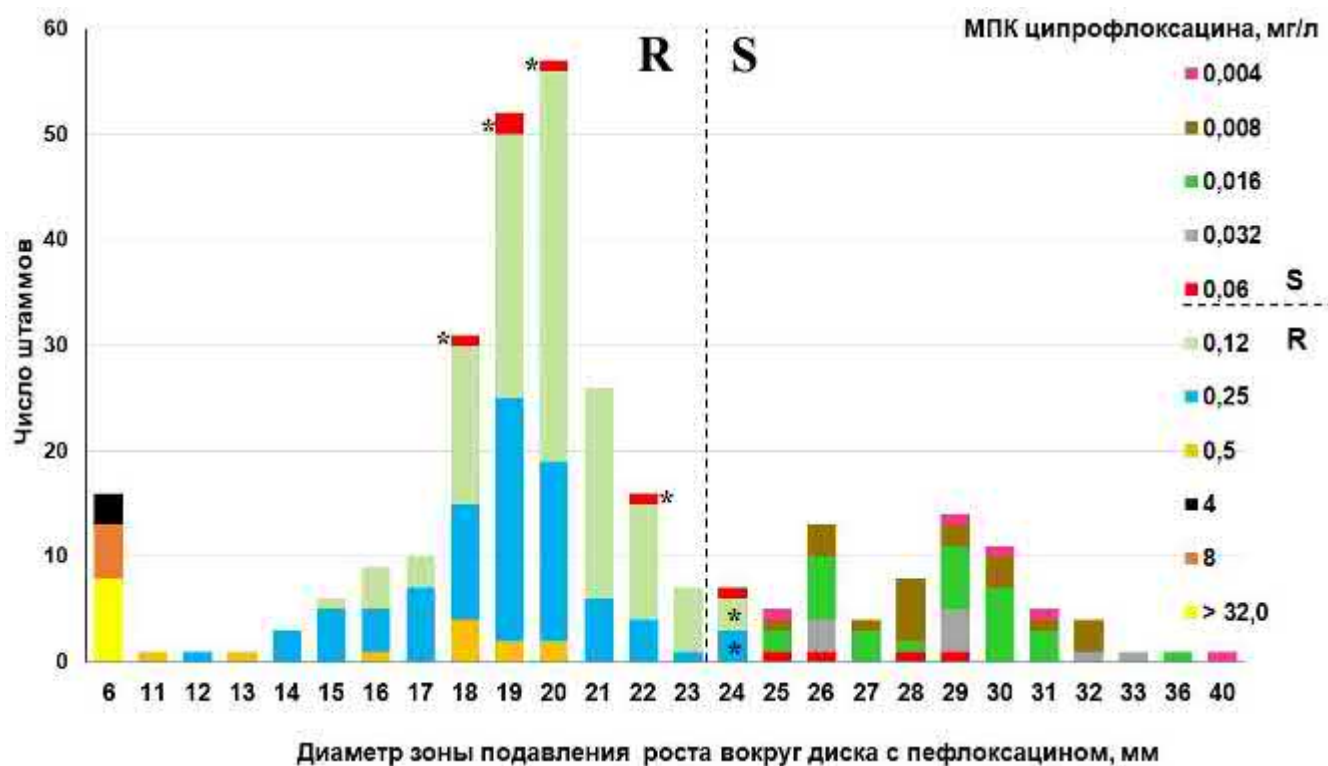


Рисунок 26 – Распределение значений зон подавления роста вокруг диска с пefлоксацином (5 мкг) относительно МПК ципрофлоксацина у штаммов *Salmonella* (абсолютное число штаммов)  
 Примечание: \* 11 штаммов, для которых получены расхождения в результатах тестирования;  
 Пограничные клинические значения: МПК ципрофлоксацина  $S \leq 0,06$  мг/л,  $R > 0,06$  мг/л; диаметр зоны подавления роста пefлоксацина  $S \geq 24$  мм,  $R < 24$  мм

Следует отметить, что значение МПК ципрофлоксацина для этих штаммов, определенное методом градиентных концентраций, составило 0,06 мг/л, то есть являлось клиническим пограничным значением, совпадающим со значением ЕСOFF. При повторном определении МПК ципрофлоксацина методом микроразведений в бульоне для этих штаммов были получены значения 0,06 (категория S) – 0,12 мг/л (категория R). Таким образом, зарегистрированное при первичном тестировании несоответствие результатов было обусловлено колебаниями (технической или биологической вариабельностью), возникающими при постановке метода градиентных концентраций, который является модификацией ДДМ.

При сравнении МПК ципрофлоксацина и скринингового ДДМ с налидиксовой кислотой для подавляющего большинства штаммов (412 из 420 тестированных, 98,1%) результаты тестирования совпали: у 338 штаммов с МПК ципрофлоксацина выше 0,06 мг/л (категория R) диаметр зоны подавления роста



вокруг диска с налидиксовой кислотой не превышал 16 мм (категория R); у 74 штаммов с МПК ципрофлоксацина 0,06 мг/л и ниже (категория S) диаметр зоны подавления роста вокруг диска с налидиксовой кислотой составлял 16 мм и больше (категория S) (Рисунок 27, Приложение 5).

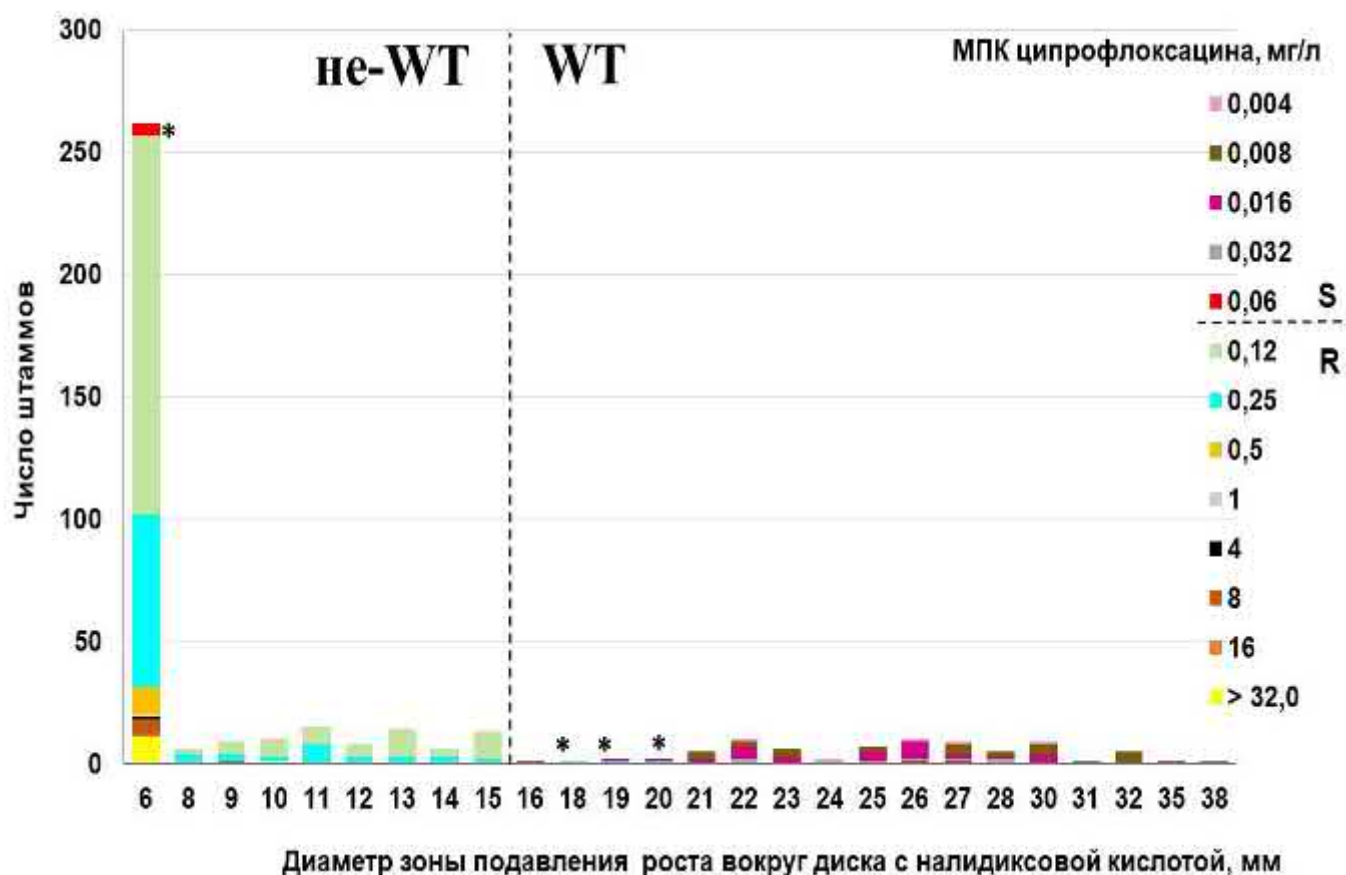


Рисунок 27 – Распределение значений зон подавления роста вокруг диска с налидиксовой кислотой (30 мкг) относительно МПК ципрофлоксацина у штаммов *Salmonella* (абсолютное число штаммов)

Примечание: \* 8 штаммов, для которых получены расхождения в результатах тестирования;  
 Пограничные клинические значения: МПК ципрофлоксацина S  $\leq$  0,06 мг/л, R  $>$  0,06 мг/л; диаметр зоны подавления роста налидиксовой кислоты S  $\geq$  16 мм, R  $<$  24 мм

Для восьми штаммов (1,9%) результаты тестирования двумя методами не соответствовали друг другу. Для трех штаммов (*S. Typhi*, *S. Typhimurium*, *S. Corvallis*) был получен «парадоксальный» фенотип устойчивости: значение МПК соответствовало устойчивости низкого уровня к ципрофлоксацину (МПК 0,25 мг/л), в тоже время штаммы сохраняли чувствительность к налидиксовой кислоте (диаметр зоны подавления роста составил 18-20 мм). Дальнейшие молекулярные исследования выявили у этих штаммов плазмидопосредованные

механизмы устойчивости (ген *qnrS*), для которых по данным литературы характерен «парадоксальный» фенотип устойчивости к хинолонам. Пять штаммов, устойчивые по результатам тестирования налидиксовой кислоты (диаметр зоны подавления роста 6 мм), тем не менее, имели МПК цiproфлоксацина 0,06 мг/л (категория S). Как уже было описано выше, при повторном определении МПК для этих штаммов методом разведений в бульоне были получены значения 0,06 (категория S) – 0,12 мг/л (категория R). Результаты исследования подтвердили высокую чувствительность налидиксовой кислоты как индикатора устойчивости штаммов *Salmonella* к фторхинолонам, обусловленной хромосомными механизмами.

Российские КР, регламентирующие определение чувствительности микроорганизмов к АМП, основаны на рекомендациях EUCAST. Существующие альтернативные рекомендации CLSI, а также МУК 4.2.1890-04 позволяют использовать ДДМ с диском цiproфлоксацина для определения чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам. В связи с этим, мы оценили конкордантность результатов тестирования чувствительности штаммов *Salmonella* к цiproфлоксацину методами МПК и ДДМ, причем интерпретацию результатов проводили согласно рекомендациям CLSI 2018 (Рисунок 28, Приложение 6).

Результаты тестирования двумя методами совпали для 246 из 326 тестируемых штаммов, что составило 75,5%. Для 24,5% штаммов наблюдались расхождения, причем чаще всего (для 76 из 80 штаммов) штаммы с устойчивостью низкого уровня к цiproфлоксацину (МПК 0,12-0,5 мг/л) по результатам тестирования ДДМ расценивались как «чувствительные» (диаметр зоны подавления роста вокруг диска с цiproфлоксацином колебался от 31 до 40 мм). Повторное многократное тестирование этих штаммов ДДМ дало разброс результатов от 3 до 8 мм. Таким образом, практически каждый четвертый штамм *Salmonella*, протестируемый ДДМ с цiproфлоксацином, был неправильно отнесен к категории чувствительности и расценен как «чувствительный» вместо «умеренно-резистентный».

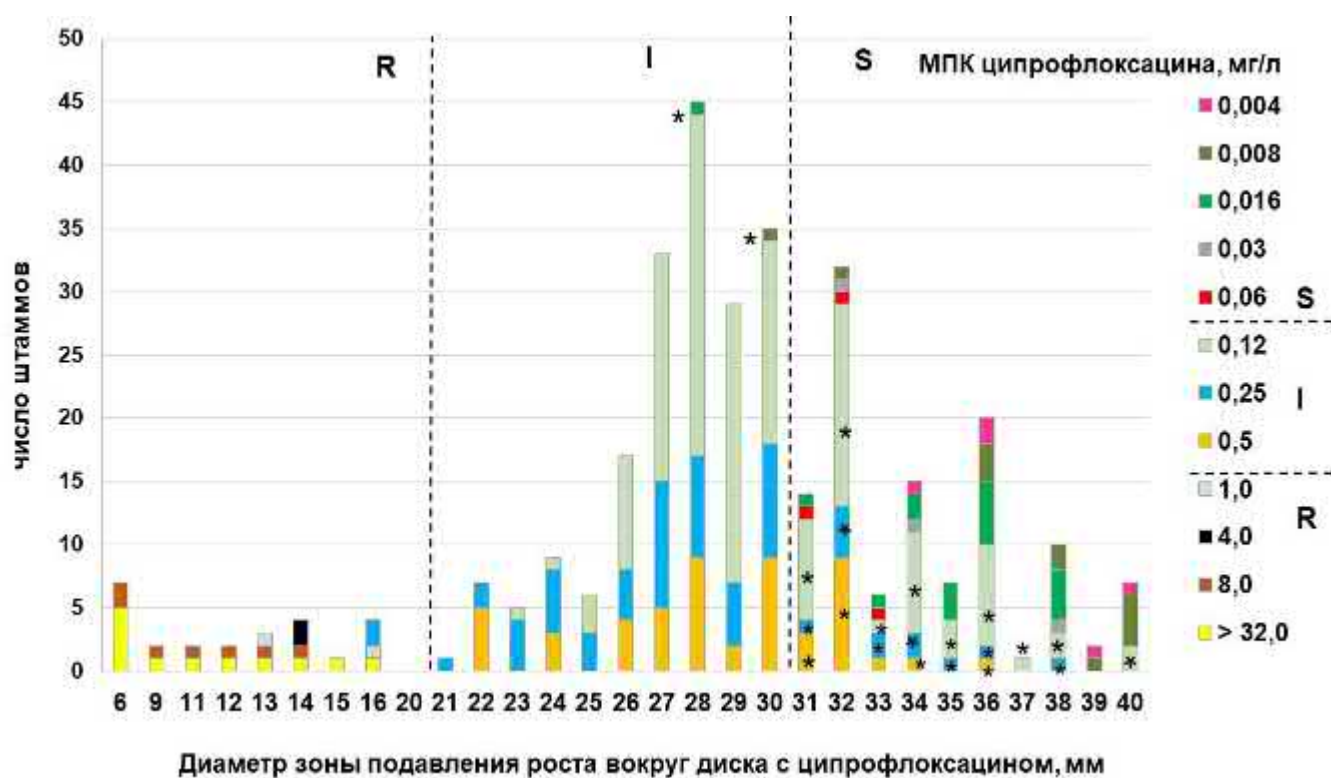


Рисунок 28 – Распределение значений зон подавления роста вокруг диска с ципрофлоксацином (5 мкг) относительно МПК ципрофлоксацина у штаммов *Salmonella* (абсолютное число штаммов)

Примечание: \* 80 штаммов, для которых получены расхождения в результатах тестирования; Пограничные клинические значения CLSI: МПК ципрофлоксацина  $S \leq 0,06$  мг/л,  $R \geq 1,0$  мг/л; диаметр зоны подавления роста ципрофлоксацина  $S \geq 31$  мм,  $I = 21-30$  мм,  $R \leq 20$  мм

При определении чувствительности микроорганизмов к АМП любыми количественными методами, полученные значения в ряде случаев могут попадать в так называемую «зону технической неопределенности» и быть ошибочно интерпретированы. Наиболее клинически значимой ошибкой в этом случае является отнесение устойчивого штамма к категории «чувствительный». Несмотря на то, что методы, позволяющие оценить МПК ципрофлоксацина (градиентных концентраций или разведений в жидкой среде), наиболее достоверны при определении чувствительности штаммов *Salmonella* к хинолонам, при их постановке также возможно получение «неопределенных» результатов, особенно если полученные значения МПК близки к ЕСОФФ (0,06 мг/л).

Наше исследование показало, что при определении чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам необходим комплексный подход. Любой из указанных индикаторных хинолонов, тестируемый в качестве единственного

препарата, не способен достоверно обеспечить выявление всех описанных у *Salmonella* механизмов резистентности к хинолонам. При проведении скрининга устойчивых штаммов диско-диффузионным методом целесообразно использовать два препарата из группы хинолонов: пефлоксацин и налидиксовую кислоту. Несмотря на то, что пефлоксацин позволяет выявить штаммы, устойчивые к хинолонам посредством различных механизмов устойчивости, при его тестировании (как и при тестировании любого препарата ДДМ) возможны колебания результатов в пределах 1-2 мм, что может привести к ошибочной интерпретации результатов, особенно если зона подавления роста находится в диапазоне 23-25 мм. В этом случае использование при скрининге дополнительного индикаторного хинолона – налидиксовой кислоты (высокочувствительного индикатора хромосомных механизмов устойчивости, которые обуславливают устойчивость к хинолонам у более чем 90,0% штаммов *Salmonella*), позволяет повысить достоверность скрининга. Кроме того, при тестировании штаммов с плазмидоопосредованной резистентностью к хинолонам использование двух препаратов при скрининге позволяет выявить «парадоксальный» фенотип резистентности и дифференцировать механизмы устойчивости.

В том случае, если чувствительность к ципрофлоксацину у штаммов *Salmonella* определяли методами МПК и при этом получено «пограничное» значение 0,06 мг/л (соответствующее ЕСOFF), следует подтвердить результат альтернативным методом – ДДМ с пефлоксацином и налидиксовой кислотой.

Предложенный нами алгоритм скрининга штаммов *Salmonella*, устойчивых к фторхинолонам, может быть использован в бактериологических лабораториях в условиях повседневного определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом.

## **5.2 Анализ фенотипов резистентности штаммов *Salmonella* к индикаторным хинолонам**

Описанный выше комплексный подход к определению чувствительности *Salmonella* к хинолонам позволил получить достоверные результаты в отношении изученной популяции штаммов. Чувствительность к пефлоксацину определяли

ДДМ, налидиксовой кислоте – ДДМ и методом градиентной диффузии, ципрофлоксацину – методом градиентной диффузии с использованием Е-тестов (BioMerieux, Франция) и МІСЕ-тестов (Oxoid, Великобритания) и методом последовательных разведений в жидкой среде с использованием коммерческих тест-систем MIKROLATEST® SensiLaTest MIC GI и GII (Erba Mannheim) и Sensititre (Thermo Scientific) согласно инструкциям производителей. Результаты, попавшие в «зону технической неопределенности», подтверждали альтернативными методами.

В популяции исследованных штаммов *Salmonella* устойчивость к хинолонам (МПК ципрофлоксацина > 0,06 мг/л) выявлена у 722 штаммов (69,1%), причем для штаммов *S. Typhi* этот показатель был в 1,5 раза выше, чем для штаммов *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров (89,6 и 60,9%, соответственно) (Таблица 19).

Таблица 19 – Доля штаммов *Salmonella* с различными уровнями устойчивости к фторхинолонам

Уровень устойчивости к ФХ	Всего (n=1045)			<i>Salmonella</i> «не-тифоидных» сероваров (n=746)			<i>S. Typhi</i> (n=299)		
	абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ
Всего устойчивых	722	69,1	66,2-71,8	454	60,9	57,3-64,3	268	89,6	85,7-92,6
- низкого уровня МПК <sub>цип</sub> 0,12-0,5 мг/л	698	66,8	63,9-69,6	452	60,6	57,2-64,2	246	82,3	77,5-86,2
- высокого уровня МПК <sub>цип</sub> 4,0- 32 мг/л	24	2,3	1,5-3,4	2 <sup>1</sup>	0,3	0,1-1,0	22	7,3	4,9-10,9

Примечание: ФХ – фторхинолоны; <sup>1</sup>S. Kentucky

Особенно выражены эти показатели были у сероваров *S. Typhi* (89,6), *S. Infantis* (89,3%) и *S. Enteritidis* (68,7%). Следует отметить, что устойчивость к хинолонам у большинства штаммов (66,8%) характеризовалась низким уровнем (МПК ципрофлоксацина 0,12-0,5 мг/л). Устойчивость высокого уровня (МПК ципрофлоксацина 4-32,0 мг/л) была выявлена преимущественно у штаммов *S. Typhi* (22 штамма, 7,3%), в популяции *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров обнаружены два штамма *S. Kentucky* (0,3%) с устойчивостью высокого уровня (МПК ципрофлоксацина более 32,0 мг/л).

Учитывая характерные фенотипические особенности, присущие хромосомным и плазмидоопосредованным механизмам, на первом этапе детекции механизмов резистентности провели анализ чувствительности/устойчивости к

индикаторным препаратам из группы хинолонов: налидиксовой кислоте, пефлоксацину и ципрофлоксацину (Рисунок 29, Приложение 7).

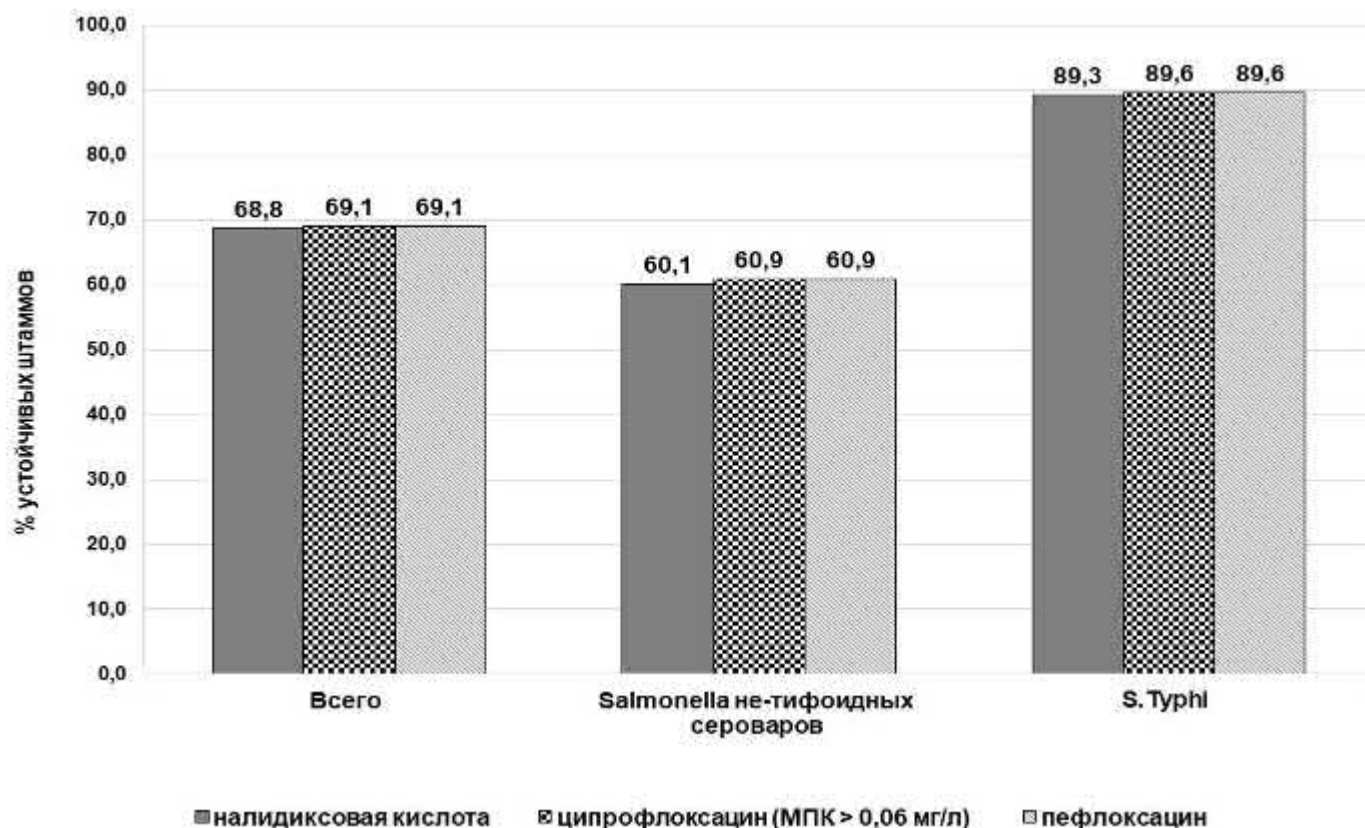


Рисунок 29 – Устойчивость к индикаторным хинолонам штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-19 гг. (% устойчивых штаммов)

Следует отметить полное совпадение результатов тестирования для ципрофлоксацина (методами МПК) и пефлоксацина (ДДМ): скрининг с пефлоксацином (после подтверждения значений, попавших в зону вероятной погрешности 23-25 мм) позволил выявить все штаммы с МПК ципрофлоксацина более 0,06 мг/л как среди штаммов *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров, так и *S. Typhi* (60,9 и 89,6%).

При проведении скрининга устойчивости к хинолонам диско-диффузионным методом с налидиксовой кислотой и пефлоксацином, сочетание устойчивости к обоим препаратам отмечено у 719 из 722 штаммов (99,6% устойчивых к хинолонам штаммов), что позволило предположить с высокой вероятностью наличие у этих штаммов хромосомного механизма устойчивости к хинолонам. В тоже время, у трех штаммов *Salmonella* (серовары *S. Typhimurium*,

*S. Corvallis* и *S. Typhi*) выявлен «парадоксальный» фенотип устойчивости к хинолонам: устойчивость к ципрофлоксацину (МПК 0,25 мг/л) и пефлоксацину (диаметр зоны подавления роста 17-18 мм), но чувствительность к налидиксовой кислоте (диаметр зоны подавления роста 19 мм, МПК 4-8,0 мг/л) (Таблица 20). «Парадоксальный» фенотип резистентности позволил заподозрить у этих штаммов наличие плазмидных механизмов устойчивости к хинолонам.

Таблица 20 – Характеристика штаммов *Salmonella* с «парадоксальным» фенотипом устойчивости к хинолонам (устойчивость низкого уровня к фторхинолонам, чувствительность к налидиксовой кислоте)

№ штамма	Серovar	Фенотип резистентности	Чувствительность к индикаторным хинолонам			
			ЦИП МПК, мг/л	ПФЛ d, мм	НК	
					d, мм	МПК, мг/л
14-431	<i>S. Typhimurium</i>	ЦРС <sup>1</sup> + ФХ + ХФ +Тет + Амг	0,25/R	17/R	19/S	8,0/S
14-1069	<i>S. Corvallis</i>	ФХ	0,25/R	17/R	18/S	4,0/S
264	<i>S. Typhi</i>	ФХ + Тет	0,25/R	20/R	20/S	4,0/S

Примечание: ЦИП – ципрофлоксацин, ПФЛ – пефлоксацин, НК – налидиксовая кислота, ЦРС – цефалоспорины расширенного спектра, ФХ – фторхинолоны, ХФ – хлорамфеникол, Тет – тетрациклин, Амг – аминогликозиды, МПК – минимальная подавляющая концентрация, d – диаметр зоны подавления роста; <sup>1</sup>продукция БЛРС генетической группы СТХ-М1

Таким образом, анализ фенотипов устойчивости к индикаторным хинолонам позволил предположить, что в популяции устойчивых к хинолонам штаммов *Salmonella* преобладают хромосомные механизмы резистентности 719 штаммов (99,6% устойчивых штаммов), плазмидоопосредованные механизмы заподозрены у трех штаммов (0,4%).

## ГЛАВА 6 Характеристика молекулярных механизмов резистентности штаммов *Salmonella* к хинолонам

Известно, что уровень устойчивости *Salmonella* к хинолонам, измеряемый величиной МПК ципрофлоксацина, зависит от молекулярного механизма приобретенной резистентности. Устойчивость низкого уровня (МПК ципрофлоксацина 0,12-0,5 мг/л) обусловлена, как правило, модификацией одного из двух ферментов, участвующих в репликации ДНК – ДНК-гиразы – вследствие одной однонуклеотидной замены в хромосомном гене *gyrA*, значительно реже – плазмидоопосредованными механизмами. Устойчивость высокого уровня (МПК ципрофлоксацина 1,0 мг/л и выше) возникает, как правило, в результате модификации обоих ферментов – ДНК-гиразы и топоизомеразы IV – вследствие многочисленных мутаций в генах *gyrA* и *parC*.

### 6.1 Характеристика хромосомных мутаций, обуславливающих устойчивость к хинолонам

По литературным данным у штаммов *Salmonella* описаны однонуклеотидные замены в QRDR-регионе гена *gyrA* в кодонах 83 (247- 249 bp; TCC; Ser, серин) и 87 (259-261 bp; GAC; Asp, аспарагиновая кислота), в результате которых возникают аминокислотные замены в субъединице GyrA ДНК-гиразы: Ser83→Phe (фенилаланин), Ser83→Tyr (тирозин), Ser83→Ala (аланин), Ser83→Gly (глицин), Ser83→Thr (треонин); Asp87→Gly (глицин), Asp87→Asn (аспарагин), Asp87→Tyr (тирозин), Asp87→Lys (лизин) или Asp87→Cys (цистеин) [119, 127, 301]. У 60-90,0% штаммов *Salmonella* с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам обнаруживают замену *gyrA* Ser83Phe, реже – *gyrA* Asp87Asn или их сочетание. У штаммов с устойчивостью высокого уровня отмечают модификацию обоих ферментов, участвующих в репликации ДНК, за счет двойной мутации в гене *gyrA* (Ser83Phe + Asp87Asn) и дополнительной мутации в гене *parC* Ser80Ile [124, 173, 186, 221, 241, 258, 295]. Другие хромосомные и плазмидоопосредованные механизмы описаны у штаммов *Salmonella* значительно реже и не имеют самостоятельного значения [119, 127].



В ходе нашего исследования провели детекцию молекулярных механизмов резистентности к хинолонам у 167 штаммов *Salmonella*: 39 штаммов *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров (устойчивых к хинолонам) и 128 штаммов *S. Typhi* (устойчивых и чувствительных к хинолонам). Характер мутаций в QRDR-регионе генов *gyrA* и *parC* установлен:

- путем анализа последовательностей, полученных методом полногеномного секвенирования с использованием сервиса ResFinder биоинформационной платформы CGE (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>);

- методом амплификации и прямого секвенирования внутреннего фрагмента генов согласно ранее опубликованному протоколу [253], при этом полученные нуклеотидные последовательности сравнивали в программе BLAST с референсными последовательностями генов *gyrA* и *parC* чувствительных к хинолонам штаммов: штаммы «не-тифоидных» сероваров – со штаммом *S. Typhimurium* LT2 (GenBank CP014051.2), штаммов *S. Typhi* – со штаммом *S. Typhi* Ty2 (GenBank AE014613). Результаты исследования представлены в таблице 21.

У всех изученных штаммов *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров, устойчивых к хинолонам, были обнаружены хромосомные мутации. У 37 из 39 исследованных штаммов было выявлено по одной однонуклеотидной замене в 83 и 87 кодонах гена *gyrA*, которые, по данным литературы, обуславливают устойчивость к хинолонам. Выявлено пять вариантов однонуклеотидных (аминокислотных) замен: G259T(Asp87Tyr) – у 33,3% штаммов; C248T(Ser83Phe) – 20,5%; G259A(Asp87Asn) – 23,1%; C248A(Ser83Tyr) – 10,3% и A260G(Asp87Gly) – 7,7%.

У двух штаммов *S. Kentucky* (5,1%), выделенных в 2015 г., с устойчивостью высокого уровня (МПК ципрофлоксацина 32,0 мг/л) выявлены множественные однонуклеотидные замены в генах *gyrA* и *parC*: две замены в 83 и 87 кодонах гена *gyrA* C248T(Ser83Phe) и G259A(Asp87Asn), также третья замена в 80 кодоне гена *parC* G239T (Ser80Ile). Оба штамма имели MDR-фенотип и кроме хинолонов, характеризовались устойчивостью к ампициллину, хлорамфениколу, тетрациклину и гентамицину.

Таблица 21 – Однонуклеотидные замены, выявленные у штаммов *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров с устойчивостью к фторхинолонам (n = 39)

Серовар	Число штаммов	МПК <sub>дип.</sub> , мг/л	Однонуклеотидные (аминокислотные) замены в QRDR-регионе гена <i>gyrA</i> и <i>parC</i>					
			<i>gyrA</i> C248T (Ser83Phe)	<i>gyrA</i> C248A (Ser83Tyr)	<i>gyrA</i> G259A (Asp87Asn)	<i>gyrA</i> G259T (Asp87Tyr)	<i>gyrA</i> A260G (Asp87Gly)	<i>gyrA</i> C248T(Ser83Phe) + G259A(Asp87Asn) + <i>parC</i> G239T(Ser80Ile)
<i>S. Enteritidis</i>	18	0,12-0,25	8	2	5	0	3	0
<i>S. Typhimurium</i>	2	0,12	0	0	2	0	0	0
<i>S. Infantis</i>	15	0,12-0,25	0	2	0	13	0	0
<i>S. Hadar</i>	1	0,25	0	0	1	0	0	0
<i>S. Newport</i>	1	0,25	0	0	1	0	0	0
<i>S. Kentucky</i>	2	8,0-16,0	0	0	0	0	0	2
Всего	39	-	8 (20,5%) <i>S. Enteritidis</i>	4 (10,3%)	9 (23,1%)	13 (33,3%) <i>S. Infantis</i>	3 (7,7%) <i>S. Enteritidis</i>	2 (5,1%) <i>S. Kentucky</i>

Примечание: С – цитозин, Т – тиамин, А – аденин, G – гуанин, Asp – аспарагиновая кислота, Asn – аспарагин, Gly – глицин, Phe – фенилаланин, Ser – серин, Tyr – тирозин, Ile – изолейцин

Выявленная у российских штаммов *S. Kentucky* устойчивость высокого уровня к хинолонам (МПК ципрофлоксацина более 32,0 мг/л) и ее молекулярный механизм (профиль множественных мутаций *gyrA* (Ser83Phe + Asp87Asn) и *parC* Ser80Ple), а также множественная устойчивость к АМП различных классов характерен для штаммов международного клона высокого риска *S. Kentucky* ST198, широко циркулирующих в настоящее время в странах ЕС [186, 236]. Один штамм депонирован в «ГКПМ-Оболенск» под номером В-9045.

Следует обратить внимание, что некоторые варианты мутаций отмечены у штаммов, относящихся только к одному серовару. Так, однонуклеотидные замены в гене *gyrA* C248T(Ser83Phe) и A260G(Asp87Gly) выявлены только у штаммов *S. Enteritidis*, G259T(Asp87Tyr) – у штаммов *S. Infantis*. Серовар *S. Enteritidis* характеризовался наибольшим разнообразием мутаций – у штаммов этого серовара обнаружены 4 из 5 вариантов однонуклеотидных замен в гене *gyrA*, наиболее характерна C248T(Ser83Phe), выявленная у половины исследованных штаммов этого серовара. Серовар *S. Infantis* был представлен в основном штаммами с однонуклеотидной заменой G259T(Asp87Tyr) – 13 из 15 штаммов, взятых в исследование. В целом, частота выявления тех или иных однонуклеотидных замен во многом определялась выборкой штаммов, которая была представлена в основном сероварами *S. Enteritidis* и *S. Infantis*.

Для изучения молекулярных механизмов резистентности возбудителя брюшного тифа были отобраны 128 штаммов *S. Typhi*, характеризующихся различной чувствительностью к хинолонам: 23 штаммов чувствительных (МПК ципрофлоксацина менее 0,06 мг/л) и 105 штаммов с устойчивостью различного уровня. У 116 штаммов (90,6%) были выявлены мутации в генах *gyrA*, *gyrB* и *parC* (как в пределах QRDR-регионов, так и вне этих регионов), мутации в гене *parE* не обнаружены. Детальные результаты анализа нуклеотидных последовательностей генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* представлены в Приложении 8. Мутации в гене *gyrA* выявлены как у штаммов, устойчивых к хинолонам (в QRDR-регионе), так и чувствительных к хинолонам (вне QRDR-региона); *gyrB* – только у чувствительных штаммов (вне QRDR-региона); *parC* – только у

штаммов, устойчивых к хинолонам (в QRDR-регионе). У 12 штаммов (9,4%) нуклеотидные последовательности генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* соответствовали референс-геному и не содержали нуклеотидных замен (все штаммы были чувствительны к фторхинолонам).

У чувствительных к хинолонам штаммов *S. Typhi* (23 штамма) не были найдены мутации в QRDR-регионе *gyrA*, *gyrB*, *parC*. Тем не менее, у 12 штаммов были выявлены мутации в генах *gyrA* и *gyrB* за пределами QRDR-региона: у 8 штаммов – однонуклеотидная замена *gyrA* A1612G (соответствующая аминокислотная замена Asn538Asp); у 1 штамма – две однонуклеотидные замены в гене *gyrB*: *gyrB* C627T (синонимичная замена Asn209Asn) и *gyrB* T818A(Ile273Asn); у 4 штаммов выявлены одновременно три мутации: *gyrA* A1612G(Asn538Asp), *gyrB* C627T(Asn209Asn) и *gyrB* T818A(Ile273Asn). Эти нуклеотидные замены не затрагивали участки генов, детерминирующие устойчивость к хинолонам, и не повлияли на чувствительность штаммов к этой группе препаратов.

У 105 устойчивых штаммов *S. Typhi* были выявлены мутации в QRDR-регионе генов *gyrA* (у всех штаммов) и *parC* (у 22 штаммов), которые согласно литературным данным обуславливают возникновение устойчивости к хинолонам. С наибольшей частотой выявлена однонуклеотидная замена *gyrA* G259A(Asp87Asn) – у 97 штаммов (92,4% устойчивых) она обнаружена как единственная мутация или в сочетании с другими. У 23 штаммов *S. Typhi* (21,9%) выявлена однонуклеотидная замена *gyrA* C248T(Ser83Phe), причем только у одного штамма – как единственная мутация, у остальных штаммов – в составе комбинированного генотипа устойчивости высокого уровня. У 7 штаммов (6,7%) обнаружена однонуклеотидная замена *gyrA* C248A(Ser83Tyr) как единственная мутация. Мутации в гене *parC* выявлены только в составе комбинированного генотипа в сочетании с двумя заменами в гене *gyrA*: *parC* G239T(Ser80Ile) – у 21 штамма (20,0%) и *parC* A251G(Glu84Gly) – у одного штамма (0,95%).

Соответствие фенотипической и молекулярной характеристики штаммов *S. Typhi* с устойчивостью различного уровня к фторхинолонам приведено в таблице 22.

Таблица 22 – Фенотипы и хромосомные механизмы устойчивости к хинолонам штаммов *S. Typhi*, выделенных в 2005-2019 гг. в РФ (n = 128)

Фенотип резистентности к фторхинолонам	МПК, мг/л		Однонуклеотидная замена (аминокислотная замена) в QRDR-регионе генов <i>gyrA</i> и <i>parC</i>	Число штаммов	
	НК	ЦИП		абс.	% от числа устойчивых (n=105)
S n=23	0,75-4,0	0,004-0,023	не выявлены	23	-
R: устойчивость низкого уровня n=83	24 - $\geq$ 256,0	0,094-0,25	<i>gyrA</i> G259A(Asp87Asn)	75	71,4
	$\geq$ 256,0	0,19-0,25	<i>gyrA</i> C248A(Ser83Tyr)	7	6,7
	$\geq$ 256,0	0,19	<i>gyrA</i> C248T(Ser83Phe)	1	0,95
R: устойчивость высокого уровня n=22	$\geq$ 256,0	8,0 - $\geq$ 32,0	<i>gyrA</i> C248T(Ser83Phe) + <i>gyrA</i> G259A(Asp87Asn) + <i>parC</i> G239T(Ser80Ile)	21	20,0
		1,0	<i>gyrA</i> C248T(Ser83Phe) + <i>parC</i> A251G(Glu84Gly)	1	0,95

Примечание: С – цитозин, Т – тиамин, А – аденин, G – гуанин, Asp – аспарагиновая кислота, Asn – аспарагин, Phe – фенилаланин, Ser – серин, Tyr – тирозин, Ile – изолейцин, НК – налидиксовая кислота, ЦИП – ципрофлоксацин, S – чувствительный при стандартном режиме дозирования, R – устойчивый

В исследование были взяты штаммы с устойчивостью как низкого уровня (МПК ципрофлоксацина 0,094-0,25 мг/л; 83 штамма), так и высокого (МПК ципрофлоксацина от 8,0 до более 32 мг/л; 22 штамма). Установлено, что устойчивость низкого уровня у всех штаммов была обусловлена одной однонуклеотидной заменой в QRDR-регионе гена *gyrA*: у большинства штаммов *S. Typhi* (71,4% устойчивых штаммов) выявлена замена *gyrA* G259A(Asp87Asn); у семи штаммов (6,7%) – замена *gyrA* C248A(Ser83Tyr); у одного штамма (0,9%) – *gyrA* C248T(Ser83Phe).

У всех штаммов *S. Typhi* с устойчивостью высокого уровня (22 штамма) выявлены сочетанные мутации в генах *gyrA* и *parC*, кодирующих оба фермент-мишени: у 21 штамма (20,0%) идентичный профиль из трех однонуклеотидных замен – *gyrA* C248T(Ser83Phe), *gyrA* G259A(Asp87Asn) и *parC* G239T(Ser80Ile), у одного штамма – их двух замен *gyrA* C248T(Ser83Phe) и *parC* A251G(Glu84Gly).

Сводные результаты детекции хромосомных мутаций представлены на рисунке 30.

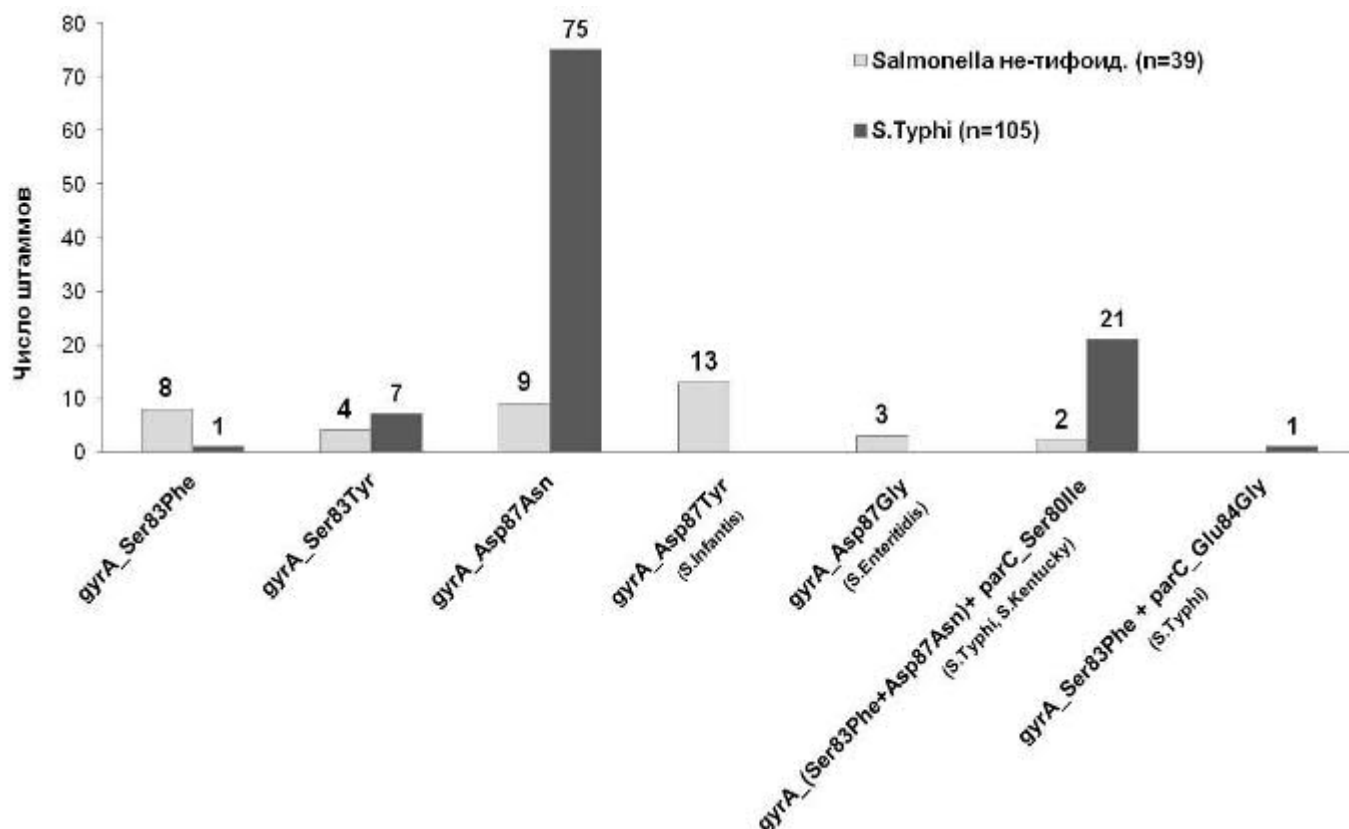


Рисунок 30 – Однонуклеотидные замены в QRDR-регионе хромосомных генов *gyrA* и *parC*, выявленные у штаммов *Salmonella*, устойчивых к хинолонам

## 6.2 Плазмидоопосредованные механизмы резистентности к хинолонам

У штаммов *Salmonella* описаны плазмидоопосредованные механизмы устойчивости к хинолонам. Гены, кодирующие эти механизмы, входят в состав трансферабельных элементов на плазмидах и часто локализованы рядом с генами, обуславливающими устойчивость к другим классам АМП. У штаммов *Salmonella* различных сероваров обнаружены гены семейств *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* и *qnrD* (у *S. Typhi* – *qnrB* и *qnrS*), а также *aac(6')-Ib-cr* (*S. Typhimurium*, *S. Paratyphi B*, *S. Typhi*) [117-119, 144, 175, 178, 213, 243, 257, 265, 293, 299, 301, 317, 331]. Следует отметить, что для штаммов, приобретших плазмидоопосредованные гены, как правило, характерен «парадоксальный» фенотип устойчивости к хинолонам: устойчивость низкого уровня к ципрофлоксацину (МПК 0,12-0,25 мг/л) при сохранившейся чувствительности к налидиксовой кислоте. У штаммов *Salmonella* с устойчивостью низкого уровня плазмидоопосредованные механизмы обнаруживают намного реже, чем хромосомные: по данным литературы доля таких штаммов составляла от 0,5 до 10,0% для генов семейства *qnr*, менее 1,0% - для гена *aac(6')-Ib-cr* [243, 284]. Тем не менее, наличие у штамма *Salmonella* плазмидоопосредованных механизмов значительно повышает риск возникновения дополнительных хромосомных мутаций и повышения МПК ципрофлоксацина выше 0,5 мг/л в процессе лечения хинолонами.

Учитывая описанный в литературе факт того, что в ряде случаев приобретение плазмидоопосредованных механизмов устойчивости не сопровождается формированием у штамма фенотипа резистентности (МПК ципрофлоксацина остается на уровне не более 0,06 мг/л), детекцию указанных механизмов провели у всех 1045 штаммов *Salmonella* (включая *S. Typhi*), как чувствительных, так и устойчивых к хинолонам. Провели поиск генов, ответственных за реализацию описанных у *Salmonella* плазмидоопосредованных механизмов резистентности к хинолонам: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* и *qnrD* (механизм защиты мишени путем синтеза белков Qnr); *aac(6')-Ib* (механизм инактивации антибиотика путем продукции фермента аминогликозид-ацетилтрансферазы).

Детекцию генов *qnrA*, *qnrB* и *qnrS* проводили на амплификаторе CFX96 (BioRad, США) в мультиплексной ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с интеркалирующим красителем SYBR GREEN, используя ранее опубликованные праймеры (ЗАО Евроген, РФ) и протоколы [292], смесь SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, США). Специфичность полученных ампликонов оценивали, анализируя кривые плавления продуктов амплификации исследуемых штаммов по сравнению с контрольными. Детекцию генов *qnrC*, *qnrD* и *aac-(6')-Ib* проводили на амплификаторе C1000 (BioRad, США) в ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации, используя ранее опубликованные праймеры (ЗАО Евроген, РФ) и протоколы [125, 268, 334], смесь «Taq M мастер-микс зеленый» (Алкор Био, РФ).

При постановке мультиплексной ПЦР для детекции генов *qnrA*, *qnrB* и *qnrS* температуры плавления продуктов амплификации для контрольных штаммов при трехкратном тестировании составили (Рисунок 31):

- для гена *qnrS* (S. Concord 09-8390) – 84,0°C,
- для гена *qnrB* (S. Montevideo 09-5278) – 87,2°C,
- для гена *qnrA* (S. Tompson 09-4311) – 89°C.

У трех штаммов обнаружены гены *qnrS*: S. Typhimurium, S. Corvallis и S. Typhi. Следует отметить, что именно у этих штаммов при фенотипическом скрининге был выявлен «парадоксальный» фенотип устойчивости к хинолонам: устойчивость к ципрофлоксацину и пefлоксацину при сохранившейся чувствительности к налидиксовой кислоте (Таблица 20). Другие гены, обуславливающие плазмидоопосредованные механизмы устойчивости к хинолонам, у штаммов *Salmonella* не обнаружены.

Таким образом, из 1045 исследованных штаммов *Salmonella* плазмидоопосредованные механизмы устойчивости (продукция белков семейства Qnr, обеспечивающих защиту мишени) выявлены только у трех штаммов (0,3%) с типичным для этого механизма фенотипом резистентности. Не было выявлено штаммов, у которых устойчивость к хинолонам была бы обусловлена



комбинированным механизмом – наличием хромосомных мутаций и плазмидоопосредованных генов.

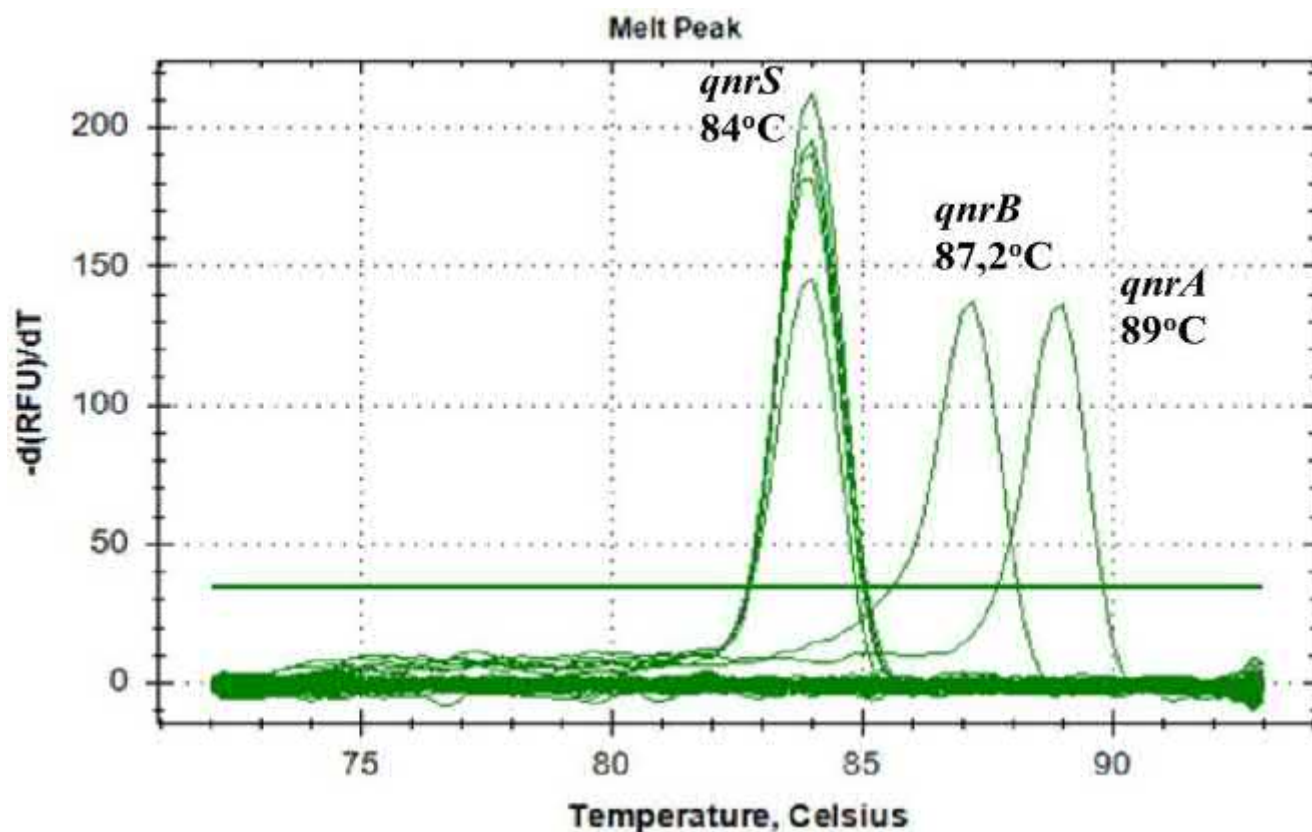


Рисунок 31 – Результаты детекции генов *qnrS*, *qnrA*, *qnrB* у штаммов *Salmonella* в мультиплексной ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с интеркалирующим красителем SYBR GREEN и анализом кривых плавления продуктов амплификации

Таким образом, при тестировании *Salmonella* к фторхинолонам с учетом методических особенностей, указанных в современных международных и отечественных рекомендациях, более 60,0% штаммов как «не-тифоидных» сероваров, так и *S. Typhi*, были устойчивы к фторхинолонам. Большинство резистентных к фторхинолонам штаммов (96,7%, 698 штаммов из 722), характеризовались устойчивостью низкого уровня (МПК ципрофлоксацина 0,12-0,5 мг/л). Высоко устойчивые штаммы (МПК 4,0 мг/л и выше) обнаружены преимущественно в популяции возбудителя брюшного тифа, где составили 7,3% штаммов. Выявлено два штамма *S. Kentucky* с устойчивостью высокого уровня (МПК ципрофлоксацина выше 32,0 мг/л), которые по характеристике MDR-фенотипа и молекулярному механизму устойчивости (профиллю множественных

хромосомных мутаций) соответствовали международному клону высокого риска *S. Kentucky ST198*.

Устойчивость к хинолонам практически у всех изученных молекулярными методами штаммов *Salmonella* была обусловлена хромосомным механизмом. Выявлены несинонимичные однонуклеотидные замены в QRDR-регионе хромосомных генов *gyrA* и *parC*: *gyrA* Ser83Phe, *gyrA* Ser83Tyr, *gyrA* Asp87Tyr, *gyrA* Asp87Asn, *gyrA* Asp87Gly, *parC* Ser80Ile и *parC* Glu84Gly. Плазмидоопосредованные механизмы устойчивости были обнаружены только у трех штаммов.

При условии использования описанного алгоритма комбинированного исследования (скрининг ДДМ с пефлоксацином и налидиксовой кислотой и определение МПК ципрофлоксацина) фенотипическая характеристика устойчивых к хинолонам штаммов *Salmonella* полностью соответствовала молекулярному механизму резистентности. Так, для всех штаммов с мутациями в QRDR-регионе хромосомных генов *gyrA* и *parC* была характерна устойчивость высокого уровня к налидиксовой кислоте, уровень устойчивости к фторхинолонам зависел от количества однонуклеотидных замен. Штаммы с единичной заменой характеризовались следующими результатами: диаметр зоны подавления роста для налидиксовой кислоты менее 8 мм, пефлоксацина – менее 24 мм, МПК ципрофлоксацина 0,12-0,25 мг/л (устойчивость низкого уровня). Для штаммов с множественными заменами характерен высокий уровень устойчивости ко всем тестируемым хинолонам: диаметр зоны подавления роста для налидиксовой кислоты 6 мм, пефлоксацина – 6-12 мм, МПК ципрофлоксацина 4,0 мг/л и выше.

Штаммы, у которых был выявлен плазмидоопосредованный механизм устойчивости (белок QnrS), характеризовались «парадоксальным» фенотипом резистентности (чувствительностью к налидиксовой кислоте и устойчивостью низкого уровня к ципрофлоксацину), и также достоверно выявлялись при использовании алгоритма комбинированного исследования: зона подавления роста для диска налидиксовой кислоты более 20 мм (S), пефлоксацина – менее 24 мм (R); МПК ципрофлоксацина 0,12-0,25 мг/л (R). Использование при скрининге

дополнительного индикаторного хинолона – налидиксовой кислоты – позволило получить достоверный результат даже в случае сомнительных результатов тестирования препаратов, рекомендованных нормативными документами (пемфлуксацина и ципрофлоксацина).

Устойчивость низкого уровня практически у всех штаммов была обусловлена хромосомным механизмом – модификацией ДНК-гиразы вследствие различных однонуклеотидных замен в гене *gyrA*, у трех штаммов – вследствие плазмидоопосредованного механизма защиты мишени (ген *qnrS*). Устойчивость высокого уровня, выявленная у 24 штаммов, была обусловлена идентичным хромосомным механизмом – сочетанной модификацией ДНК-гиразы и топоизомеразы вследствие трех однонуклеотидных замен в генах *gyrA* и *parC*.

Два штамма *S. Kentucky* с устойчивостью высокого уровня и профилем множественных однонуклеотидных замен *gyrA* (Ser83Phe+Asp87Asn) + *parC* Ser83Phe соответствовали штаммам известного международного полирезистентного клона *S. Kentucky* ST198.

15 штаммов *Salmonella*, характеризующихся различными уровнями устойчивости к фторхинолонам и механизмами резистентности, депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» в 2014-2020 гг. под номерами В-8452, В-8453, В-8463, В-8464, В-8654, В-8655, В-8861-8868, В-9045. На два штамма *S. Typhi*, устойчивые к хинолонам, получены патенты (№№ 2707548, 2707925). Результаты исследований вошли в базы данных «*S. Typhi*-Museum: биологические свойства возбудителя брюшного тифа» (свидетельство о регистрации № 2019621507), «*Salmonella*-Museum: антибиотикочувствительность и механизмы резистентности» (№ 2019622278) и «*S. Typhi*-Museum: молекулярные детерминанты резистентности (№ 2020620406) (Приложение 3). Семь последовательностей генов *gyrA*, *gyrB* и *parC* штаммов *S. Typhi*, характеризующихся различными однонуклеотидными заменами, депонированы в GenBank под номерами: Accession MK112505, MK112506, MK112507, MK112508, MK112509, MG596303, KT955017.

## ГЛАВА 7 Механизмы множественной резистентности штаммов *S. Typhi*

В РФ в популяции штаммов возбудителя брюшного тифа, выделенных в 2005-2019 гг., девять штаммов (3,0%) характеризовались фенотипом множественной устойчивости (MDR-фенотип). Из них семь штаммов имели «классический» MDR-фенотип: устойчивость к АМП «первой линии» аминопенициллину, хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу, а также тетрациклину и хинолонам (устойчивость низкого уровня), описанный в литературе у штаммов *S. Typhi*. Устойчивость ко всем перечисленным препаратам, за исключением хинолонов, достигала очень высокого уровня (32,0 – 256,0 мг/л). В отношении хинолонов выявлена устойчивость высокого уровня к налидиксовой кислоте (МПК 128,0-256,0 мг/л) и низкого уровня к фторхинолонам (МПК ципрофлоксацина 0,12-0,5 мг/л). Два штамма *S. Typhi*, выделенные в 2015 г., характеризовались фенотипами, отличающимися от «классического» MDR-фенотипа возбудителя брюшного тифа по некоторым АМП: один штамм оставался чувствительным к хлорамфениколу, второй штамм сохранял чувствительность к ампициллину и хлорамфениколу и, в отличие от остальных штаммов, имел высокий уровень устойчивости к ципрофлоксацину (> 32,0 мг/л) (Таблица 23).

Все штаммы оставались чувствительны к цефалоспорином расширенного спектра (МПК цефотаксима 0,03-0,12 мг/л) и карбапенемам (МПК менее 0,12 мг/л). МПК азитромицина (альтернативного препарата, используемого для лечения брюшного тифа, вызванного устойчивыми к хинолонам штаммами) составляла 1,0-1,5 мг/л, что позволило отнести все штаммы данного фенотипа к «дикой» популяции, чувствительной к азитромицину (ЕСOFF 16,0 мг/л).

Данные полногеномного секвенирования MDR-штаммов были проанализированы с помощью сервисов ResFinder и PlasmidFinder биоинформатической платформы CGE (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>).

Таблица 23 – Характеристика полирезистентных штаммов *S. Typhi* (фенотип MDR), выделенных в РФ в 2005-2019 гг.

№ штамма	Территория	Год выделения	МПК, мг/л						Детерминанты резистентности		Филогенет. группа (SNP-типирование)
			АМП	НК	ЦИП	ТМС	ХФ	ТЕТ	Гены на плазмиде рНМС1 (R27) группы IncIII	Хромосомные мутации	
40	Иркут. область	2005	>256,0	>256,0	0,25	> 32,0	>256,0	128,0	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>catA1</i> , <i>tet(B)</i> , <i>dfrA7</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aph(3'')</i> -Ib, <i>aph(6)-Id</i>	<i>gyrA</i> Ser83Tyr	но
44	Ленин. область	2006	>256,0	128,0	0,12	> 32,0	>256,0	128,0	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>catA1</i> , <i>tet(B)</i> , <i>dfrA7</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aph(3'')</i> -Ib, <i>aph(6)-Id</i>	<i>gyrA</i> Asp87Asn	но
67	С-Пб	2006	>256,0	>256,0	0,25	> 32,0	>256,0	64,0	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>catA1</i> , <i>tet(B)</i> , <i>dfrA7</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aph(3'')</i> -Ib, <i>aph(6)-Id</i>	<i>gyrA</i> Ser83Tyr	H58 (4.3.1) инд.профиль
86	С-Пб	2006	>256,0	256,0	0,25	> 32,0	>256,0	128,0	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>catA1</i> , <i>tet(B)</i> , <i>dfrA7</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aph(3'')</i> -Ib, <i>aph(6)-Id</i>	<i>gyrA</i> Asp87Asn	но
87	С-Пб	2006	>256,0	>256,0	0,25	> 32,0	>256,0	64,0	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>catA1</i> , <i>tet(B)</i> , <i>dfrA7</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aph(3'')</i> -Ib, <i>aph(6)-Id</i>	<i>gyrA</i> Asp87Asn	но
92	С-Пб	2006	>256,0	128,0	0,25	> 32,0	>256,0	128,0	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>catA1</i> , <i>tet(B)</i> , <i>dfrA7</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aph(3'')</i> -Ib, <i>aph(6)-Id</i>	<i>gyrA</i> Asp87Asn	но
293	С-Пб	2013	>256,0	128,0	0,5	> 32,0	>256,0	128,0	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>catA1</i> , <i>tet(B)</i> , <i>dfrA7</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aph(3'')</i> -Ib, <i>aph(6)-Id</i>	<i>gyrA</i> Asp87Asn	H58 (4.3.1) G2
302	С-Пб	2015	>256,0	>256,0	0,25	> 32,0	<b>4,0 S</b>	128,0	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>tet(B)</i> , <i>dfrA7</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aph(3'')</i> -Ib, <i>aph(6)-Id</i>	<i>gyrA</i> Asp87Asn	H58 (4.3.1) G2
315	Арханг. область	2015	<b>0,5 S</b>	>256,0	>32,0	> 32,0	<b>4,0 S</b>	128,0	Плазмида R46 группы IncN: <i>tet(A)</i> , <i>dfrA15</i> , <i>sul1</i> , <i>aadA1</i>	<i>gyrA</i> Ser83Phe <i>gyrA</i> Asp87Asn <i>parC_Ser80Ile</i>	H58 (4.3.1) G3

Примечание: АМП – ампициллин, НК – налидиксовая кислота, ЦИП – ципрофлоксацин, ТМС – триметоприм/ сульфаметоксазол, ХФ – хлорамфеникол, ТЕТ – тетрациклин, Asp – аспарагиновая к-та, Asn – аспарагин, Phe – фенилаланин, Ser – серин, Tyr – тирозин, Ile – изолейцин, но – не определяли

Установлено, что фенотип множественной устойчивости возник в результате приобретения хромосомных (устойчивость к хинолонам) и плазмидных (АМП других классов) молекулярных механизмов. У всех штаммов выявлены мутации в QRDR-регионе гена *gyrA*: у штаммов с устойчивостью низкого уровня к ципрофлоксацину – одна однонуклеотидная замена Asp87Asn (6 штаммов) или Ser83Tyr (два штамма); у штамма с устойчивостью высокого уровня – множественные мутации в генах *gyrA* и *parC*, *gyrA* (Ser83Phe + Asp87Asn) и *parC* Ser80Ile.

У всех штаммов выявлены плазмиды, содержащие гены резистентности к различным классам АМП: у восьми штаммов обнаружены плазмиды рНСМ1, гомологичные известной плазмиде R27 группы несовместимости IncHI1 (впервые описана у штаммов *S. Typhimurium*), у одного штамма – плаزمида R46 группы IncN. MDR-фенотип соответствовал спектрам генов резистентности, выявленным на плаزمиде: 7 штаммов с классическим MDR-фенотипом имели идентичный набор генов, обуславливающих устойчивость к аминопенициллинам (*bla*<sub>TEM-1</sub>), хлорамфениколу (*catA1*), триметоприму (*dfrA7*), сульфаниламидам (*sul1* и *sul2*), тетрациклину (*tetB*) и стрептомицину (*aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*). У одного штамма с «не-классическим» MDR-фенотипом (чувствительный к хлорамфениколу) среди перечисленных генов отсутствовал *catA1*. Определили сиквенс-тип плазмид рНСМ1, анализируя аллельное разнообразие шести локусов плазмиды [196]. Для этого нуклеотидные последовательности локусов плазмиды, полученные для исследуемых штаммов в рамках полногеномного секвенирования, сравнивали с последовательностями, депонированными в GenBank (FJ183728 – FJ183741) с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Установлено, что плазмиды рНСМ1 восьми штаммов относились к сиквенс-типу PST6.

У одного штамма с не-классическим MDR-фенотипом (чувствительный к ампициллину, хлорамфениколу; устойчивость высокого уровня к ципрофлоксацину) выявлена плазмида R46 группы IncN, содержащая гены резистентности *tet(A)*, *dfrA15*, *sul1*, *aadA1*.

По результатам дальнейшего исследования методом SNP-типирования

четырёх штаммов с MDR-фенотипом, была установлена их принадлежность к одному филогенетическому кластеру – гаплотипу H58 (субкладе 4.3.1), известному международному «азиатскому» клону возбудителя брюшного тифа, широко распространённому в странах Юго-Восточной Азии. В то же время внутри этого кластера штаммы относились к разным генетическим подгруппам. Штаммы с мутацией *gyrA*\_Asp87Asn кластеризовались в одну группу G2. Штамм *S. Typhi* с редко встречающейся однонуклеотидной заменой *gyrA*\_Ser83Tyr имел индивидуальный SNP-профиль внутри гаплотипа H58. Штамм с «неклассическим» MDR-фенотипом кластеризовался в подгруппу G3, к которой относились практически все штаммы с устойчивостью высокого уровня к фторхинолонам, выявленные в популяции *S. Typhi*.

Таким образом, особенность российских штаммов *S. Typhi* с множественной устойчивостью к АМП, заключалась в том, что у штаммов гаплотипа H58 (субклада 4.3.1) фенотип резистентности сформировался в результате сочетания нескольких приобретенных механизмов устойчивости: хромосомных (однонуклеотидные замены в генах *gyrA* и *parC*, обуславливающие устойчивость к хинолонам) и плазмидоопосредованных (гены резистентности к АМП «первой линии» и тетрациклину). «Классический» MDR-фенотип был обусловлен плазмидой рНСМ1 (R27) сиквенс-типа PST 6. Известно, что такие штаммы *S. Typhi* H58 широко циркулировали в 1990-х – 2000-х гг. в странах Юго-Восточной Азии.

### **7.1 Перечень препаратов, рекомендованный для проведения мониторинга чувствительности штаммов *Salmonella* к антибиотикам**

Учитывая многокомпонентность проблемы антибиотикорезистентности возбудителей общих для человека и животных, мониторинг должен носить интегративный характер и обеспечивать сопоставимость данных, полученных при тестировании штаммов *Salmonella*, выделенных от человека, сельскохозяйственных животных, птицы и пищевых продуктов. Список тестируемых антибиотиков должен быть достаточно широким и включать препараты, отвечающие одному или нескольким перечисленным критериям:

- a. антибиотик используется для лечения сальмонеллезных инфекций как препарат выбора или альтернативный;
- b. препарат является клинически значимым и широко используется в медицине;
- c. препарат является «индикаторным» и позволяет выявить важный механизм резистентности: продукцию бета-лактамаз, хромосомную и плазмидную устойчивость к фторхинолонам;
- d. антибиотик может быть использован в перспективе для лечения инфекций, вызванных полирезистентными штаммами *Salmonella*;
- e. препарат, устойчивость к которому может быть использована как маркер при эпидемиологическом расследовании, для мониторинга эпидемических международных клонов возбудителя.

Анализ полученных нами результатов фенотипических и молекулярно-генетических исследований позволил рекомендовать перечень препаратов, которые необходимо тестировать при проведении мониторинга чувствительности /резистентности штаммов *Salmonella* к АМП (Таблица 24).

Таблица 24 – Перечень АМП для определения чувствительности штаммов *Salmonella* в рамках мониторинга чувствительности/резистентности к АМП

Класс АМП	Антибиотик из класса	Критерии включения				
		a	b	c	d	e
Аминопенициллины	Ампициллин	+				+
«Защищенные» пенициллины	Амоксициллин/ клавулановая к-та	+	+			
Цефалоспорины расширенного спектра	Цефотаксим	+	+	+		+
	Цефтазидим			+		+
Хинолоны	Ципрофлоксацин <sup>2</sup>	+	+	+		+
	Пефлоксацин			+		
	Налидиксовая к-та			+		
Нитрофураны <sup>1</sup>	Нитрофурантоин	+				
Аминогликозиды	Стрептамицин Гентамицин					+
Амфениколы	Хлорамфеникол	+				+
Карбапенемы	Меропенем		+	+	+	+
Ингибиторы дигидрофолатредуктазы + сульфаниламиды	Триметоприм/ сульфаметоксазол	+				+
Макролиды	Азитромицин <sup>2</sup>	+				



Продолжение таблицы 24

Класс АМП	Антибиотик из класса	Критерии включения				
		a	b	c	d	e
Полимиксины	Колистин <sup>3</sup>				+	
Тетрациклины	Тетрациклин					+
	Тигециклин <sup>3</sup>				+	
<b>Дополнительно для штаммов, устойчивых к ЦРС</b>						
Цефалоспорины расширенного спектра	Цефепим	+		+		
	Цефокситин			+		

Примечания: <sup>1</sup>Для *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров; <sup>2</sup>методы определения МПК;

<sup>3</sup> метод разведений в бульоне

## **ГЛАВА 8 Филогенетическая характеристика штаммов *S. Typhi*, возбудителя брюшного тифа в Российской Федерации в 2005-2019 гг.**

Филогенетическое родство штаммов *S. Typhi*, выделенных в РФ в 2005-2019 гг., оценивали несколькими молекулярными методами с использованием международных баз данных:

- методом мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) на основе анализа нуклеотидных последовательностей семи конститутивных генов «домашнего хозяйства» (англ., house keeping genes) с использованием биоинформатических платформ Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk>) и Center of Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk>), вводя данные полногеномного секвенирования – 92 штамма;
- методом SNP-типирования (выявление спектра ортологичных единичных нуклеотидных вариаций в геномной ДНК) с использованием программы RaXML (метод максимального правдоподобия) для филогенетической реконструкции матрицы ортологичных SNP, программы Figtree v1.3.1. – для визуализации филогенетического древа глобальной популяции *S. Typhi*, программы Genotyphi (<https://github.com/katholt/genotyphi>) – для филогенетической классификации геномов штаммов *S. Typhi* по алгоритму анализа полногеномных данных, предложенному Wong et al. [333] – 92 штамма;
- методом макрорестрикционного анализа с разделением продуктов рестрикции в пульсирующем электрическом поле (PFGE) с использованием программы BioNumerix 6.0 (Applied Maths, Бельгия) для анализа графических файлов профилей макрорестрикции PFGE и кластерного анализа – 107 штаммов.

Для анализа геномной ДНК штаммов методами MLST и SNP-типирования использовали данные полногеномного секвенирования (контиги). Геномные ДНК-библиотеки готовили с использованием набора реагентов MiSeq Nextera XT Library Preparation Kit (Illumina, США), секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с набором реагентов MiSeq Reagent Kit v3 600 cycles (Illumina, США). В качестве референс-генома использовали геном штамма

*Salmonella* Typhi Ty2 (GenBank AE014613). Сборку и анализ геномов проводили с помощью CLC Genomics Workbench 8.0 (QIAGEN, США).

### 8.1 Характеристика методом MLST

Для филогенетического анализа популяции возбудителя брюшного тифа был использован метод мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) на основе изучения полиморфизма семи генов «домашнего хозяйства» *Salmonella enterica*. Выбор изучаемых генов и отнесение штаммов *S. Typhi* к определенному сиквенс-типу проводили согласно общепринятой международной схеме MLST-типирования *Salmonella enterica*, доступной на сервере Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk>), загрузку данных полногеномного секвенирования (в FASTA формате) и анализ проводили посредством сервиса MLST 2.0 биоинформационной платформы CGE (<https://cge.cbs.dtu.dk>). В исследование включили 92 штамма *S. Typhi* с различными фенотипами и генотипами резистентности, выделенных в разные годы на различных территориях РФ.

Установлено, что все изученные штаммы *S. Typhi* принадлежали к двум глобально доминирующим сиквенс-типам: ST1 – 77 штаммов (83,7%) и ST2 – 15 штаммов (16,3%). Штаммы других сиквенс-типов не выявлены. Полученные данные соответствуют международным и свидетельствуют о доминирующем распространении двух сиквенс-типов в популяции возбудителя брюшного тифа в РФ. В дальнейшем при сравнении результатов типирования двумя методами – MLST и SNP-типирования, нами установлено, что все штаммы ST1 относились к субкладе 4.3.1 (гаплотипу H58), к ST2 принадлежали только штаммы, относящиеся к кладам 1, 2 и 3. Следует отметить, что штаммы *S. Typhi* бивара 1 относились к ST1, единичные штаммы бивара 2, встречающиеся в изученной популяции, относились к ST2.

### 8.2 Филогенетический анализ методом SNP-типирования

*S. Typhi* – относительно «молодой» возбудитель с высоко консервативным геномом и выраженной клональностью популяции. Этот факт подтверждается результатами исследований методом MLST: 95,0% всех изученных в мире штаммов *S. Typhi* принадлежат к двум близкородственным сиквенс-типам (ST1 и ST2), что

согласуется с нашими данными. Учитывая этот факт, был проведен филогенетический анализ спектра ортологичных однонуклеотидных вариаций (от англ. Single nucleotide polymorphism, SNP) в геномах изученных штаммов (SNP-типирование) для характеристики структуры и оценки положения «российских» штаммов *S. Typhi* в глобальной популяции возбудителя брюшного тифа.

На первом этапе исследования по результатам анализа полного спектра SNP в геномах 1683 штаммов *S. Typhi* (включая 92 штамма, выделенных в РФ) было построено глобальное филогенетическое древо возбудителя (Рисунок 32). Полногеномные данные для российских штаммов были получены в ходе нашего исследования, данные для штаммов, выделенных в других странах, взяты из архива European Nucleotide Archive (accession ERP001718). Таким образом, выборка характеризовалась широким временным промежутком выделения штаммов (с 1905 по 2013 гг.) и географией охвата: 63 страны, 6 континентов (Азия, Африка, Северная и Южная Америка, Европа, Австралия и Океания). В качестве референс-генома использовали нуклеотидную последовательность штамма *Salmonella Typhi* CT18 (AL513382). Филогенетическую реконструкцию проводили методом максимального правдоподобия (англ., maximum likelihood), используя программу RAxML, в качестве модели нуклеотидных замен использовали модель GTR+I. Визуализацию филогенетического древа проводили в программе Figtree v1.3.1. При проведении анализа для обозначения крупных генетических кластеров использовали понятие «гаплотип», предложенное Roumagnac et al. [287]. Большинство российских штаммов *S. Typhi* на филогенетическом древе кластеризовались в филогенетические группы, которые мы обозначили как филогруппы G1-G6, некластеризующиеся штаммы обозначили как индивидуальные генотипы S1-S6.

Установлено, что большинство штаммов (76 штаммов, 82,6%) принадлежали к гаплотипу H58, известному как международный клон высокого риска (так называемый «азиатский» клон). Филогенетическая линия гаплотипа H58 была неоднородна: штаммы кластеризовались в три филогенетические группы (G1, G2 и G3), а также пять штаммов имели индивидуальные генотипы (S1-S5).

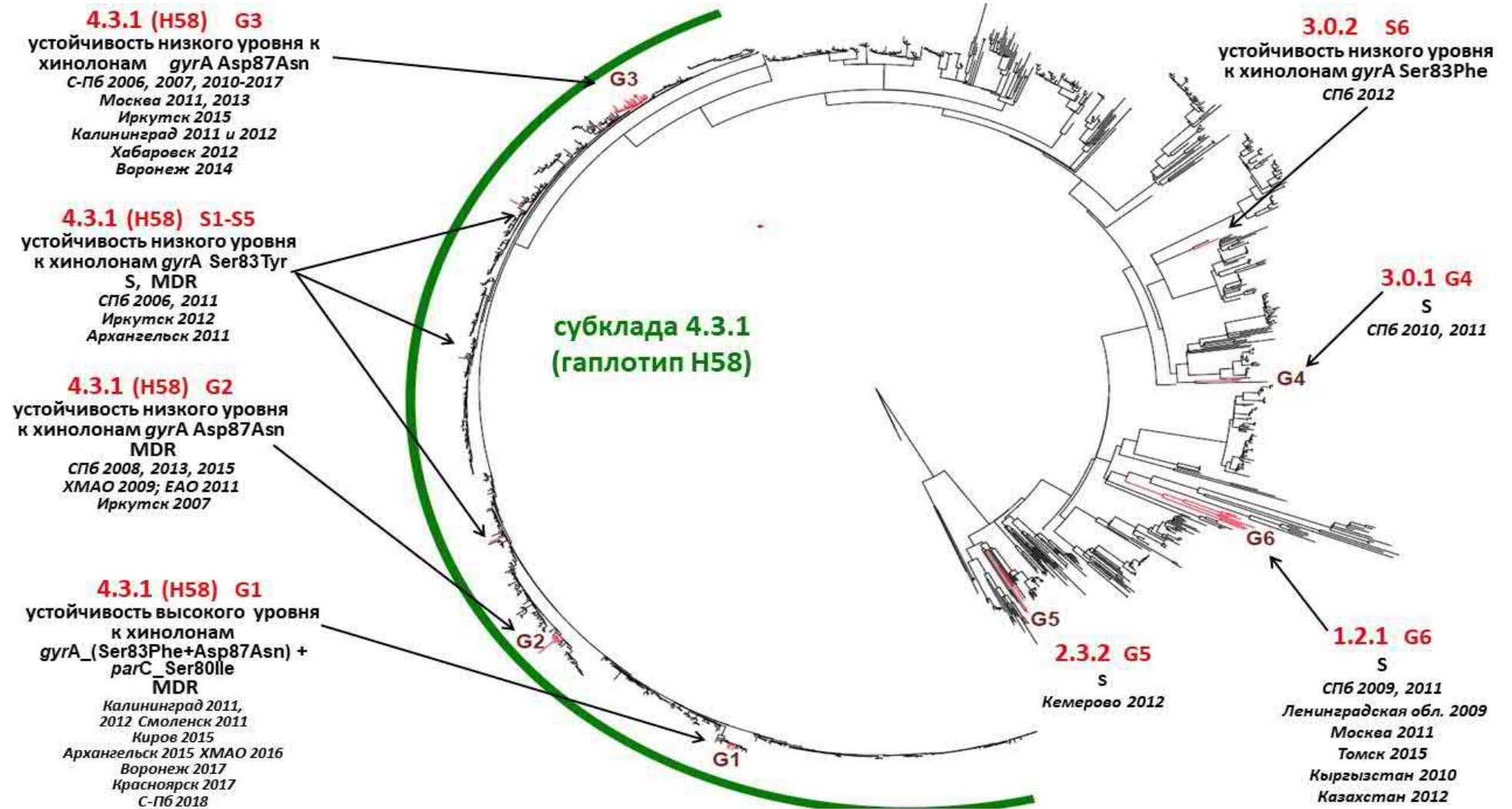


Рисунок 32 – Глобальное филогенетическое древо, построенное на основе анализа полного спектра ортологических SNP 1683 геномов *S. Typhi* (метод максимального правдоподобия)

Примечание: зеленым цветом выделена филогенетическая линия гаплотипа H58, красным цветом – российские штаммы *S. Typhi*. Кластеризующиеся штаммы обозначали как филогруппы G1-G6, некластеризующиеся – как индивидуальные генотипы S1-S6

Наиболее многочисленная филогенетическая группа G3 включала 54 штамма гаплотипа H58 с идентичным фенотипом и механизмом резистентности к АМП: устойчивостью к фторхинолонам низкого уровня, обусловленной однонуклеотидной заменой *gyrA* Asp87Asn. Штаммы этой филогенетической группы выделяли практически во все годы на различных территориях РФ (Санкт-Петербург, Московская, Воронежская, Калининградская области, Хабаровский край). К этой генетической группе относились штаммы, вызвавшие две крупные вспышки брюшного тифа в 2006 г. (Санкт-Петербург) и 2013 г. (Московская область). На филогенетическом древе глобальной популяции возбудителя брюшного тифа российские штаммы расположены вместе со штаммами, выделенными в Пакистане, Индии и других странах Юго-Восточной Азии (Вьетнам, Лаос, Камбоджа). У большинства заболевших была выявлена эпидемиологическая связь заболевания с пребыванием в странах Средней Азии (Узбекистан, Таджикистан) или Индии.

К филогенетической группе G1 гаплотипа H58 принадлежали 10 штаммов с устойчивостью высокого уровня к фторхинолонам, обусловленной тремя однонуклеотидными заменами в генах: *gyrA* (Ser83Phe + Asp87Asn) и *parC* Ser80Ile. Кроме того, у одного из штаммов выявлен MDR-фенотип, обусловленный плазмидой рНСМ1(R27) (группа несовместимости IncHI1) сиквенс-типа PST6. Такие штаммы немногочисленны в российской популяции возбудителя, первый штамм зарегистрирован в Калининградской области, где он вызвал групповое заболевание в конце 2011–начале 2012 гг. Начиная с 2015 г. единичные штаммы этой филогенетической группы ежегодно выделяли на территориях РФ (Смоленская, Воронежская, Кировская, Архангельская области, Ханты-Мансийский АО, Красноярский край, Санкт-Петербург). На филогенетическом древе глобальной популяции возбудителя брюшного тифа российские штаммы группы G1 расположены генетически близко вместе со штаммами, выделенными в Индии. Эпидемиологическое расследование показало, что в большинстве случаев инфицирование заболевших происходило в этой стране.

Семь штаммов филогенетической группы G2 гаплотипа H58 характеризовались одинаковым фенотипом и механизмом устойчивости к

фторхинолонам (устойчивость низкого уровня, обусловленная мутацией в гене *gyrA* Asp87Asn), два штамма также обладали дополнительным MDR-фенотипом, обусловленным плазмидой pHCM1(R27) сиквенс-типа PST6. Штаммы этой филогенетической группы были выделены в Санкт-Петербурге (2008 г.), Ханты-Мансийском АО (2009 г.), Еврейской АО (2011 г.) и Иркутской области (2017 г.), штаммы с MDR-фенотипом – в Санкт-Петербурге (2013 и 2015 гг.).

Пять штаммов *S. Typhi* гаплотипа H58 с индивидуальными генотипами (S1-S5) отличались чувствительностью ко всем АМП или однонуклеотидной заменой *gyrA* Ser83Tyr (устойчивость к фторхинолонам низкого уровня), которая не встречалась у штаммов других генетических групп.

Таким образом, к гаплотипу H58 (международному «азиатскому» клону) принадлежали штаммы *S. Typhi*, выделенные на территориях РФ в различные годы. Штаммы гаплотипа H58, выделенные при расследовании случаев группой заболеваемости (Санкт-Петербург 2006 г., Калининград 2012 г., Московская область 2013 г.), входили в одну филогенетическую группу и характеризовались идентичными фенотипами и механизмами резистентности (идентичными однонуклеотидными заменами).

Учитывая тот факт, что в глобальной популяции возбудителя брюшного тифа другие гаплотипы представлены немногочисленными штаммами, в научной литературе эти гаплотипы объединяют общим названием «не-H58». В нашем исследовании 16 штаммов *S. Typhi* (17,4%) не принадлежали к филогенетической линии гаплотипа H58. Следует отметить, что в отличие от гаплотипа H58, штаммы которого по результатам MLST-типирования принадлежали к сиквенс-типу ST1, штаммы гаплотипов «не-H58» относились к другому сиквенс-типу – ST2. Практически для всех штаммов этой группы была характерна чувствительность к АМП, только два штамма имели устойчивость низкого уровня к фторхинолонам, но она была обусловлена однонуклеотидной заменой *gyrA* Ser83Phe, которую у штаммов гаплотипа H58 выявляли только в сочетании с другими заменами (у штаммов с устойчивостью высокого уровня к фторхинолонам). Восемь штаммов, чувствительных к АМП, кластеризовались в

филогенетическую группу G6: все эти штаммы были выделены от жителей Кыргызстана и Казахстана и от граждан РФ, контактных с ними. По два чувствительных штамма кластеризовались в группы G4 и G5 (случай группового заболевания в г. Кемерово), четыре штамма обладали индивидуальными генотипами.

На втором этапе исследования мы провели филогенетическую классификацию геномов штаммов по упрощенному алгоритму анализа полногеномных данных, предложенному Wong et al. [333], основанному на выявлении только филогенетически значимых SNP, используя платформу Genotyphi (<https://github.com/katholt/genotyphi>) [332]. Ранее авторы указанной платформы провели филогенетическую реконструкцию глобальной популяции *S. Typhi* и показали, что она представлена 4 первичными генетическими кластерами (1-4), которые в свою очередь подразделяются на 16 клад и 49 субклад. Установлено, что субклады имеют относительно тесную ассоциацию с определенными регионами мира. Таким образом, анализируя полногеномные данные штамма, можно определить его положение на глобальном филогенетическом древе и с высокой долей вероятности установить географический регион происхождения.

Анализ российской популяции возбудителя брюшного тифа показал, что она представлена штаммами, относящимися ко всем четырем первичным генетическим кластерам, из которых наиболее представлен кластер 4 (83,7%) (Таблица 25). Внутри кластера 4 большинство российских штаммов (82,6%) относились к субкладе 4.3.1. При сравнении этих результатов с данными глобального филогенетического дерева установлено, что все штаммы субклады 4.3.1 относились к гаплотипу H58 (Рисунок 32). В тоже время, внутри субклады 4.3.1. российские штаммы дополнительно кластеризовались в две генетические линии. Линия 4.3.1.1 (63 штамма, 68,5%) была представлена штаммами с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам, обусловленной однонуклеотидной заменой *gyrA* Asp87Asn (за исключением двух чувствительных штаммов).



Таблица 25 – Характеристика популяции *S. Typhi*, выделенных в РФ в 2005-2018 гг., по филогенетической структуре, механизмам резистентности к АМП и географическому региону происхождения (n=92)

Генотип по методу:			Механизмы резистентности	Фенотип резистентности	Количество штаммов	Территории и годы выделения штаммов	Вероятное происхождение штамма* (microreact.org/project/styphi)
MLST	Wong et al.	Глобальная филогения (гаплотипы Roumagnac)					
ST2	1.2.1	не-H58_G6	WT	S	8	С-Петербург, 2009 и 2011; Ленинградская область, 2009; Московская область, 2011; Томская область, 2015; Кыргызстан, 2010; Казахстан, 2012	Юго-Восточная Азия 100% (Вьетнам)
ST2	2.0.2	не-H58_S8	<i>gyrA</i> Ser83Phe	FQ-LLR	1	С-Петербург, 2017	Сев.Америка 50% (Мексика) Сев. Африка 50% (Алжир, Тунис)
ST2	2.3.2 (n=3)	не-H58_G5	WT	S	2	Кемеровская область, 2012	Зап.Африка 33% (Нигерия, Мали) Юж.Америка 27% (Аргентина) Юго-Вост. Азия 20% (Вьетнам, Тайланд) Сев.Америка 13% (Мексика) Зап. Азия 7% (Турция)
		не-H58_S7	WT	S	1	Ульяновская область, 2010	
ST2	3.0.1	не-H58_G4	WT	S	2	С-Петербург, 2010 и 2011	Сев.Африка 50% (Марокко) Южная Азия 50% (Пакистан)
ST2	3.0.2	не-H58_S6	<i>gyrA</i> Ser83Phe	FQ-LLR	1	С-Петербург, 2012	Южная Азия 100% (Индия)
ST1	4.1.1	не-H58_S9	WT	S	1	Воронежская область, 2015	Южная Африка 78% (Малави) ЮАР 11% Зап. Африка 6% (Мавритания) Цен. Африка 6% (Камерун)

Продолжение таблицы 25

Генотип по методу:			Механизмы резистентности	Фенотип резистентности	Количество штаммов	Территории и годы выделения штаммов	Вероятное происхождение штамма <sup>1</sup> (microreact.org/project/styphi)
MLST	Wong et al.	Глобальная филогения (гаплотипы Roumagnac)					
ST1	4.3.1.1. (n=63)	H58_G3	<i>gyrA</i> Asp87Asn	FQ-LLR	54	С-Петербург, 2006 (вспышка), 2007, 2010, 2011, 2012, 2014, 2017; Моск.область, 2011 и 2013 (вспышка); Калининград. область, 2011 и 2012; Хабаровский край, 2012; Воронежская область, 2014; Иркутская область, 2015	Юго-Восточная Азия 50% (Вьетнам, Лаос, Камбоджа)  Южная Азия 26% (Индия, Бангладеш, Пакистан, Непал, Шри Ланка, Афганистан)
		H58_G2	<i>gyrA</i> Asp87Asn <i>gyrA</i> Asp87Asn + pHCM1/ R27 (группа IncHI1)	FQ-LLR; FQ-LLR+MDR	5 2	С-Петербург, 2008; ХМАО <sup>6</sup> , 2009; ЕАО <sup>7</sup> , 2011; Иркутская область, 2017  С-Петербург 2013 и 2015	
		H58_S2	WT	S	1	Иркутская область, 2012	
		H58_S4	WT	S	1	С-Петербург, 2011	
ST1	4.3.1.2 (n=13)	H58_G1	<i>gyrA</i> (Ser83Phe+Asp87Asn) + <i>parC</i> Ser80Ple  <i>gyrA</i> (Ser83Phe+Asp87Asn) + <i>parC</i> Ser80Ple + pHCM1/ R27 (группа IncHI1)	FQ-HLR; FQ-HLR+MDR	9 1	Калининград. область, 2011 и 2012; Смоленская область, 2011; Кировская область, 2015; ХМАО, 2016; Воронежская область, 2017; Красноярский край, 2017; С-Петербург, 2018  Архангельская область, 2015	Вос. Африка 10% (Танзания, Кения)  Южная Африка 9% (Малави)
		H58_S1	<i>gyrA</i> Ser83Tyr + pHCM1/ R27 (группа IncHI1)	FQ-LLR+MDR	1	С-Петербург, 2006	
		H58_S5	<i>gyrA</i> Ser83Tyr	FQ-LLR	1	С-Петербург, 2011	

Примечание: WT – «дикий» тип, S – чувствительный; FQ-LLR – устойчивость к фторхинолонам низкого уровня (fluoroquinolone low-level-resistance), MDR-множественная устойчивость к АМП (multidrug resistance), FQ-HLR - устойчивость к фторхинолонам высокого уровня (fluoroquinolone high-level-resistance), ХМАО – Ханты-Мансийский автономный округ, ЕАО – Еврейская автономная область

<sup>1</sup>указан вероятный регион и страна происхождения штаммов и доля штаммов глобальной популяции, относящихся к данному региону [342]

По данным глобальной филогении сюда относились штаммы гаплотипа H58 филогенетических групп G3 (наиболее многочисленная), G2 и два штамма с индивидуальными генотипами.

Линия 4.3.1.2 (13 штаммов, 14,1%) включала штаммы с устойчивостью низкого уровня, обусловленной нетипичной однонуклеотидной заменой *gyrA* Ser83Tyr (индивидуальные генотипы согласно глобальной филогении), и штаммами с устойчивостью высокого уровня, обусловленной тремя однонуклеотидными заменами *gyrA* (Ser83Phe, Asp87Asn) и *parC* Ser80Ile (штаммы H58 группы G1 глобальной филогении). Согласно Wong et al. [333] штаммы-представители субклады 4.3.1. в основном происходят из стран Юго-Восточной и Южной Азии, но в настоящее время выделяются на всех континентах.

Кроме того, внутри кластера 4 один штамм *S. Typhi*, чувствительный к антибиотикам, выделенный в Воронежской области в 2015 г., относился к субкладе 4.1.1 (гаплотип «не-H58»). По данным Wong et al. все изученные штаммы *S. Typhi* этой субклады имели африканское происхождение.

К кластеру 1, субкладе 1.2.1, относились 8 чувствительных к антибиотикам штаммов *S. Typhi*, которые принадлежали к одной филогенетической группе «не-H58» группы G6 глобальной филогении и имели эпидемиологическую связь с Кыргызстаном и Казахстаном. По данным Wong et al. все изученные штаммы *S. Typhi* субклады 1.2.1 происходят из стран Юго-Восточной Азии [333].

Кластеры 2 и 3 и соответствующие им субклады были представлены в нашем исследовании единичными штаммами *S. Typhi*, чувствительными к антибиотикам или с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам, обусловленной мутацией в гене *gyrA* Ser83Phe, не выявленной как единственная нуклеотидная замена у штаммов других кластеров. Эти кластеры включали штаммы, не относящиеся к гаплотипу H58 филогенетических групп G4 и G5, а также с индивидуальными генотипами глобальной филогении.

Таким образом, филогенетические исследования российских штаммов *S. Typhi*, при сравнении с глобальной коллекцией штаммов возбудителя брюшного тифа (около 2000 штаммов, выделенных на протяжении длительного времени в 63

странах мира), обнаружили выраженное генетическое разнообразие штаммов, вызывавших заболевания брюшным тифом в РФ в 2005-2018 гг. «Российская» популяция возбудителя брюшного тифа была представлена штаммами, относящимися ко всем четырем глобальным первичным генетическим кластерам, описанным в мире. В тоже время, более 80,0% изученных штаммов относились к одному кластеру, кладе и субкладе 4.3.1 (гаплотипу H58 согласно Roumagnac et al.), международному клону высокого риска - «азиатскому» клону, и с большой вероятностью происходили из стран Юго-Восточной и Южной Азии. Штаммы этой субклады вызывали заболевания брюшным тифом в разные годы на всех территориях РФ.

Внутри субклады 4.3.1 российские штаммы дополнительно кластеризовались в две филогенетические линии. Наиболее многочисленная линия 4.3.1.1 (63 штамма) была практически полностью представлена штаммами с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам, обусловленной мутацией *gyrA* Asp87Asn, вторая линия 4.3.1.2 (13 штаммов) – штаммами с устойчивостью низкого уровня, обусловленной мутацией *gyrA* Ser83Tyr, и штаммами с устойчивостью высокого уровня, обусловленной тремя мутациями *gyrA* (Ser83Phe+Asp87Asn) и *parC* Ser80Phe. Штаммы с MDR-фенотипом, содержащие плазмиды рHMC1 группы несовместимости IncHI1 (штаммы с «классическим» MDR-фенотипом) и группы IncN (с «не-классическим» MDR-фенотипом), также принадлежали субкладе 4.3.1 – как линии 4.3.1.1 (2 штамма), так и 4.3.1.2 (два штамма).

Наши данные коррелируют с зарубежными и свидетельствуют, что в РФ, как и в других странах мира, среди штаммов *S. Typhi* гаплотипа H58 (субклады 4.3.1) из-за потери плазмиды произошла смена фенотипа резистентности: большинство штаммов устойчивы только к фторхинолонам, причем в отличие от мировых данных эта устойчивость обусловлена преимущественно мутацией *gyrA* Asp87Asn (61 штамм из 76 субклады 4.3.1).

Следует отметить, что в РФ относительно широко был представлен генетический кластер 1, субклада 1.2.1 (8 штаммов, чувствительных к АМП), который эпидемиологически был связан с завозом из Казахстана и Кыргызстана.

Другие генетические кластеры были представлены единичными штаммами, значительно отличающимися по фенотипам и механизму резистентности от основной филогенетической линии субклады 4.3.1.

Результаты исследования легли в основу создания российской базы данных биологических свойств, включая чувствительность к антибиотикам и генетическую характеристику, штаммов возбудителя брюшного тифа, зарегистрированного в Российской Федерации. База данных «*S. Typhi* – Museum: биологические свойства возбудителя брюшного тифа» зарегистрирована в государственном Реестре баз данных под № 2019621507 (Приложение 3).

### **8.3 Филогенетический анализ методом PFGE**

Методом макрорестрикционного анализа с разделением продуктов рестрикции в пульсирующем электрическом поле оценили генетическую близость 107 штаммов *S. Typhi*. Учитывая тот факт, что в РФ в настоящее время брюшной тиф является «завозной» инфекцией и большинство случаев возникают в результате «завоза» трудовыми мигрантами из стран Средней Азии (бывшего СССР), в исследование целенаправленно включили 20 штаммов, для которых был установлен факт «завоза» из Кыргызстана. Генетическое разнообразие штаммов оценивали согласно стандартному протоколу PulseNet (рестриктаза *XbaI*), который используют для генотипирования в рамках международного надзора за возбудителями заболеваний, передающихся с пищевыми продуктами [297]. При анализе полученной дендрограммы к одному генетическому кластеру относили близкородственные PFGE-профили с коэффициентом подобия выше 75 (Рисунок 33). Некоторым штаммам, относящимся к различным кластерам, была также дана филогенетическая характеристика методом SNP-типирования. Обобщенные результаты представлены в таблице 26.

Выявлено семь генетических кластеров, включающих от 2 до 61 штамма, обозначенных нами как А-Г. Кроме того, 4 штамма *S. Typhi* характеризовались индивидуальными профилями, коэффициент подобия с другими не превышал 60.

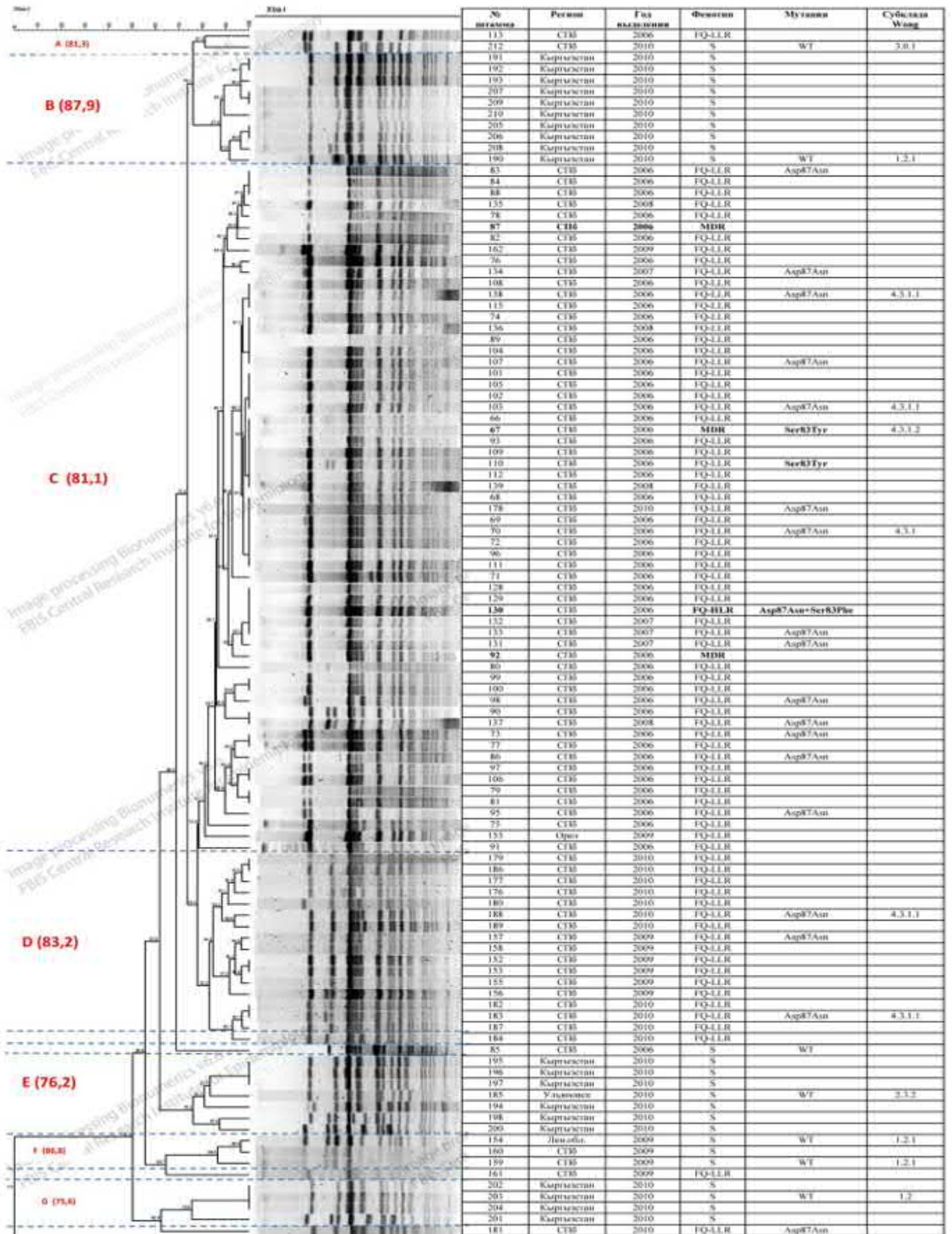


Рисунок 33 – Дендрогамма, построенная на основании сопоставления профилей XbaI-рестрикции штаммов S. Typhi (метод maximum likelihood) (n = 107)

Таблица 26 – Кластеризация штаммов *S. Typhi* по результатам сопоставления профилей *XbaI*-рестрикции (n = 107)

Генетический кластер (коэффициент подобия)	Количество штаммов	Территория	Годы выделения	Фенотип резистентности	Хромосомные мутации (аминокислотные замены)	Субклада Wong/гаплотип
A (81,3)	2	Санкт-Петербург	2006, 2010	FQ-LLR; S	но	3.0.1/ не-H58
B (87,9)	10	Кыргызстан	2010	S	WT	1.2.1/ не-H58
C (81,1)	61	Санкт-Петербург	2006-2010	FQ-LLR; FQ-HLR; MDR	<i>gyrA</i> Asp87Asn; <i>gyrA</i> Ser83Tyr; <i>gyrA</i> (Asp87Asn+Ser83Phe) + <i>parC</i> Ser80Ile	4.3.1/ H58
D (83,2)	16	Санкт-Петербург	2009-2010	FQ-LLR	<i>gyrA</i> Asp87Asn	4.3.1/ H58
E (76,2)	7	Ульяновск, Кыргызстан	2010	S	WT	2.3.2/ не-H58
F (86,8)	3	Санкт-Петербург Лен. область	2009	S	WT	1.2.1/ не-H58
G (75,6)	4	Кыргызстан	2010	S	WT	1.2.1/ не-H58
Индивидуальные PFGE-профили (менее 60)	4	Санкт-Петербург	2006, 2009, 2010	FQ-LLR, S	<i>gyrA</i> Asp87Asn; WT	но

Примечание: Asp – аспарагиновая кислота, Asn – аспарагин, Phe – фенилаланин, Ser – серин, Tyr – тирозин; S – чувствительный ко всем АМП;

FQ-LLR – резистентность к фторхинолонам низкого уровня (fluoroquinolone low-level resistance);

FQ-HLR – резистентность к фторхинолонам высокого уровня (fluoroquinolone high-level resistance);

MDR – множественная устойчивость к АМП (multidrug resistance); WT – «дикий» тип (wild type); но – не определяли

Наиболее крупный кластер С включал большую часть изученных штаммов *S. Typhi*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2006-2010 гг. (61 штамм) и преимущественно характеризовавшихся ведущим фенотипом и генотипом резистентности (устойчивость низкого уровня к фторхинолонам, обусловленная мутацией *gyrA Asp87Asn*). Кластер также включал единичные штаммы с устойчивостью высокого уровня к фторхинолонам и MDR-фенотипом. Следует отметить, что в этот кластер относились штаммы, выделенные в Санкт-Петербурге во время вспышки в закрытом военном учреждении в 2006 г. Проведенный в дальнейшем анализ данных полногеномного секвенирования методом SNP-типирования четырех штаммов, относящихся к этому кластеру, показал, что они относились к субкладе 4.3.1 (гаплотипу H58).

Второй по величине кластер D включал 16 штаммов, выделенных в Санкт-Петербурге в 2009-2010 гг., характеризующихся ведущим фенотипом и генотипом резистентности: устойчивость низкого уровня к фторхинолонам, обусловленная мутацией *gyrA Asp87Asn*. Дальнейшее SNP-типирование двух штаммов этого кластера показало, что они также относятся к субкладе 4.3.1 (гаплотипу H58).

К кластеру F относились три эпидемиологически связанных штамма, чувствительных к АМП, выделенные в 2009 г. в Санкт-Петербурге и Ленинградской области от заболевших из одного очага группой заболеваемости. Дальнейшее SNP-типирование показало, что штаммы не относились к гаплотипу H58, принадлежали субкладе 1.2.1.

Два штамма с различными фенотипами резистентности, выделенные в 2006 и 2010 г. в Санкт-Петербурге, относились к кластеру А. Чувствительный штамм по результатам SNP-типирования принадлежал к субкладе 3.0.1.

Интересно отметить, что штаммы *S. Typhi*, выделенные в 2010 г. от жителей Кыргызстана, чувствительные ко всем АМП, разделились на три генетически неродственных кластера (B, E и G), которые не включали российские штаммы, за исключением одного штамма, выделенного в Ульяновске, который попал в кластер E с коэффициентом подобия с ближайшими PFGE-профилями 83,3. SNP-типирование штаммов этого кластера показало, что они не относились к



доминирующей в мире субкладе 4.3.1 (гаплотипу H58): штаммы кластера В и G принадлежали к субкладе 1.2.1, а кластера Е – к субкладе 2.3.2. В целом, штаммы *S. Typhi*, выделенные от жителей Кыргызстана, значительно отличались от других штаммов, выделенных в РФ.

Таким образом, популяция возбудителя брюшного тифа, выделенного в 2006-2010 гг. на различных территориях РФ, характеризовалась значительным генетическим разнообразием. В тоже время, установлено преобладание одного генетического кластера, к которому относилось большинство штаммов с идентичным фенотипом и генотипом резистентности, включая штаммы, выделенные в Санкт-Петербурге во время вспышки в 2006 г.

Следует отметить, что в целом результаты оценки генетической близости штаммов возбудителя брюшного тифа методом PFGE соответствовали филогенетической характеристике, полученной методом SNP-типирования. К одному PFGE-кластеру относились штаммы одной субклады. В тоже время штаммы доминирующей субклады 4.3.1 разделились на два PFGE-кластера С и D, коэффициент подобия которых составил 78. Субклада 1.2.1 включала штаммы неродственных PFGE-кластеров (В, F и G) с коэффициентом подобия менее 60. Наше исследование подтвердило генетическое разнообразие штаммов возбудителя брюшного тифа, выделенного на территориях РФ, а также превалирование штаммов, относящихся к двум PFGE-кластерам. В тоже время очевидно, что метод PFGE имеет ограниченные возможности для субтипирования *S. Typhi*, генетически отдаленные штаммы которых могут иметь идентичные PFGE-профили.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Бактерии *Salmonella enterica* spp. *enterica* лидируют в перечне бактериальных возбудителей ОКИ, в РФ сальмонеллезы занимают третье место (после рота- и норовирусной инфекций) в структуре очагов групповой заболеваемости с фекально-оральным механизмом передачи. Устойчивость штаммов *Salmonella* к антибиотикам ограничивает возможности эффективной терапии сальмонеллезов, что особенно актуально для брюшного тифа, поскольку антибиотикотерапия является необходимым компонентом схемы лечения этого заболевания. Международная торговля сельскохозяйственными животными и продуктами питания способствуют глобальной экспансии устойчивых штаммов и возникновению эпидемиологически связанных заболеваний в различных регионах мира. Данные национальных систем надзора за сальмонеллезами стран ЕС, США и Канады свидетельствуют о росте показателей устойчивости к АМП у штаммов, выделенных от людей, животных и пищевых продуктов. В РФ объективная оценка динамики устойчивости штаммов *Salmonella* осложняется многочисленными изменениями нормативно-методических документов, касающихся определения чувствительности микроорганизмов к АМП, произошедшими в последние годы. Молекулярно-генетическим исследованиям механизмов резистентности в РФ посвящены единичные исследования, касающиеся штаммов серовара S. Typhimurium [26, 27, 151, 218], отсутствуют данные о циркуляции в нашей стране штаммов *Salmonella* международных резистентных клонов высокого риска.

Учитывая вышесказанное, цель исследования заключалась в том, чтобы, используя стандартизованные международные подходы, охарактеризовать чувствительность и молекулярные механизмы устойчивости к АМП штаммов *Salmonella*, включая возбудителя брюшного тифа, в Российской Федерации с учетом тенденций распространения резистентности в глобальной популяции бактерий рода *Salmonella*.

Полученные в ходе исследования данные отражают ситуацию, сложившуюся в последние десятилетия в РФ: несмотря на то, что популяция штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг., была представлена 41 сероваром, около 90,0% штаммов относились к трем сероварам: *S. Enteritidis* (79,6%), *S. Typhimurium* (6,8%) и *S. Infantis* (3,8%). Ситуация в нашей стране отличается от стран ЕС и США, где несмотря на то, что серовар *S. Enteritidis* занимает первое место в этиологической структуре сальмонеллезов, его доля не превышает 50,0% и с достаточно высокой частотой выделяют штаммы других сероваров, редко встречающиеся в РФ (*S. Newport*, *S. Heidelberg*, *S. Javiana*). В Санкт-Петербурге не выявлен широко распространенный в других странах «монофазный» вариант *S. Typhimurium* с антигенной формулой 1,4,[5],12:i:-, окончательная серологическая идентификация которого требует проведения молекулярных исследований [155]. Все штаммы *S. Typhimurium*, выделенные в рамках нашего исследования, принадлежали к классическому серовару.

В популяции штаммов *Salmonella* в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг., устойчивость к 1 и более классам АМП выявлена у 65,5% штаммов, причем наиболее высокий показатель отмечен именно у штаммов трех часто выделяемых сероваров (от 60,8 до 89,3%, соответственно). Обращает на себя внимание высокая частота резистентности к хинолонам (ципрофлоксацину), препаратам выбора при лечении генерализованных, осложненных и тяжелых форм сальмонеллезной инфекции у взрослых: 60,9% исследованных штаммов. Частота выявления штаммов, устойчивых к ЦРС (препаратам, используемым для лечения тяжелых и осложненных форм сальмонеллезов у детей и лиц с тяжелыми сопутствующими заболеваниями), была невысока, выявлена у 12 штаммов (1,6%), самый высокий показатель отмечен у штаммов серовара *S. Typhimurium* (7,8%). Устойчивость к «старым» АМП, которые рассматривают в настоящее время только как альтернативные препараты (аминогликозиды, хлорамфеникол, тетрациклин, триметоприм/сульфаметоксазол, ампициллин), отмечена у штаммов *Salmonella* значительно реже, чем к хинолонам, активно используемым в последние годы для этиотропного лечения ОКИ. Вероятно, смена тактики антимикробной терапии и снижение селективного давления «старых»

антибиотиков в последние десятилетия привели к смене профилей резистентности ведущих возбудителей сальмонеллезов. В тоже время, у штаммов *S. Infantis* (серовара, наиболее часто выделяемого от сельскохозяйственных животных и из пищевых продуктов) устойчивость к тетрациклину и триметоприм/сульфаметоксазолу выявлена у 60-80,0% штаммов, что может быть связано с использованием этих препаратов в животноводстве.

Наше исследование подтвердило высокую активность азитромицина (препарата из группы макролидов, относительно недавно рекомендованного для лечения сальмонеллезной инфекции) в отношении штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге: МПК<sub>90</sub> составила 8,0 мг/л, доля штаммов с МПК выше 16,0 мг/л, которые согласно критериям EUCAST относятся к «не-дикому» типу и расцениваются как резистентные, не превышала 2,0%. Наши результаты коррелируют с данными EUCAST и некоторых российских исследований, показавших что для 98,0% штаммов *Salmonella* МПК азитромицина находились в пределах 2,0-8,0 мг/л. [12, <https://mic.eucast.org/Eucast2/regShow.jsp?Id=35158>]. По официальным данным в странах ЕС и США устойчивость к азитромицину отмечена у 2,5 и 1,0%, соответственно [120, 312]. Следует отметить наличие штаммов, для которых МПК имело пограничное значение, равное ECOFF (16,0 мг/л), то есть эти штаммы требовали особенного внимания при интерпретации результатов и тестирования альтернативными методами.

В РФ для лечения ОКИ, в том числе сальмонеллезной этиологии, широко используют препарат из класса нитрофуранов – нифуроксазид (эрсефурил, энтерофурил). В тоже время лабораторная оценка чувствительности энтеробактерий к этой группе препаратов возможна только в отношении *E. coli*, причем клинические критерии интерпретации для ДДМ и методов МПК разработаны только для нитрофурантоина и штаммов, выделенных при инфекциях мочевых путей, с учетом возможности достижения высоких концентраций препарата в моче ([http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Rationale\\_documents/Nitrofurantoin\\_rationale\\_1.0.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Rationale_documents/Nitrofurantoin_rationale_1.0.pdf)). В научной литературе представлены результаты исследований, в которых авторы выявили

высокую долю штаммов *Salmonella* с низкой чувствительностью к нитрофуранам: от 65,0 до 94,2% штаммов имели МПК 64,0 мг/л и выше [88, 112]. По нашим данным нечувствительностью к нитрофуранам характеризовались около 40,0% штаммов *Salmonella*, что не позволяет рассматривать нитрофураны как препараты выбора для эмпирической терапии сальмонеллезного гастроэнтерита. Наши данные согласуются с зарубежными в том, что ДДМ позволяет достоверно выявлять только штаммы *Salmonella* высокочувствительные (МПК 8,0-16,0 мг/л) или высокоустойчивые (МПК 128,0 мг и выше) к нитрофуранам, при этом велика вероятность ошибочной категоризации штаммов с МПК 32,0-64,0 мг/л. [140]. В целом, учитывая указанные методические сложности ДДМ, отсутствие адекватных критериев для клинической категоризации штаммов, выделенных при инфекциях другой локализации (не ИМП) и высокую долю штаммов *Salmonella* с низкой чувствительностью к нитрофуранам *in vitro*, представляется целесообразным для прогнозирования эффективности этой группы препаратов при лечении сальмонеллезного гастроэнтерита тестировать штаммы возбудителя методами определения МПК и ориентировочно оценивать как чувствительные штаммы с МПК не выше 32,0 мг/л.

Учитывая неуклонный рост устойчивости *Salmonella* к АМП, используемым в настоящее время для лечения сальмонеллезов, представлялось интересным оценить уровень устойчивости к препаратам резерва – колистину и тигециклину, которые в ряде случаев остаются единственными активными АМП в отношении штаммов с множественной устойчивостью. Кроме того, колистин широко используют в ветеринарии, что также может повлиять на показатели устойчивости у штаммов, выделенных от людей. Из-за особенностей диффузии в агар, взаимодействия с катионами питательной среды, возможной адсорбции на поверхности лабораторного пластика, тестирование этих двух препаратов в рутинной практике осложняется необходимостью использования только метода разведений в бульоне. В научной литературе высказаны предположения о природной сниженной чувствительности к колистину штаммов *Salmonella* группы D сероваров *S. Dublin* и *S. Enteritidis*, которая может быть связана с особенностями строения липополисахарида (ЛПС)

клеточной стенки у штаммов серогруппы O9 [75, 312]. 73,0% штаммов этих сероваров в базе данных EUCAST относятся к категории «резистентный» и имеют МПК 4,0-16,0 мг/л ([https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch &BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=834&Specium=-1](https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=834&Specium=-1)). Официальные отчеты ECDC и EFSA сообщают о 5,0% штаммов, устойчивых к колистину, причем большинство таких штаммов также относятся к сероварам *S. Dublin* и *S. Enteritidis* [312]. Среди штаммов, выделенных в Санкт-Петербурге, выявлено 40,7% резистентных с МПК колистина 4,0-16,0 мг/л, которые в основном были представлены штаммами группы D (*S. Enteritidis*). Учитывая тот факт, что у *Salmonella* описаны плазмидные механизмы устойчивости (гены семейства *mcr*), обуславливающие модификацию липида А ЛПС, необходимо дальнейшее изучение механизмов резистентности к колистину у таких штаммов [231, 280].

В литературе описаны случаи клинической эффективности тигециклина при лечении инвазивных сальмонеллезов, на экспериментальной модели показана эффективность этого препарата, сопоставимая с цефтриаксоном [304, 305]. Следует отметить, что «дикая» популяция *Salmonella* (ECOFF  $\leq 1,0$  мг/л) характеризуется сниженной природной чувствительностью к этому препарату и включает клинически резистентные к тигециклину штаммы ( $R > 0,5$  мг/л) ([http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Rationale\\_documents/Tigecyclinerationale1.0.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Rationale_documents/Tigecyclinerationale1.0.pdf)). По данным литературы МПК тигециклина при изучении штаммов *Salmonella* колебалась от 0,25 до 4,0 мг/л [113, 233, 304]. Популяция *Salmonella* в Санкт-Петербурге была представлена штаммами как «дикого», так и «не-дикого» типа (МПК от 0,12 до 2,0 мг/л), 25,4% штаммов относились к категории «R». Этот факт требует дальнейшего изучения, так как устойчивость к тигециклину у штаммов *Salmonella* может быть обусловлена гиперэкспрессией хромосомных эффлюксных насосов AcrAB-TolC и OqxAB [126]. Таким образом, несмотря на то, что колистин и тигециклин относятся к препаратам резерва и не используются для лечения сальмонеллезов, в популяции возбудителя устойчивы к этим АМП более 40,0 и 25,0% штаммов соответственно.

Наши исследования подтвердили биологическую вариабельность «дикой» популяции *Salmonella* в отношении уровня природной чувствительности к некоторым АМП (цефотаксиму, триметоприм/сульфаметоксазолу, хлорамфениколу). Широкое распределение значений МПК этих препаратов коррелировало с данными EUCAST для европейских штаммов. Установлено, что уровень природной чувствительности *Salmonella* к этим препаратам несколько ниже, чем у других энтеробактерий: значительная часть штаммов «дикого» типа имела МПК равное или близкое ЕСOFF.

В популяции исследованных штаммов выявлены серовароспецифические отличия в чувствительности/резистентности к АМП. Для штаммов серовара *S. Enteritidis*, доминирующего в этиологической структуре сальмонеллезов как в Санкт-Петербурге, так и в РФ, характерна устойчивость к фторхинолонам (68,7% штаммов); выявлен ведущий фенотип резистентности – около 90,0% устойчивых штаммов *S. Enteritidis* характеризовались устойчивостью к 1 классу АМП, практически все – к хинолонам, доля MDR-штаммов не превышала 7,0%. У штаммов второго по частоте выделения серовара *S. Typhimurium* отмечена максимальная среди сероваров частота выделения штаммов, устойчивых к бета-лактамам АМП: ампициллину (43,1% штаммов) и ЦПС (7,8%). Доля MDR-штаммов в 3 раза превышала этот показатель у штаммов *S. Enteritidis* и составила 21,6%, причем MDR-штаммы составляли около трети в структуре резистентной популяции. Несмотря на невысокую частоту выделения штаммов *S. Infantis*, этот серовар отличался максимальными показателями устойчивости к хинолонам (89,3%), тетрациклинам (82,1%), триметоприм/сульфаметоксазолу (64,3%) и множественной устойчивости (67,9%). В отличие от других сероваров резистентная популяция почти на 80,0% была представлена MDR-штаммами.

Анализ профилей множественной устойчивости к АМП показал, что более половины MDR-штаммов *S. Enteritidis* (60,0%) и *S. Infantis* (84,2%) имели идентичные профили резистентности, которые включали у *S. Enteritidis* хинолоны, хлорамфеникол и тетрациклин, у *S. Infantis* – хинолоны, триметоприм/сульфаметоксазол и

тетрациклин. Этот факт может быть обусловлен клональной экспансией в Санкт-Петербурге резистентных генетических линий этих сероваров.

В 2002-2005 гг. в рамках совместной научно-практической работы Северо-Западного регионального центра по сальмонеллезам, функционировавшего на базе ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, и клинической инфекционной больницы № 30 имени С.П. Боткина (г. Санкт-Петербург) были изучены более 500 штамма *Salmonella* spp., выделенных от пациентов, госпитализированных с гастроэнтероколитами. Сравнение данных, полученных в 2002-2005 гг. и 2014-2019 гг., выявило рост показателей резистентности в последние годы. Общий 4-х кратный рост доли устойчивых штаммов с 16,7% (95% ДИ 13,9-20,0) до 65,5% (95% ДИ 62,1-68,9) сопровождался ростом устойчивости к хинолонам в 10 раз с 5,9% (95% ДИ 4,2-8,1) до 60,9% (95% ДИ 57,3-64,3) и триметоприм/сульфаметоксазолу в 6 раз с 1,1% (95% ДИ 0,5-2,3) до 6,0% (95% ДИ 4,5-8,0). В период 2002-2005 гг. в Санкт-Петербурге обнаружены только два штамма устойчивых к ЦРС, которые не относились к доминирующему серовару *S. Enteritidis*, в то время как в 2014-2019 гг. выделено 12 устойчивых штаммов, причем семь относились к *S. Enteritidis*. Показатели устойчивости к «старым» АМП, которые рекомендованы как альтернативные для лечения ОКИ (аминопенициллины, тетрациклин, хлорамфеникол, аминогликозиды), остались на низком уровне. В 2002-2005 гг. не было выявлено достоверных различий в показателях устойчивости к большинству АМП у штаммов *Salmonella* различных сероваров, в то время как в 2014-2019 гг. в популяции возбудителя сформировались выраженные серовароспецифические особенности.

При сравнении полученных нами данных с зарубежными обращает на себя внимание тот факт, что в Санкт-Петербурге доля штаммов *Salmonella*, устойчивых к хинолонам, значительно выше: почти в 5 раз, чем в странах ЕС и Канаде (60,9% исследованных штаммов по сравнению с 13,0 и 11,7%, соответственно) и в 10 раз, чем в США (6,6%) [111, 119, 120, 312]. Устойчивость к ЦРС у российских штаммов ниже показателей других стран (1,6% по сравнению с 1,9% в странах ЕС, 3,4% в США и 7,8% в Канаде), что может быть связано с редким выделением в РФ штаммов



сероваров, для которых наиболее характерна такая резистентность (*S. Kentucky*, *S. Dublin*, *S. Newport*, *S. Heidelberg*, *S. Saintpaul*). В тоже время, в Санкт-Петербурге в сероварах *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* доля штаммов, устойчивых к ЦРС, выше (1,2 и 7,8%, соответственно), чем в странах ЕС (0,3 и 2,6%), США (0,5 и 5,5%) и Канаде (0,4 и 2,0%). Это может быть обусловлено различиями в подходах к лечению и профилактике инфекций у сельскохозяйственных животных и птицы: в указанных странах использование антибиотиков для стимуляции роста и профилактики инфекций жестко регламентировано. Более высокая доля MDR-штаммов в странах ЕС (28,6%), чем в Санкт-Петербурге (10,1%), вероятно связана с широкой циркуляцией в европейских странах резистентных клонов *S. Kentucky*, *S. Dublin* и монофазного варианта *S. Typhimurium*, которые редко выделяют в РФ. В Санкт-Петербурге высокая частота выявления MDR-штаммов характерна для серовара *S. Infantis* (67,9% по сравнению с 39,4% в странах ЕС и 15,3% в США), у штаммов *S. Enteritidis* также превышала зарубежные показатели (6,7% по сравнению с 1,6% в странах ЕС, 4,2% в США и 0,4% в Канаде).

Для лечения тяжелых, осложненных и генерализованных форм сальмонеллезов рекомендованы бета-лактамы АМП (цефтриаксон, цефотаксим, цефиксим, амоксициллин), поскольку широкий спектр активности, высокая клиническая эффективность и низкая токсичность препаратов этой группы позволяют использовать их у детей, беременных женщин, а также у пациентов с тяжелыми сопутствующими заболеваниями [46-50, 65]. Ведущим механизмом резистентности энтеробактерий к бета-лактамам является продукция бета-лактамаз, специфичность которых обуславливает фенотип резистентности штамма к определенным препаратам этой группы. В нашем исследовании устойчивые к аминопенициллинам штаммы составили 5,5% исследованной популяции штаммов, что значительно ниже аналогичных показателей в странах ЕС (около 30,0%) и США (12,0%) [119, 313, 314]. В Санкт-Петербурге устойчивость к аминопенициллинам была наиболее характерна для штаммов серовара *S. Typhimurium*, у которых превышала средний показатель в 8 раз (43,1%). Устойчивость у 92,7% штаммов была обусловлена продукцией бета-

лактамазы широкого спектра TEM-1, что коррелирует с зарубежными данными, свидетельствующими, что этот вид бета-лактамазы обнаруживают у подавляющего большинства штаммов *Salmonella* с устойчивостью к аминопеницилинам [119, 172, 177]. Резистентность к ЦРС, выявленная у 1,6% штаммов, была обусловлена продукцией бета-лактамаз расширенного спектра двух классов: «классических» БЛРС молекулярного класса А (у подавляющего большинства штаммов, 16 из 18 изученных) и цефалоспориноаз молекулярного класса С CMY-2 (у двух штаммов). БЛРС были представлены только генетическим семейством CTX-M: более чем у половины штаммов (55,6%) – генетической группы CTX-M1, а также CTX-M2 (11,1%), CTX-M9 (16,7%) и сочетанной продукцией CTX-M1 и CTX-M2 (5,6%). Наши данные коррелируют с зарубежными, свидетельствующими о широкой распространенности БЛРС генетической группы CTX-M1 как у штаммов *Salmonella*, так и других энтеробактерий, вызывающих нозокомиальные и внебольничные инфекции различной локализации [103].

В ходе исследования выявлено два штамма (*S. Newport* и *S. Enteritidis*), продуцирующие AmpC-цефалоспориноазу CMY-2. Следует отметить, что нами впервые в РФ был обнаружен штамм *S. Newport*, который относился к международному клону высокого риска *S. Newport* MDR-AmpC/CMY-2, характеризующемуся множественной резистентностью к АМП и продукцией цефалоспориноазы CMY-2. Впервые такие штаммы были выявлены в США в 1998 г., быстро распространились у людей и крупного рогатого скота (КРС) и в 2000-х гг. составляли до 85,0% всех устойчивых к ЦРС штаммов *Salmonella*. Селекции таких штаммов способствовало разрешение на использование в США цефалоспориноаза цефтиофура для КРС [146, 182, 279, 346]. Ведущими факторами передачи таких штаммов людям являются молочная продукция и говядина [182, 321]. В странах ЕС штаммы *S. Newport* MDR-AmpC/CMY-2 выделяют редко, тем не менее во Франции в 2003 г. была зарегистрирована вспышка сальмонеллеза, связанная с употреблением конины, импортированной из США [98, 156, 254]. По данным референс-центра по мониторингу за сальмонеллезами (ЦНИИ

эпидемиологии Роспотребнадзора) в РФ серовар *S. Newport* в течение последних 10 лет занимает 5 место в «рейтинге» выделяемых сероваров *Salmonella* (0,5-0,9%), ежегодно от людей в РФ выделяют от 100 до 200 штаммов этого серовара [16, 17]. Данных о выделении в нашей стране штаммов международного клона *S. Newport* MDR-AmpC/CMY-2 в литературе нет. Выделенный в ходе нашего исследования штамм *S. Newport* по MDR-фенотипу, продуцируемой цефалоспоринолазе CMY-2 и профилю рестрикции плазмиды резистентности соответствовал клону *S. Newport* MDR-AmpC/CMY-2, что позволило предположить факт завоза штамма этого международного клона высокого риска на территорию РФ из стран ЕС или США с импортными пищевыми продуктами.

Обращает на себя внимание тот факт, что практически все штаммы *Salmonella*, продуцирующие БЛРС, имели сочетанную резистентность к другим классам АМП (от 1 до 7 классов), в том числе рекомендованным для лечения ОКИ: хинолонам, нитрофуранам, азитромицину, триметоприм/сульфаметоксазолу. Два штамма *S. Typhimurium*, продуцирующие СТХ-M2, были устойчивы к семи тестируемым группам не-лактамных АМП. Наибольшей активностью в отношении штаммов-продуцентов БЛРС обладали из бета-лактамных препаратов – цефтазидим/авибактам и карбапенемы, из не-лактамных препаратов – колистин и тигециклин, к которым все штаммы сохраняли чувствительность.

Вопросы интерпретации результатов определения чувствительности штаммов энтеробактерий к ЦРС и карбапенемам долгое время остаются предметом дискуссий. Согласно рекомендациям EUCAST и CLSI, используемые в настоящее время методы тестирования и предложенные пограничные значения позволяют выявить устойчивость к бета-лактамам у большинства штаммов энтеробактерий, продуцирующих различные бета-лактамазы, поэтому дополнительное подтверждение продукции и дифференцировка БЛРС или карбапенемазы не является обязательным. В тоже время, часть штаммов с низким уровнем продукции бета-лактамаз могут попадать в категорию «чувствительный» при стандартной (S) или повышенной (I) экспозиции. Тем самым предполагается, что продукция бета-лактамазы не влияет на исход лечения, если штамм

экспрессирует ее на низком уровне (или наши методы недостаточно точны и достоверны для ее выявления). Из экспертных правил EUCAST исключены ранее существовавшие рекомендации о том, что штаммы с подтвержденной продукцией БЛРС (или карбапенемаз) следует расценивать как устойчивые ко всем цефалоспорином и азтреонаму (или карбапенемам) вне зависимости от результатов тестирования. В тоже время, степень доказательства эффективности бета-лактамов в отношении штаммов с низким уровнем продукции бета-лактамаз недостаточна. Кроме того, следует учитывать вариабельность (техническую и биологическую) значений МПК или диаметров зон, полученных рутинными методами, которые могут колебаться в зависимости от используемых сред, дисков, методов и квалификации персонала. В отличие от EUCAST, российские КР рекомендуют информировать клинициста о возможной нечувствительности штамма-продуцента БЛРС (или карбапенемазы) к цефалоспорином и азтреонаму (или карбапенемам), даже если этот штамм формально попадает в категорию «S» [20]. Нам представляется целесообразным такой подход к интерпретации результатов тестирования штаммов *Salmonella*, особенно вызывающих генерализованные инфекции. Генерализованный характер и тяжесть заболевания брюшным тифом предъявляют повышенные требования к качеству проведения процедуры определения чувствительности штаммов *S. Typhi* к АМП и интерпретации результатов. По нашему мнению, все штаммы *S. Typhi* и других сероваров, выделенные при генерализованных инфекциях, с подтвержденной продукцией БЛРС или AmpC следует расценивать как устойчивые ко всем ЦРС вне зависимости от фенотипа чувствительности (даже если штамм формально относится к категории S или I). Учитывая появление и распространение в мире штаммов *Salmonella*, устойчивых к карбапенемам (включая штамм *S. Paratyphi B*), при тестировании следует в обязательном порядке проводить скрининг карбапенемаз, используя критерии EUCAST [309].

Предложенный нами модифицированный алгоритм фенотипической детекции «классических» БЛРС и AmpC у штаммов *Salmonella*, опирающийся на критерии EUCAST и включающий тестирование индикаторных препаратов

цефтазидима и цефотаксима, цефокситина как маркера AmpC-цефалоспоринов и постановки подтверждающих тестов (включая цефепим), позволил достоверно выявить механизмы резистентности, которые подтвердились при молекулярном исследовании. Практическая значимость дифференциации БЛРС важна для выбора тактики лечения, поскольку определяет возможность использования комбинированных ингибиторо-защищенных цефалоспоринов (в случае продукции классических БЛРС) и цефепима (в случае продукции AmpC), а также для проведения мероприятий инфекционного контроля. Учитывая, что критерии скрининга «подозрительных» штаммов практически совпадают с клиническими пограничными значениями, подтверждающие тесты на БЛРС (и по возможности, AmpC) следует проводить уже на этапе первичного скрининга, чтобы не пропустить штаммы с низким уровнем экспрессии бета-лактамаз.

Определение чувствительности штаммов *Salmonella* к хинолонам сопряжено с методическими особенностями, заключающимися в выборе метода тестирования, индикаторных препаратов и критериев интерпретации. При определении чувствительности штаммов порядка *Enterobacterales* к фторхинолонам различают устойчивость низкого уровня (МПК ципрофлоксацина 0,12-0,5 мг/л) и устойчивость высокого уровня (МПК 1,0 мг/л и выше). Клиническое значение устойчивости низкого уровня признано только для штаммов *Salmonella*, штаммы других бактерий порядка *Enterobacterales* с такими значениями МПК относят к категории S или I (чувствительный). Подходы к определению чувствительности *Salmonella* к хинолонам и критерии интерпретации в последние годы неоднократно менялись. До 2011 г. для скрининга штаммов с устойчивостью низкого уровня диско-диффузионным методом была рекомендована налидиксовая кислота с указанием расценивать устойчивые штаммы *Salmonella* как устойчивые ко всем хинолонам. Работами некоторых исследователей показано, что налидиксовая кислота в ряде случаев является даже более чувствительным маркером хромосомной резистентности, чем значение МПК ципрофлоксацина, поскольку штаммы с некоторыми мутациями (например, Asp87→Gly) могут формально сохранять чувствительность к

ципрофлоксацину (МПК 0,06 мг/л) [26]. Появление у *Salmonella* плазмидоопосредованных механизмов резистентности к фторхинолонам (при которых штаммы могут сохранять чувствительность к налидиксовой кислоте), привело к тому что с 2011 г. ДДМ с налидиксовой кислотой исключили из рекомендаций, и единственным критерием оценки чувствительности *Salmonella* к фторхинолонам осталась МПК ципрофлоксацина. В 2013 г. EUCAST официально ввел отдельные критерии для *Salmonella* при тестировании фторхинолонов, основанные на значении «эпидемиологической точки отсечения», ECOFF ( $S \leq 0,06$  мг/л;  $R > 0,06$  мг/л). К категории «чувствительный» стали относить только штаммы «дикого» типа, которые не имеют фенотипически выявляемых механизмов резистентности к хинолонам. С 2014 г. разрешен ДДМ для скрининга резистентности с использованием пефлоксацина, рекомендовано расценивать устойчивые к этому препарату штаммы (диаметр зоны ингибиции роста менее 24 мм) как устойчивые ко всем фторхинолонам.

В рекомендациях EUCAST и российских КР отмечено, что новые критерии интерпретации касаются штаммов *Salmonella*, выделенных при системных («инвазивных») инфекциях (брюшной тиф, паратифы, генерализованные и внекишечные формы сальмонеллезной инфекции). Для этой категории штаммов существует достаточная доказательная база клинической неэффективности использования фторхинолонов (категория доказательств А для *S. Typhi*, категория В – для штаммов других сероваров) [20, 158]. Отсутствуют ясные рекомендации в отношении штаммов *Salmonella*, выделенных при гастроэнтеритах. С одной стороны, в разделе экспертных правил КР (документ EUCAST) рекомендовано оценивать штаммы с МПК ципрофлоксацина  $> 0,06$  мг/л как устойчивые ко всем хинолонам без уточнения типа инфекции (системная или локализованная) [20, 158]. С другой стороны, согласно комментариям в таблицах EUCAST/КР, создается впечатление, что штаммы *Salmonella*, вызвавшие гастроэнтерит, следует оценивать по критериям, общим для *Enterobacterales* ( $S \leq 0,25$  мг/л,  $R > 0,5$  мг/л). В таком случае штаммы с устойчивостью низкого уровня (МПК ципрофлоксацина 0,12-0,25 мг/л) должны расцениваться как «S» (чувствительный при стандартном

режиме дозирования), штаммы с устойчивостью низкого уровня (МПК ципрофлоксацина 0,5 мг/л) – к категории «I» (чувствительный при увеличенной экспозиции) [128, 163]. Таким образом, выявление уровня устойчивости к фторхинолонам у штаммов *Salmonella* необходимо для оценки возможности использования фторхинолонов и для выбора режима дозирования.

В рутинной практике прогнозирование исхода антимикробной терапии основывается на результатах как правило однократного тестирования штамма. Однако, на процесс определения чувствительности микроорганизмов к АМП влияет множество факторов, что приводит к колебаниям полученных результатов. Техническая вариабельность обусловлена как методологическими различиями, возникающими при выполнении тестирования разными людьми (учет результатов, приготовление инокулюма, приготовление планшетов с микроразведениями, посев на чашки), так и различиями, возникающими при использовании питательных сред и антибиотиков разных производителей, при незначительных различиях условий инкубации (стабильности температуры и атмосферы инкубации в разных термостатах) [198, 199, 219, 242, 298, 318, 319]. Биологическая вариабельность микроорганизма (отмеченная даже внутри популяции «дикого» типа) может быть связана с «генетическим фоном» популяции, определяющим особенности природной чувствительности микроорганизма к антибиотику, или «метаболическими» изменениями биологических свойств (влияние атмосферы, температуры, сроков инкубации и самого антибиотика на ростовые характеристики отдельных штаммов) [199, 318]. При тестировании ДДМ некоторых комбинаций микроорганизм/антибиотик формируются зоны подавления роста с нечеткими размытыми границами, что значительно затрудняет учет результатов и категоризацию штамма. Такие особенности характерны для фторхинолонов, в частности ципрофлоксацина при тестировании *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Наибольшая вероятность ошибочной интерпретации возникает в том случае, если результат находится близко к клиническому пограничному значению или совпадает с EOFF, как это происходит у *Salmonella* и ципрофлоксацина. Стандартизация и автоматизация этапов исследования значительно снижает влияние

на результаты технических факторов, но не биологической вариабельности [197, 199, 322]. Очевидно, что значение МПК или диаметра зоны подавления роста, полученное при однократном тестировании штамма, соответствует истинному только с определенной долей вероятности. Кроме того, неясно, насколько результаты, полученные при стандартизованной методике тестирования *in vitro*, отражают реальную ситуацию *in vivo*, когда вариабельность популяции заведомо более выражена. Для популяции с высокой биологической вариабельностью значительно возрастает риск случайного отнесения штамма к категории чувствительности, как в ситуации с *Salmonella* и ципрофлоксацином. Учитывая вышесказанное, в 2019 г. EUCAST ввел понятие «зона технической неопределенности» (от англ. Area of Technical Uncertainty, ATU) в отношении некоторых комбинаций микроорганизм/антибиотик и предупреждает, что при попадании результата тестирования в эту зону существует высокая вероятность ошибочной категоризации штамма [90]. В этом случае рекомендовано повторное тестирование и использование альтернативных методов. Зона технической неопределенности введена для штаммов *Enterobacterales* и ципрофлоксацина и составляет 0,5 мг/л и 22-24 мм, в отношении штаммов *Salmonella* рекомендаций нет.

Проведенное нами сравнение результатов определения чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам различными методами показала, что ни один тест, используемый в одиночку (МПК ципрофлоксацина, ДДМ с пефлоксацином, ДДМ с налидиксовой кислотой), не позволяет достоверно выявить устойчивость низкого уровня к хинолонам у штаммов *Salmonella*. Несмотря на высокую конкордантность МПК ципрофлоксацина и скрининга ДДМ с пефлоксацином (совпадение категории чувствительности для 96,5% штаммов) и налидиксовой кислотой (совпадение для 98,1% штаммов), результаты, полученные для некоторых штаммов, противоречили друг другу, что создало вероятность ошибочной категоризации штамма при тестировании одним методом. Расходящиеся результаты были получены в 19 случаях сравнения, причем в трех случаях они были обусловлены объективными причинами: наличием у штаммов «парадоксального» фенотипа устойчивости, обусловленного плазмидным



механизмом (ген *qnrS*). Остальные расхождения были отмечены в том случае, если полученные значения являлись пограничными: МПК ципрофлоксацина 0,06 мг/л, диаметр зоны ингибиции роста пефлоксацина 24 мм. Повторное тестирование штаммов выявило колебания значений вокруг пограничного: МПК 0,06–0,12 мг/л, диаметр 23–25 мм. В связи с вышесказанным, представляется целесообразным ввести категорию «зона технической неопределенности» при тестировании штаммов *Salmonella*: к ней следует отнести значение МПК ципрофлоксацина 0,06 мг/л, а также диапазон диаметра зоны задержки роста для пефлоксацина 23–25 мм.

Очевидно, что при определении чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам необходим комплексный подход. Если значение МПК ципрофлоксацина попадает в «зону технической неопределенности», следует подтвердить результат альтернативным методом тестирования. При проведении скрининга устойчивых штаммов ДДМ целесообразно использовать два препарата из группы хинолонов: пефлоксацин и налидиксовую кислоту, которая является высокочувствительным индикатором ведущих хромосомных механизмов устойчивости. В случае получения результата для пефлоксацина, попадающего в «зону технической неопределенности», использование налидиксовой кислоты позволяет избежать ошибочной интерпретации, а также дифференцировать механизмы устойчивости. Предложенный нами алгоритм скрининга штаммов *Salmonella*, устойчивых к хинолонам, может быть использован в бактериологических лабораториях в условиях повседневного определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом, с дополнительным определением МПК ципрофлоксацина в сомнительных случаях.

Известно, что основным механизмом резистентности к хинолонам у энтеробактерий являются мутации (несинонимичные однонуклеотидные замены) в QRDR-регионе хромосомных генов, кодирующих субъединицы ферментов, участвующих в репликации ДНК: ДНК-гиразы (гены *gyrA* и *gyrB*) и топоизомеразы IV (гены *parC* и *parE*). Устойчивость низкого уровня (МПК ципрофлоксацина 0,12–0,5 мг/л) обусловлена, как правило, модификацией одного фермента – ДНК-гиразы

вследствие одной однонуклеотидной замены в хромосомном гене *gyrA* (редко – *gyrB*). Значительно реже описаны случаи устойчивости низкого уровня, вызванные модификацией топоизомеразы IV (вследствие нуклеотидных замен в генах *parC* или *parE*) или плазмидоопосредованными механизмами. Устойчивость высокого уровня (МПК ципрофлоксацина, как правило, выше 4,0 мг/л) возникает в результате модификации обоих ферментов вследствие многочисленных мутаций в перечисленных генах или приобретения штаммом одновременно как хромосомной мутации, так и плазмидоопосредованного гена. У штаммов *Salmonella* различных сероваров описаны однонуклеотидные замены в гене *gyrA* в кодонах 83 и 87, в результате которых возникают соответствующие единичные аминокислотные замены в субъединицах ДНК-гиразы [119, 127, 301]. Нуклеотидные замены в генах *gyrB*, *parC* и *parE*, а также мутации в других хромосомных генах, приводящие к снижению проницаемости внешней мембраны или активации эффлюксных систем, описаны значительно реже и не имеют самостоятельного значения [119, 127]. По литературным данным у 60-90,0% штаммов *Salmonella* (включая *S. Typhi*) с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам обнаруживают однонуклеотидную замену в гене *gyrA* Ser83Phe, реже Asp87Asn [124, 221, 241, 258, 295]. Также у многих штаммов описано сочетание двух однонуклеотидных замен в гене *gyrA*: Ser83Phe + Asp87Asn, при этом устойчивость к фторхинолонам оставалась на низком уровне (МПК ципрофлоксацина 0,38 мг/л) или повышалась до 4-8,0 мг/л [124, 173, 241]. Описаны штаммы (*S. Typhi*, *S. Kentucky*), у которых двойная мутация в гене *gyrA* сопровождалась дополнительной мутацией в гене *parC* Ser80Phe, при этом повышался уровень устойчивости до высокого уровня (МПК ципрофлоксацина 16,0-32,0 мг/л) [173, 186]. Мутации в гене *gyrB*, выявленные у штаммов *S. Typhi*, обуславливали устойчивость низкого уровня или не сопровождалась повышением МПК фторхинолонов. В ряде случаев оценить вклад мутаций в гене *gyrB* в развитие резистентности к хинолонам не представлялось возможным, поскольку они встречались в сочетании с мутациями в гене *gyrA* и МПК ципрофлоксацина таких штаммов оставалась на низком уровне [73, 183]. В последние годы в странах Азии выявлены штаммы *S. Typhi* с устойчивостью

высокого уровня к фторхинолонам (МПК ципрофлоксацина 12,0 мг/л), обусловленной многочисленными мутациями (от четырех до семи) как в одном, так и разных генах [142, 173].

Оценка чувствительности штаммов *Salmonella* в ходе нашего исследования с учетом методических особенностей и критериев интерпретации, приведенных в современных международных и отечественных рекомендациях, показала, что около 70,0% штаммов *Salmonella*, выделенных в РФ, устойчивы к хинолонам. Особенно выражены эти показатели у сероваров *S. Typhi* (89,6%), *S. Infantis* (89,3%) и *S. Enteritidis* (68,7%). Большинство резистентных штаммов (96,7%) характеризовались устойчивостью низкого уровня. Высоко устойчивые штаммы составили 2,3%, при этом были обнаружены преимущественно в популяции возбудителя брюшного тифа (7,3% штаммов *S. Typhi*). Среди *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров выявлено два таких штамма, принадлежащих к серовару *S. Kentucky*.

В нашем исследовании устойчивость к хинолонам практически у всех штаммов *Salmonella*, изученных молекулярными методами, была обусловлена хромосомными механизмами. Плазмидоопосредованные механизмы обнаружены только у трех штаммов (0,3%). Уровень устойчивости к фторхинолонам был обусловлен механизмами резистентности. Штаммы с устойчивостью низкого уровня имели единичные однонуклеотидные замены в *gyrA*, спектр и частота выявления которых различались у штаммов возбудителя брюшного тифа и «не-тифоидных» сероваров. У *S. Typhi* преобладала замена Asp87Asn (71,4% устойчивых штаммов), два других вида замен встречались значительно реже – Ser83Tyr (6,7%) и Ser83Phe (0,9%). У штаммов «не-тифоидных» сероваров выявлены мутации в гене *gyrA* как не встречавшиеся у возбудителя брюшного тифа – Asp87Tyr (33,3%) и Asp87Gly (7,7%), так и общие с *S. Typhi*: Ser83Phe (20,5%) и Asp87Asn (23,1%) и Ser83Tyr (10,3%). Следует отметить серовароспецифичность некоторых мутаций: замена Asp87Gly выявлена только у штаммов *S. Enteritidis*, Asp87Tyr – у штаммов *S. Infantis*. Напротив, замена Asp87Asn была широко представлена в различных сероварах (*S. Typhi*, *S. Enteritidis*, *S. Hadar*, *S. Newport*). Серовар *S. Enteritidis* характеризовался

наибольшим разнообразием мутаций: у штаммов этого серовара обнаружены 4 из 5 выявленных однонуклеотидных замен, наиболее характерна Ser83Phe (8 из 18 штаммов). У трех штаммов (*S. Typhi*, *S. Corvallis*, *S. Typhimurium*) устойчивость низкого уровня была обусловлена плазмидоопосредованным механизмом – продукцией белка QnrS (ген *qnrS*).

Устойчивость высокого уровня к фторхинолонам у всех изученных молекулярными методами штаммов (*S. Typhi* и *S. Kentucky*) была обусловлена модификацией обоих ферментов, участвующих в репликации ДНК, вследствие сочетанных хромосомных мутаций в генах *gyrA* и *parC*. Преимущественный профиль мутаций (у 23 из 24 устойчивых штаммов) включал три однонуклеотидные замены: две в гене *gyrA* (Ser83Phe +Asp87Asn) и одну в гене *parC* Ser80Ile, при этом МПК ципрофлоксацина превышала 8,0 мг/л. У одного штамма *S. Typhi*, выделенного в 2019 г. от студента-индийца, профиль мутаций отличался и включал две мутации – *gyrA* Ser83Phe и *parC* Glu84Gly, при этом МПК ципрофлоксацина была ниже, чем у других штаммов – 1,0 мг/л.

Штаммы *S. Kentucky* с высоким уровнем устойчивости к фторхинолонам (МПК ципрофлоксацина более 32,0 мг/л), выявленные в ходе нашего исследования, имели фенотип множественной резистентности и молекулярный механизм устойчивости к хинолонам (профиль множественных мутаций *gyrA* (Ser83Phe +Asp87Asn) и *parC* Ser80Ile), идентичный международному клону высокого риска *S. Kentucky* ST198, штаммы которого в настоящее время циркулируют в странах Европы, Азии и Африки [186, 236]. По данным референс-центра по мониторингу за сальмонеллезами (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) в РФ ежегодно выделяют единичные штаммы *S. Kentucky* (от 2 до 8 штаммов в последние 10 лет), данных о выделении штаммов клона ST 198 в РФ нет [16, 17].

При использовании предложенного нами комплексного подхода к определению чувствительности (ДДМ с пefлоксацином и налидиксовой кислотой + определение МПК ципрофлоксацина) фенотипическая характеристика устойчивых к хинолонам штаммов *Salmonella* полностью соответствовала

молекулярному механизму резистентности. Так, для штаммов с хромосомным механизмом (мутации в QRDR-регионе генов *gyrA* и *parC*) была характерна высокая устойчивость к налидиксовой кислоте и устойчивость к ципрофлоксацину, уровень которой зависел от количества однонуклеотидных замен в хромосомных генах: штаммы с единичной мутацией имели устойчивость низкого уровня к ципрофлоксацину, с множественными мутациями – высокого уровня. Штаммы, у которых были выявлены только плазмидоопосредованные механизмы устойчивости (белок QnrS) характеризовались «парадоксальным» фенотипом резистентности (чувствительность к налидиксовой кислоте и устойчивость низкого уровня к ципрофлоксацину) и также достоверно выявлялись при использовании алгоритма комплексного исследования. Использование дополнительного индикаторного хинолона – налидиксовой кислоты – позволило получить достоверный результат даже в случае сомнительных результатов тестирования препаратов, рекомендованных нормативными документами (пемфлоксацин и ципрофлоксацин). Таким образом, в настоящее время определить чувствительность штаммов *Salmonella* к хинолонам и получить достоверные результаты, пригодные как для прогнозирования эффективности лечения, так и для сравнения с международными данными, возможно только при условии использования комплексного подхода и интерпретации результатов согласно актуальных версий рекомендаций EUCAST и российских КР. При тестировании штаммов *Salmonella* согласно МУК 4.2.1890-04, используя методические подходы и критерии, общие для штаммов *Enterobacterales*, штаммы с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам выявить невозможно, они попадают в категорию «Чувствительный» (S).

Таким образом, наше исследование показало, что детекция молекулярных механизмов устойчивости к АМП необходима для выбора адекватной антимикробной терапии, а также способна стать важным элементом эпидемиологического надзора за сальмонеллезом. Детерминанты резистентности (хромосомные или плазмидные) могут быть использованы как

маркеры международных резистентных клонов высокого риска, а также при внутривидовом типировании штаммов *Salmonella* одного серовара.

Российская Федерация не принадлежит к странам с высокой заболеваемостью брюшным тифом: по данным официальной регистрации в последние десятилетия заболеваемость не превышает 0,03-0,1 на 100 тыс. населения. Современной особенностью эпидемиологии брюшного тифа в РФ является увеличение частоты «завоза» инфекции с территорий эндемичных стран ближнего и дальнего зарубежья, а также заражение жителей России при выезде в эти страны. В исследуемый период отмечался «завоз» брюшного тифа с эндемичных территорий Центральной, Южной и Юго-Восточной Азии туристами, трудовыми мигрантами, иностранными студентами, обучающимися в ВУЗах РФ. В 2008-2018 гг. зарегистрированы случаи завоза из Индии, Таджикистана, Узбекистана, Кыргызстана, Азербайджана, Абхазии, Бангладеш, Камбоджи, Пакистана, Непала, Египта, Объединенных Арабских Эмиратов и Мадагаскара.

В 2005-2007 гг. эпидемиологическую ситуацию по брюшному тифу в Москве и Санкт-Петербурге осложнило наличие достаточно обширного контингента высокого эпидемического риска – лиц без определенного места жительства, ведущих асоциальный образ жизни, среди которых регулярно регистрировались случаи брюшного тифа. В Санкт-Петербурге в 2005-2007 гг. заболевшие трудоспособного возраста в 46,4% случаев были представлены лицами из так называемых социальнодезадаптированных групп населения (СДГН), не имеющих в городе прописки, жилой площади и работы, которые прибыли в Санкт-Петербург с разных территорий страны и проживали на чердаках, в подвалах, теплоцентрах, строящихся или расселенных зданиях. 32,0% случаев брюшного тифа были зарегистрированы среди жителей города трудоспособного возраста, ведущих асоциальный образ жизни, общавшихся с представителями СДГН. Рабочие различных предприятий и учреждений города составили 13,4%, служащие – 8,2% (в этой категории были жители города – представители разных профессий, вернувшиеся из Индии, Непала, Египта, где находились в туристических поездках) [13]. Такая специфичная социальная

структура заболевших, пребывание в антисанитарных условиях, грубые нарушения правил личной гигиены в быту и поздняя изоляция «источников» способствовала формированию эпидемических очагов с множественными заболеваниями. Общение безработных жителей города, злоупотребляющих алкоголем, с лицами из СДГН способствовало «заносу» брюшного тифа в коммунальные и отдельные квартиры. В итоге в течение 2,5 лет на фоне подъема заболеваемости в Санкт-Петербурге возникли шесть очагов с вторичными заболеваниями в социально неблагополучных семьях, а также пять очагов в местах обитания СДГН (от 2 до 4 заболевших). Проявления эпидемического процесса определялись не только уровнем санитарно-коммунального благоустройства, но и образом жизни особых социальных групп населения и миграционными процессами. На фоне спорадической заболеваемости в 2006 г. возникла вспышка брюшного тифа среди курсантов Военно-космической академии им. А.Ф. Можайского с числом пострадавших более 200 человек в результате употребления инфицированных на пищеблоке блюд. Раннее активное выявление больных и своевременно начатая антибактериальная терапия способствовали тому, что заболевание у курсантов чаще протекало в среднетяжелой (61,5%) и легкой (37,4%) формах. Тяжелая форма была установлена только у 1,1% больных [6]. В результате мероприятий, проведенных санитарно-эпидемиологической службой совместно с другими ведомствами, к концу 2007 г. эпидемиологическая напряженность с брюшным тифом в мегаполисах была снята.

В 2005-2018 гг. в РФ было зарегистрировано 798 случаев брюшного тифа как в виде спорадических единичных случаев, так и случаев групповых заболеваний – от небольших очагов (2-4 заболевших) до массовых случаев, обусловленных водным и пищевым факторами передачи. Случаи массовых групповых заболеваний возникали в организованных коллективах из-за нарушений норм действующего санитарного законодательства на пищеблоках, а также в местах коллективного проживания трудовых мигрантов из-за неудовлетворительного водоснабжения и несоблюдения санитарно-гигиенических норм в быту.

В ходе нашего исследования изучены 299 штаммов *S. Typhi* из коллекции референс-центра по мониторингу за возбудителем брюшного тифа. Штаммы были выделены на 22 административных территориях РФ в 2005-2019 гг. из различного клинического материала как при спорадических, так и при групповых случаях брюшного тифа. Возбудитель характеризовался различными фенотипами резистентности к АМП и генетической неоднородностью. Менее 10,0% штаммов были чувствительны к АМП, 90,6% характеризовались устойчивостью. Отмечена высокая активность в отношении штаммов *S. Typhi* аминопенициллинов (МПК<sub>90</sub> ампициллина 1,0 мг/л), цефалоспоринов расширенного спектра (МПК<sub>90</sub> цефотаксима 0,25 мг/л), азитромицина (8,0 мг/л), хлорамфеникола (4,0 мг/л) и триметоприм/сульфаметоксазола (0,12 мг/л). Не выявлены штаммы, устойчивые к ЦРС, карбапенемам и азитромицину.

Следует обратить внимание на низкую активность фторхинолонов (МПК<sub>90</sub> ципрофлоксацина 0,25 мг/л), которые являются препаратами выбора и входят в протоколы лечения брюшного тифа: чувствительны к этой группе АМП оказались только 10,4% штаммов *S. Typhi*, выделенных в РФ в 2005-2019 гг. В популяции возбудителя преобладали штаммы с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам (82,3 на 100 исследованных штаммов), что отражает тенденции развития устойчивости в эндемичных странах Юго-Восточной Азии, откуда в большинстве случаев происходит «завоз» возбудителя в РФ. В последние годы доля таких штаммов в этом регионе выросла до 65,0% (во Вьетнаме до 97,0%) [124, 221, 262]. Выявленный у «российских» штаммов *S. Typhi* фенотип устойчивости обусловлен единичными хромосомными мутациями в гене *gyrA*: выявлены три варианта однонуклеотидных замен – Asp87Asn, Ser83Tyr и Ser83Phe. У большинства штаммов *S. Typhi* (71,4% устойчивых) встречалась замена Asp87Asn: штаммы, характеризующиеся таким фено- и генотипом, выделяли во все годы наблюдения практически на всех административных территориях РФ. Штаммы с мутацией Ser83Tyr (6,7%) выделяли в Санкт-Петербурге, Иркутской, Архангельской и Тульской областях. Единственный штамм с мутацией Ser83Phe (0,9%) был завезен в Санкт-Петербург из Индии в



2012 г. Следует отметить, что именно этот вид мутаций наиболее часто описан в литературе для штаммов *S. Typhi*, выделенных в странах Азии: от 60,0 до 90,0% исследуемых штаммов с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам имели однонуклеотидную замену *gyrA* Ser83Phe [124, 241, 274, 295]. Несмотря на то, что единичные мутации обуславливают низкий уровень устойчивости к фторхинолонам, показана недостаточная клиническая эффективность «старых» фторхинолонов (ципрофлоксацин, офлоксацин), используемых в стандартной дозировке в отношении таких штаммов [131, 143, 261, 308]. Некоторые исследователи указывают на эффективность использования высоких доз гатифлоксацина длительным курсом в отношении штаммов *S. Typhi* с устойчивостью низкого уровня [216, 315, 335].

Устойчивость к фторхинолонам высокого уровня (7,3% штаммов в популяции возбудителя) была обусловлена наличием сочетанных однонуклеотидных замен в хромосомных генах *gyrA* и *parC*: у большинства штаммов *gyrA* (Ser83Phe + Asp87Asn) + *parC* Ser80Ile, у одного штамма – *gyrA* Ser83Phe + *parC* Ser80Ile. Штаммы *S. Typhi* с устойчивостью высокого уровня к фторхинолонам выделяли в 2005-2019 гг. на семи территориях РФ: в Санкт-Петербурге (2007, 2013, 2017, 2018 гг.), Калининградской (2011, 2012 гг.), Смоленской (2012, 2019 гг.), Воронежской (2014 г.), Кировской (2015 г.), Архангельской (2015 г.) областях, Ханты-Мансийском АО (2016 г.) и Удмуртии (2019 г.). В пяти случаях достоверно установлено, что заболевшие (туристы, студенты российских ВУЗов индийского происхождения) были инфицированы во время поездок в Индию. По данным литературы штаммы с высоким уровнем устойчивости и такими генотипами выделяли во многих странах Азии: в 2005 г. каждый пятый штамм *S. Typhi*, выделенный от пациентов в Индии, характеризовался такой устойчивостью [124, 173, 241]. В экспериментах с мутантными штаммами *S. Typhi* было показано, что для достижения устойчивости высокого уровня необходимо наличие мутаций как в гене *gyrA*, так и *parC* [93]. Это подтверждается многими исследователями: у азиатских штаммов *S. Typhi* с тремя мутациями *gyrA* (Ser83Phe + Asp87Asn) + *parC* (Ser80Ile) МПК

поднималась до 16,0 Мг/л, также как у «российских» штаммов [173, 308]. В том случае, если штамм возбудителя характеризуется высоким уровнем устойчивости к фторхинолонам, лечение любыми препаратами этой группы (включая гатифлоксацин) неэффективно [308].

Таким образом, идентичные фенотипы резистентности у штаммов *S. Typhi* были обусловлены разными однонуклеотидными заменами (в разных генах, разных кодонах, единичными или в сочетании друг с другом). Дальнейшая молекулярная оценка филогенетической близости штаммов показала, что однонуклеотидные замены в хромосомных генах могут служить эпидемиологической меткой возбудителя для выяснения происхождения и подтверждения завоза штаммов *S. Typhi* на территорию РФ. Так, штаммы, выделенные из одной вспышки, принадлежащие к одной генетической группе, характеризовались идентичными мутациями.

В популяции возбудителя выявлены штаммы (3,0%) с фенотипом множественной устойчивости, включающим АМП, использовавшиеся ранее как препараты «первой линии» для лечения брюшного тифа (ампициллин, хлорамфеникол, триметоприм/сульфаметоксазол) и современные (хинолоны). В мире первые штаммы с «классическим» для возбудителя брюшного тифа MDR-фенотипом стали регистрировать в 80-е гг. XX века, когда хлорамфеникол, ампициллин и триметоприм широко использовали для лечения брюшного тифа, в 90-е гг. к «классическими» фенотипу присоединилась устойчивость к хинолонам [33, 247]. В 2000-х гг. такие штаммы в странах Юго-Восточной Азии составляли до 90,0% популяции возбудителя [327]. Отказ от использования препаратов «первой линии» для лечения брюшного тифа привел к элиминации плазмиды, обуславливающей MDR-фенотип, и доля полирезистентных штаммов в странах Азии снизилась до 20-30,0% [124, 221, 262, 274], но остается достаточно высокой (до 60,0%) в странах Западной Африки, где продолжают использовать дешевые АМП для лечения брюшного тифа [97, 334]. В РФ такие штаммы в исследуемый период выделяли при спорадических случаях на четырех территориях (Санкт-Петербурге, Архангельске, Иркутске и Ленинградской области) и не каждый год

(2005, 2006, 2013 и 2015 гг.). Эпидемиологическое расследование показало, что появление MDR-штаммов в РФ связано с их «завозом» трудовыми мигрантами из стран Средней Азии (Таджикистана и Узбекистана), а также из Индии. Практически все «российские» MDR-штаммы содержали плазмиду группы IncHI1(R27) сиквенс-типа PST6, содержащую гены резистентности к АМП «первой линии», кроме того у всех штаммов выявлена устойчивость к хинолонам, обусловленная однонуклеотидными заменами в гене *gyrA*. В последние годы MDR-фенотип возбудителя становится более разнообразным, появились различные варианты, отличающиеся от «классического» наличием или отсутствием некоторых генов в составе различных плазмид.

В последние годы в Пакистане зарегистрированы случаи брюшного тифа, вызванного «чрезвычайно устойчивыми» (extra drug resistant, XDR) штаммами *S. Typhi*, которые резистентны практически ко всем АМП, используемым для лечения (хлорамфениколу, ампициллину, триметоприм/сульфаметоксазолу, фторхинолонам и ЦРС), и сохраняют чувствительность только к азитромицину, карбапенемам и тигециклину. Такие штаммы получили межконтинентальное распространение и выделены в Европе и США от туристов, вернувшихся из Пакистана [123, 215]. В РФ пока не зарегистрированы случаи завоза XDR-штаммов, но очевидна необходимость уделять особое внимание пациентам, вернувшимся из Пакистана, для которых рекомендованы особые режимы стартовой терапии: неосложненного брюшного тифа – азитромицином, осложненного (энцефалопатия, перфорация кишечника, перитонит, кишечное кровотечение) – карбапенемами [123].

В настоящее время для лечения диарейных заболеваний, включая брюшной тиф, рекомендован азитромицин – препарат из группы макролидов, активный в отношении *Salmonella* [1, 62, 65, 122, 152, 179]. В рекомендациях EUCAST и КР отсутствуют критерии интерпретации при определении чувствительности к азитромицину методами разведений или ДДМ, чувствительность штаммов *Salmonella* к этому препарату рекомендовано оценивать, сравнивая МПК штамма со значениями, полученными для «дикой» популяции: ECOFF  $\leq 16,0$  мг/л. В рекомендациях CLSI приведены критерии: S  $\leq 16,0$  мг/л, R  $\geq 32,0$  мг/л, которые

также основаны на распределении МПК популяции *S. Typhi* и *S. Paratyphi B* и значении ECOFF. Масштабное исследование более 1500 штаммов *S. Typhi*, выделенных в семи азиатских странах, показало, что для 99,5% штаммов МПК азитромицина не превышала 16,0 мг/л и лечение азитромицином пациентов, инфицированных такими штаммами, было успешным в 91,0% случаев [262]. Несмотря на то, что в рекомендациях CLSI приведены критерии интерпретации для ДДМ ( $S \geq 13$  мм,  $R \leq 12$  мм), зона подавления роста *Salmonella* вокруг диска с этим антибиотиком, как правило, формирует нечеткую границу и ее диаметр не имеет прямой зависимости от МПК: для штаммов с МПК 8,0 мг/л диаметр зоны может колебаться от 13 до 25 мм, поэтому для определения чувствительности к азитромицину следует использовать методы, позволяющие получить значение МПК [262]. Исследования, проведенные в РФ (Смоленск), показали, что МПК азитромицина в отношении штаммов *Salmonella*, вызывавших гастроэнтериты у детей, находились в пределах 2,0-4,0 мг/л. [12]. Наше исследование также подтвердило высокую активность азитромицина в отношении возбудителя брюшного тифа: подавляющее большинство штаммов относились к «дикому» типу, МПК<sub>90</sub> этого препарата не достигали значения ECOFF и составили 8,0 мг/л. В ходе нашего исследования устойчивые к азитромицину («не-дикого» типа) штаммы *S. Typhi* не обнаружены, и азитромицин может быть рекомендован для лечения брюшного тифа в РФ.

Таким образом, учитывая результаты мониторинга чувствительности к АМП штаммов *S. Typhi*, в РФ фторхинолоны не могут быть использованы для лечения брюшного тифа без предварительного определения чувствительности возбудителя. Для стартовой терапии с высокой вероятностью клинической эффективности могут быть использованы ЦРС и азитромицин. «Старые» АМП – ампициллин, хлорамфеникол и триметоприм/сульфаметоксазол – также сохраняют высокую активность в отношении штаммов возбудителя, выделенных в РФ.

Филогенетическую характеристику штаммов *S. Typhi*, завезенных в 2005-2019 гг. на административные территории РФ, осуществили несколькими молекулярными методами, широко использующимися в настоящее время в мире.

Согласно международной базе данных EnteroBase (<http://enterobase.warwick.ac.uk>) более 95,0% штаммов *S. Typhi*, изученных к настоящему времени классическим методом MLST, относятся к двум генетически близким сиквенс-типам ST1 и ST2. Это свидетельствует о том, что *S. Typhi* – относительно молодой возбудитель, характеризующийся высокой консервативностью генома и выраженной клональностью популяции [74, 195, 214]. Анализ данных полногеномного секвенирования показал, что на территорию РФ завозят штаммы этих двух сиквенс-типов: 83,7% изученных штаммов относились к ST1 и 16,3% – к ST2, штаммы других сиквенс-типов не выявлены.

В настоящее время для изучения генетического разнообразия штаммов *S. Typhi*, оценки популяционной структуры возбудителя и определения степени родства между единичными штаммами или группами штаммов широко используют SNP-типирование. Использование для филогенетической классификации двух алгоритмов анализа полногеномных данных (анализ полного спектра SNP и упрощенный анализ филогенетически значимых SNP, предложенный Wong et al. в 2016 г.) позволило выявить выраженное генетическое разнообразие «российской» популяции штаммов *S. Typhi*. Установлено, что заболевания брюшным тифом в РФ в 2005-2019 гг. вызывали штаммы, принадлежащие всем четырем глобальным первичным генетическим кластерам, описанным в литературе [333]. В то же время в РФ выявлено доминирование одной генетической линии возбудителя: более 80,0% «российских» штаммов принадлежали к международному клону высокого риска («азиатскому» клону) – субкладе 4.3.1 (гаплотипу H58 согласно Roumagnac et al.) и происходили из стран Юго-Восточной и Южной Азии. В РФ эта доминирующая генетическая группа была преимущественно (более 60,0%) представлена штаммами, идентичными по фенотипу и механизму резистентности к АМП: устойчивость низкого уровня к фторхинолонам, обусловленная однонуклеотидной заменой в гене *gyrA* Asp87Asn. К этой же генетической группе принадлежали и штаммы с устойчивостью высокого уровня к фторхинолонам, обусловленной тремя заменами в генах *gyrA* и *parC*; по данным литературы такие штаммы выделены в последние годы в Индии и Непале [107, 266]. Штаммы субклады 4.3.1 вызывали

спорадические и групповые заболевания брюшным тифом в разные годы на всех территориях РФ.

По данным литературы в течение многих лет для штаммов гаплотипа H58 (субклады 4.3.1) была характерна множественная устойчивость к АМП «первой линии» (ампициллин, хлорамфеникол, триметоприм/сульфаметоксазол), обусловленная плазмидой рНСМ1: MDR-фенотип обнаруживали более чем у 70,0% штаммов гаплотипа H58, причем в сочетании с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам, обусловленной у большинства штаммов мутацией *gyrA* Ser83Tyr [332]. У «российских» MDR-штаммов *S. Typhi* гаплотипа H58 фенотип резистентности сформировался также в результате сочетания нескольких механизмов устойчивости: хромосомных (однонуклеотидные замены *gyrA* Asp87Asn и Ser83Phe; *parC* Ser80Ile, обуславливающие устойчивость к хинолонам) и опосредованных плазмидами (гены резистентности на плазмидах рНСМ1 PST 6 и IncN). Эволюция устойчивости к АМП штаммов *S. Typhi* субклады 4.3.1 свидетельствует, что штаммы одной филогенетической группы, имеющие одинаковую хромосомную мутацию, способны в условиях селективного давления использующихся для лечения антибиотиков приобрести дополнительные детерминанты резистентности, расположенные на плазмиде и «расширить» таким образом фенотип резистентности, и также потерять плазмиду, когда селективное давление прекращается. Известно, что плазмиды резистентности могут «входить» или элиминироваться из генетически гомогенной популяции возбудителя в зависимости от потребности в дополнительных механизмах резистентности в ситуации использования тех или иных АМП.

Другие генетические кластеры (не 4.3.1) были представлены единичными штаммами, значительно отличающимися по фенотипам и механизму резистентности от основной филогенетической линии 4.3.1. Следует отметить, что в РФ относительно широко был представлен генетический кластер 1, субклада 1.2.1, к которому принадлежали 8 штаммов, завезенных из Казахстана и Кыргызстана, отличающихся чувствительностью ко всем АМП.

Для оценки идентичности штаммов и подтверждения их эпидемиологической связи при возникновении групповых случаев сальмонеллезов, включая брюшной тиф, широко используют метод PFGE. Проведённое нами исследование 107 штаммов, вызвавших как спорадические, так и групповые случаи заболеваний, выявило семь генетических кластеров, включающих от 2 до 61 штамма. Установлено преобладание одного PFGE-кластера, к которому относилось большинство штаммов с идентичным фенотипом и генотипом резистентности (устойчивость низкого уровня к фторхинолонам, обусловленная мутацией *gyrA Asp87Asn*). Следует отметить, что к этому кластеру принадлежали штаммы, выделенные в Санкт-Петербурге во время вспышки в закрытом военном учреждении в 2006 г. Анализ штаммов, относящихся к этому кластеру, методом SNP-типирования выявил их принадлежность к субкладе 4.3.1 (гаплотипу H58). Метод PFGE обладал эпидемиологической конкордантностью – эпидемиологически связанные штаммы, выделенные от заболевших из одного очага группой заболеваемости, группировались в один кластер. Результаты оценки генетического родства штаммов возбудителя брюшного тифа методом PFGE соответствовали филогенетической характеристике, полученной методом SNP-типирования. К одному PFGE-кластеру относились штаммы одной субклады. В то же время штаммы доминирующей субклады 4.3.1 разделились на два PFGE-кластера, коэффициент подобия которых составил 78. Субклада 1.2.1, представленная штаммами эпидемиологически связанными с Казахстаном и Кыргызстаном, была представлена штаммами трех неродственных PFGE-кластеров с коэффициентом подобия менее 60. Наше исследование подтвердило ограниченные возможности метода PFGE для субтипирования сероваров с высоко консервативным геномом, включая *S. Typhi*, генетически отдаленные штаммы которых могут иметь идентичные PFGE-профили. Набор получаемых фрагментов макрорестрикции не удастся описать с помощью какой-либо эволюционной математической модели, поэтому метод подходит только для установления идентичности штаммов в рамках расследования вспышек. Данные PFGE-типирования отражают

генетическое пространственно-временное разнообразие циркулирующих изолятов, но не их филогенетические связи.

Таким образом, несмотря на низкую заболеваемость брюшным тифом в РФ, резистентность возбудителя к АМП стала реальной проблемой в нашей стране. Так же как в других экономически развитых странах, в РФ заболевания брюшным тифом возникают в основном в результате «завоза» возбудителя при инфицировании туристов или трудовых мигрантов в странах, неблагополучных по брюшному тифу. Анализ популяции штаммов возбудителя брюшного тифа, циркулирующих в различных странах, включая Россию, свидетельствует о том, что глобальное распространение получили штаммы одной генетической линии (субклады 4.3.1 или гаплотипа H58) с характерным фенотипом резистентности, затрагивающим фторхинолоны – препараты выбора для лечения брюшного тифа, что является прогностическим признаком клинической неэффективности эмпирической терапии брюшного тифа фторхинолонами в нашей стране. Кроме того, популяция возбудителя включает штаммы с множественной устойчивостью к АМП, обусловленной одновременно несколькими механизмами (модификацией мишени, продукцией бета-лактамаз и др.) за счет мутаций в хромосомных генах и приобретения генов на мобильных генетических элементах (плазмидах), что также осложняет выбор адекватной этиотропной терапии. В настоящее время при исследовании гетерогенной популяции возбудителя брюшного тифа оптимальная схема субтипирования штаммов, включающая комбинацию методов фенотипической и молекулярной характеристики (выбор которых зависит от конкретных эпидемиологических задач), обладает высокой информативностью и позволяет выявлять клональный характер возбудителя, вызвавшего спорадические или групповые случаи заболевания.

Высокие показатели устойчивости к АМП, выявленные в ходе исследования, свидетельствуют о необходимости постоянного мониторинга биологических свойств (сероварная характеристика, чувствительность и механизмы клинически значимой резистентности к АМП, филогенетическая характеристика), штаммов *Salmonella*, включая возбудителя брюшного тифа, поскольку сальмонеллезы



способны к эпидемическому распространению и возникновению вспышек, а инфицирование резистентными штаммами приводит к снижению эффективности антимикробной терапии. Микробиологический мониторинг, включающий детекцию молекулярных механизмов резистентности, проводимый на разных уровнях (локальном, региональном, национальном), позволяет отслеживать тенденции развития устойчивости в популяции возбудителя, своевременно оптимизировать протоколы лечения сальмонеллезов и следить за циркуляцией штаммов *Salmonella* международных клонов высокого риска на территории РФ.

## ВЫВОДЫ

1. В Санкт-Петербурге более 90% штаммов *Salmonella* принадлежали сероварам *S. Enteritidis* (79,6%), *S. Typhimurium* (6,8%) и *S. Infantis* (3,8%), доля штаммов, устойчивых к антимикробным препаратам, составила 65,5%. Устойчивость к антибиотикам, используемым для лечения сальмонеллезов – хинолонам, нитрофуранам, азитромицину и цефалоспорином расширенного спектра, выявлена у 60,9; 37,9; 1,7 и 1,6% штаммов, соответственно.

2. Установлены серовароспецифические различия в устойчивости к антибиотикам. Серовар *S. Enteritidis* преимущественно представлен штаммами, устойчивыми к хинолонам (60,0%). У *S. Typhimurium* выявлена максимальная доля штаммов, устойчивых к бета-лактамам: ампициллину (43,1%) и цефалоспорином расширенного спектра (7,8%). Серовар *S. Infantis* представлен штаммами с множественной устойчивостью к хинолонам, тетрациклину и триметоприм/сульфаметоксазолу (67,9%).

3. Выявлен рост резистентности штаммов *Salmonella* к антибиотикам в 2014-2019 гг. по сравнению с 2002-2005 гг. в 4 раза (65,5 и 16,7% устойчивых штаммов соответственно), в том числе, к хинолонам – в 10 раз (60,9 и 5,9%) и триметоприм/сульфаметоксазолу – в 6 раз (6,3 и 1,1%).

4. Установлено, что в популяции возбудителя брюшного тифа в Российской Федерации в 2005-2019 гг. преобладали штаммы *S. Typhi* с фенотипами резистентности к хинолонам (87,6%) и множественной устойчивости к антибиотикам, используемым для лечения брюшного тифа (3,0%).

5. Показано, что устойчивость к бета-лактамам штаммов *Salmonella* обусловлена продукцией бета-лактамаз широкого спектра TEM-1 (92,7% устойчивых к аминопенициллинам штаммов), расширенного спектра CTX-M групп -1, -9, -2 (88,9% устойчивых к цефалоспорином расширенного спектра штаммов), цефалоспориноаз CMY-2 (11,1%). Модифицированный алгоритм фенотипической детекции позволяет дифференцировать «классические» бета-лактамазы расширенного спектра и AmpC-цефалоспориноазы.

6. Устойчивость низкого уровня к фторхинолонам у штаммов *Salmonella* обусловлена модификацией ДНК-гиразы вследствие единичных однонуклеотидных замен в хромосомном гене *gyrA* (Ser83Phe, Ser83Tyr, Asp87Asn, Asp87Tyr, Asp87Gly), устойчивость высокого уровня – сочетанной модификацией ДНК-гиразы и топоизомеразы IV в результате однонуклеотидных замен в генах *gyrA* (Ser83Phe и Asp87Asn) и *parC* (Ser80Ile или Glu84Gly).

7. Филогенетический анализ показал, что к международному клону высокого риска субкладе 4.3.1 (гаплотипу H58) принадлежали более 80,0% российских штаммов *S. Typhi*, преимущественно с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам вследствие однонуклеотидной замены *gyrA* Asp87Asn.

8. В Российской Федерации выявлены штаммы *Salmonella*, относящиеся к международным клоном высокого риска (*S. Newport* MDR-AmpC/CMY-2, *S. Kentucky* ST198, *S. Typhi* субклады 4.3.1), фенотип множественной устойчивости которых сформировался в результате приобретения хромосомных мутаций и плазмидных генов резистентности.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Перечень препаратов для тестирования штаммов *Salmonella* в рамках мониторинга чувствительности к антимикробным препаратам должен включать: антибиотики, рекомендованные для лечения; индикаторные препараты для детекции клинически значимых механизмов резистентности и международных клонов высокого риска; препараты перспективные в отношении лечения инфекций, вызванных полирезистентными штаммами.

2. Хинолоны не следует использовать для лечения сальмонеллезных инфекций, включая брюшной тиф, без предварительного определения чувствительности возбудителя. При выборе антибиотика для стартовой терапии брюшного тифа необходимо учитывать информацию о том, из какого региона завезен штамм возбудителя. С высокой вероятностью клинической эффективности в РФ могут быть рекомендованы цефалоспорины расширенного спектра и азитромицин.

3. При определении чувствительности штаммов *Salmonella* к хинолонам следует использовать комплексный подход (скрининг диско-диффузионным методом с пefлоксацином и налидиксовой кислотой и определение МПК ципрофлоксацина) и критерии интерпретации, приведенные в актуальных версиях EUCAST и Клинических рекомендациях «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».

4. Представляется целесообразным ввести категорию «Зона технической неопределенности» при определении чувствительности штаммов *Salmonella* к хинолонам: МПК ципрофлоксацина 0,06 мг/л, диаметр зоны задержки роста пefлоксацина 23 – 25 мм.

5. Для оценки возможности использования фторхинолонов для лечения сальмонеллезной инфекции и выбора режима дозирования следует определять уровень устойчивости штамма к ципрофлоксацину. Клиническое значение устойчивости низкого уровня зависит от типа инфекционного процесса: в случае генерализованной инфекции назначение фторхинолонов не рекомендовано, при

лечении сальмонеллезного гастроэнтерита возможно назначение фторхинолонов с коррекцией режима дозирования в зависимости от МПК ципрофлоксацина.

6. Модифицированный алгоритм фенотипической детекции, включающий определение чувствительности к цефтазидиму, цефотаксиму, цефокситину, цефепиму и тесты с ингибиторами бета-лактамаз, эффективен для дифференциации «классических» бета-лактамаз расширенного спектра и AmpC-цефалоспоринов у штаммов *Salmonella*. Скрининг бета-лактамаз расширенного спектра и карбапенемаз у штаммов *Salmonella* следует проводить в обязательном порядке в рамках рутинного тестирования.

7. Выделенные при генерализованных формах сальмонеллезной инфекции штаммы *S. Typhi* и *Salmonella* других сероваров с подтвержденной продукцией бета-лактамаз расширенного спектра следует расценивать как устойчивые ко всем цефалоспориновым антибиотикам расширенного спектра, даже если штамм формально относится к категории «чувствительный».

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В ходе выполнения плана мероприятий по реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности, принятой в 2019 г. Правительством РФ, необходимо создание интегративной системы мониторинга антибиотикорезистентности штаммов *Salmonella*, выделенных от людей, сельскохозяйственных животных и пищевых продуктов.

Высокий уровень устойчивости штаммов *Salmonella* к колистину, тигециклину и нитрофуранам, выявленный в ходе исследования, требует дальнейшего изучения для установления природных или приобретенных механизмов резистентности.

Учитывая наличие и доступность обширных международных баз данных (Enterobase, Pathogene Detection и PubMLST) для РФ актуальным является разработка научно обоснованных биоинформатических технологий, опирающихся на методы полногеномного секвенирования, и создание национальной базы данных молекулярных исследований штаммов *Salmonella*, необходимых для формирования современной системы надзора за сальмонеллезами.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АМП	– Антимикробный препарат
БЛРС	– Бета-лактамазы расширенного спектра
БЛШС	– Бета-лактамазы широкого спектра
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ДДМ	– Диско-диффузионный метод
ДИ	– Доверительный интервал
ДНК	– Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕС	– Европейский Союз
ИСМП	– Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
КР	– Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам»
МПК	– Минимальная подавляющая концентрация
НИИ	– Научно-исследовательский институт
ОКИ	– Острые кишечные инфекции
ПЦР	– Полимеразная цепная реакция
РФ	– Российская Федерация
ФБУЗ	– Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения
ФБУН	– Федеральное бюджетное учреждение науки
ЦРС	– Цефалоспорины расширенного спектра
AmpC	– Цефалоспорины молекулярного класса C
АТСС	– American Type Culture Collection; Американская коллекция типовых культур
CGE	– Center for Genomic Epidemiology
CLSI	– Clinical Laboratory Standard Institute; Институт клинических лабораторных стандартов
ECDC	–European Centre for Disease Prevention and Control; Европейский Центр по контролю заболеваний
ECOFF	– Epidemiological cut off value; эпидемиологическая точка отсечения
EDTA	– Ethylene diamine tetraacetic acid
EFSA	–European Food Safety Authority; Европейское Агентство по пищевой безопасности
EUCAST	– The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; Европейский комитет по определению чувствительности

	микроорганизмов к антимикробным препаратам
FQ-LLR	– fluoroquinolone low-level resistance; устойчивость низкого уровня к фторхинолонам
FQ-HLR	– fluoroquinolone high-level resistance; устойчивость высокого уровня к фторхинолонам
I	– Susceptible, increased exposure; чувствительный при увеличенной экспозиции
KPC	– <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MDR	– Multidrug resistance; множественная устойчивость к антимикробным препаратам
MLST	– Multi-locus Sequence Typing; мультилокусное сиквенс-типирование
MLVA	– Multiple locus variable number tandem repeat analysis
NARMS	– National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria
NDM	– New Delhi metallo-beta-lactamase
PFGE	– Pulse field gele electrophoresis; гель-электрофорез в пульсирующем электрическом поле
PMQR	– Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; плазмидопосредованная устойчивость к хинолонам
PST	– Plasmid sequence type; сиксенс-тип плазмиды
R	– Resistant; резистентный, устойчивый
QRDR	– Quinolone Resistance Determining Region; участок, детерминирующий устойчивость к хинолонам
S	– Susceptible, standart dosing regimen; чувствительный при стандартном режиме дозирования
SNP	– Single nucleotide polymorphism
ST	– Sequence type; сиксенс-тип
WGS	– Whole genome sequencing; полногеномное секвенирование
XDR	– Extra drug resistance; чрезвычайная устойчивость к антибиотикам
WT	– Wild type; «дикий» тип – популяция штаммов, не имеющая механизмов резистентности к тестируемому АМП



**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Андреева, И.В. Отпуск без проблем: современные подходы к профилактике и лечению диареи путешественников / И.В. Андреева, О.У. Стецюк // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2018. – Т. 20, № 3. – С. 172-180.
2. Ахметова, Л.И. Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов шигелл и сальмонелл, выделенных в Екатеринбурге / Л.И. Ахметова, С.М. Розанова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т. 3, № 2. – С. 58-62.
3. Басина, В.В. Хирургические осложнения сальмонеллеза: анализ серии случаев / В.В. Басина, Х.Д. Перадзе, А.К. Авдовская, О.А. Петрова // Вестник Дагестанской государственной медицинской академии. – 2019. – Т. 30, № 1. – С. 28-32.
4. Беляева, Н.М. Брюшной тиф (инфекция, вызванная *Salmonella Typhi*) у взрослых (Клинические рекомендации): учебное пособие // Н.М. Беляева, Л.В. Погорельская, И.В. Шестакова, Л.А. Кафтырева, Л.П. Иванова, В.В. Никифоров, М.З. Шахмарданова, Л.В. Соколова, Д.А. Валишин, Л.В. Арсланова. – Минздрав. – Москва, 2016. – 53 с.
5. Виткова, О.Н. Изучение антибиотикорезистентности сальмонелл, выделенных от животных и из пищевых продуктов животного происхождения на территории Российской Федерации / О.Н. Виткова, О.Е. Иванова, С.Б. Базарбаев, В.И. Белоусов // Ветеринария Кубани. – 2015. – Т. 2. – С. 11-15.
6. Волжанин, В.М. Брюшной тиф у военнослужащих. / В.М. Волжанин // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – Т. 1. – С. 45-48.
7. Галькевич, Н.В. Инвазивный (внекишечный) сальмонеллез у детей: серия клинических случаев / Н.В. Галькевич, Н.В. Голобородько, А.А. Астапов, Л.И. Матуш, Н.Л. Ключко, А.В. Лазарев, И.А. Герасименко // Клиническая инфектология и паразитология. – 2018. – Т. 7, № 2. – С. 211-223.

8. Гончар, Н.В. Заболеваемость детей сальмонеллезом и уровень резистентности клинических штаммов сальмонелл к антибактериальным препаратам в Санкт-Петербурге / Н.В. Гончар, И.В. Лазарева, С.В. Рычкова, А.С. Кветная, Л.П. Альшаник, Ю.В. Фомичева, О.И. Ныркова, Л.А. Кириленко // Журнал инфектологии. – 2015. – Т. 7, № 1. – С.80-86.
9. Евмененкова, И.Г. Анализ резистентности штаммов *Salmonella* spp. к антибиотикам в Смоленском регионе за 2012-2017 гг. / И.Г. Евмененкова, Л.В. Мурач // Смоленский Медицинский Альманах. – 2018. – № 1. – С. 93-96.
10. Елиусизова, А.Б. Чувствительность к фторхинолонам сальмонелл в Сибири и на Дальнем Востоке / А.Б. Елиусизова, Ф.Н. Шубин, Н.А. Кузнецова, С.И. Бахолдина // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2010. – № 4. – С. 51-54.
11. Ершова, М.И. Особенности течения сальмонеллеза у детей / М.И. Ершова, Н.М. Ершова, И.А. Неретина, Е.А. Матвеева, Е.Л. Солопенко, Т.Е. Макарова // Здравоохранение Дальнего Востока. – 2019. – № 1. – С. 53-55.
12. Жаркова, Л.П. Микробиологическое обоснование выбора антимикробных препаратов для терапии сальмонеллеза у детей / Л.П. Жаркова, Н.Н. Смолянкин, А.И. Грекова, С.Н. Козлов // Антибиотики и химиотерапия. – 2017. – Т. 7-8, № 62. – С. 30-35.
13. Жебрун, А.Б. Эпидемиологические особенности брюшного тифа в современных социально-экономических условиях мегаполиса / А.Б. Жебрун, О.В. Парков, И.Г. Чинджерия, Л.Л. Щербак, Н.А. Пацюк, А.Н. Афанасьева, Л.И. Шляхтенко, А.В. Мельцер // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – № 1. – С. 27-31.
14. Захаренко, С.М. Методические рекомендации для клиницистов. Практические рекомендации по ведению пациентов с инфекционной диареей / Ю.В. Лобзин, С.Б. Якушин, С.М. Захаренко // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т 3, № 2. – С. 163-182.
15. Иванов, А.С. Современные представления об антибиотикорезистентности и антибактериальной терапии сальмонеллезов / А.С. Иванов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2009. – Т. 11, № 4. – С. 305-326.

16. Информационные бюллетени референс-центра по мониторингу за сальмонеллезами № 21-25 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.epid-okl.ru/otchetu.html>.
17. Информационный бюллетень референс-центра по мониторингу за сальмонеллезами № 30. – ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора. – Москва, 2018 г. – 55 с.
18. Иоанниди, Е.Ф. Клиническая характеристика и лечение острых кишечных инфекций у взрослых / Е. Ф. Иоанниди, А. В. Осипов, В. Ф. Обехов // Лекарственный вестник. – 2015. – Т. 9, № 3 (59). – С33-39.
19. Кафтырева Л.А. Микробиологические аспекты эпидемиологического надзора за сальмонеллезами в современных условиях: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 03.02.03 / Кафтырева Лидия Алексеевна. – СПб, 1999. – 49 с.
20. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версии 2014, 2015, 2018 г.) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf>
21. Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям, больным сальмонеллезом [Электронный ресурс]. – ФГБУ НИИДИ ФМБА России. – Утв. 09.10.2013. – Режим доступа: <http://niidi.ru/dotAsset/6501246b-27f5-4d17-964d-7dc4defb8b43>.
22. Клинические рекомендации «Сальмонеллез у взрослых» [Электронный ресурс]. – ФГБУ ВПО «Дагестанская государственная медицинская академия» МЗ РФ. – ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ России. – Режим доступа: <http://nnoi.ru/uploads/files/Salmonelles.pdf>
23. Ковалев, О.Б. Характеристика острых кишечных инфекций у детей, госпитализированных в стационар г. Москвы / О.Б. Ковалев, А.А. Новокшенов, А.Л. Россина, С.Б. Чуелов, О.В. Молочкова, А.А. Корсунский, О.А. Кащенко, Е.В. Галеева, Н.И. Крылатова, Е.Ю. Пылаева, В.Е. Караулова, С.А. Тесова, Г.Ю. Журавлев // Детские инфекции. – 2017. – Т. 16, № 3. – С. 59-63.

24. Коваленко, А.Н. Патогенез брюшного тифа: взгляд с современных позиций / А.Н. Коваленко, Ю.В. Лобзин, В.А. Цинзерлинг // Вестник Санкт-Петербургского Университета. Серия 11. – 2008. – Т. 3. – С. 86-94.
25. Козлов, С.Н. Современная антимикробная химиотерапия: руководство для врачей / С.Н.Козлов, Р.С.Козлов. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва: ООО «Медицинское информационное агентство», 2017. – 400 с.
26. Козырева, В.К. Клональное распространение СТХ-М-5-продуцирующих нозокомиальных штаммов *Salmonella* Typhimurium в России, Беларуси и Казахстане / В.К. Козырева, М.В. Эйдельштейн, Д.В. Тапальский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 38-50.
27. Козырева, В.К. Независимое приобретение резистентности к хинолонам у клонально-родственных нозокомиальных штаммов вследствие гипермутабельности / В.К. Козырева, М.В. Эйдельштейн, Д.В. Топальский, И.С. Азизов, Р.С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробиология и химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 2. – С.153-161.
28. Куземцева, С.В. Микробиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за сальмонеллезом / С.В. Куземцев, О.А. Михайлова // Национальные приоритеты России. – 2017. – Т. 26, № 4. – С. 92-96.
29. Кузнецова, Н.А. Чувствительность к антибиотикам у штаммов *Salmonella* Enteritidis, циркулирующих на территории Сибири и Дальнего Востока, по данным многолетнего мониторинга / Н.А. Кузнецова, А.С. Соловьева, А.В. Раков // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2018. – Т. 3. – С. 50-58.
30. Кулешов, К.В. Разработка и апробация методики MLVA-анализа с целью субтипирования изолятов *S. Enteritidis* / К.В. Кулешов, С.И. Браславская, А.Т. Подколзин // Молекулярная диагностика: сб. трудов / колл. авт., под ред. В.И. Покровского. – Т. 2. – Москва, 2010. – 464 с. – С. 350-353.
31. Кулешов, К.В. Сравнительная оценка молекулярно-генетических методов типирования изолятов *S. Enteritidis* в очагах групповой заболеваемости / К.В. Кулешов, А.Т. Подколзин, С.Ш. Рожнова // Молекулярная диагностика: сб.

- трудов / колл.авт., под ред. В.И. Покровского. – Т. 2. – Москва, 2010. – 464 с. – С. 353-357.
32. Кулешов, К.В. Стандартизация получения и анализа данных полногеномного секвенирования при субтипировании изолятов *Salmonella* Enteritidis / К.В. Кулешов, А.С. Павлова, И.А. Гоптарь, А.В. Уткина, А.Н. Гусева, С.Ш. Рожнова, А.Т. Подколзин, Г.А. Шипулин // Молекулярная диагностика: сб. трудов Международ. науч-практ. конф. – 2018. – С. 296-297.
33. Лобзин, Ю.В. Брюшной тиф: современное состояние проблемы / Ю.В. Лобзин, В.М. Волжанин, А.Н. Коваленко // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 47-67.
34. Лобзин, Ю.В. Этиотропная терапия острых кишечных инфекций / Ю.В. Лобзин, С.М. Захаренко // Инфекционные болезни. – 2009. – Т. 7, № 3. – С. 62–67.
35. Методические рекомендации МР № 0100/13745-07-34 Бактериологическая диагностика брюшного тифа и паратифов А, В и С: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 29.12.2007. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. – 20 с.
36. Методические указания МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 04.03.2004. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
37. Милютина, Л.Н. Эволюция лекарственной резистентности сальмонелл, выделенных от детей, и ее клиническая значимость / Л.Н. Милютина, О.В. Гурьева // Лаборатория. – 2011. – № 3. – С. 5-7.
38. Милютина, Л.Н. Практическое руководство по диагностике и лечению сальмонеллезов у детей / Л.Н. Милютина, О.В. Рублева, А.О. Голубев, А.А. Плоскирева, А.В. Горелов. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: Журн. «Архив внутренней медицины», 2014. – 94 с.
39. Мудрак, Д.Е. Молекулярно-генетические особенности устойчивости к бета-лактамам антибиотикам грамотрицательных микроорганизмов - возбудителей

- нозокомиальных инфекций: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03/ Мудрак Дарья Евгеньевна. – М., 2010. – 140 с.
40. Новокшенов, А.А. Основные направления и клинические рекомендации по лечению острых кишечных инфекций у детей на современном этапе/ А.А. Новокшенов, Н.В. Соколова, В.Ф. Учайкин // Медицинский совет. Гастроэнтерология. – 2011. – № 9-10. – С. 24-30.
41. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году: Государственный доклад [Электронный ресурс]. – Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – 2018. – 268 с. –Режим доступа: [https://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/d9d/gd\\_2017\\_seb.pdf](https://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/d9d/gd_2017_seb.pdf)
42. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году: Государственный доклад [Электронный ресурс]. – Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – 2020. – 299 с. – Режим доступа: [https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-2019\\_seb\\_29\\_05.pdf](https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-2019_seb_29_05.pdf)
43. Острая диарея: практические рекомендации ВГО [Электронный ресурс]. – 2008. – 42 с. – Режим доступа: [https://www.volgmed.ru/uploads/files/2013-3/17450-prakticheskie\\_rekomendacii\\_vsemirnoj\\_gastroenterologicheskoy\\_organizacii\\_vgo\\_ostraya\\_diareya\\_2008.pdf](https://www.volgmed.ru/uploads/files/2013-3/17450-prakticheskie_rekomendacii_vsemirnoj_gastroenterologicheskoy_organizacii_vgo_ostraya_diareya_2008.pdf)
44. Отчет референс-центра по мониторингу возбудителей острых кишечных инфекций (РЦКИ) за 2017 год [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.epid-ok.ru/files/reports/rcki/2017-1.pdf>
45. Павлова, А.С. Первичные данные об изучении популяционной структуры доминантного PFGE-типа *S. Enteritidis* JEGX01.0001-JEGA26.0001 и возможности применения полногеномного секвенирования для определения связи между различными очагами заболеваемости / А.С. Павлова, К.В. Кулешов, И.А. Гоптарь, А.В. Уткина, А.Н. Гусева, С.Ш. Рожнова, А.Т. Подколзин, Г.А. Шипулин // Молекулярная диагностика: сб. трудов Международ.науч.-практ. конф. – 2018. – С. 298-299.

46. Приказ МЗ РФ от 7 ноября 2012 г. № 622н "Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при сальмонеллезе легкого течения". Зарегистрировано в Минюсте РФ 21 января 2013 г. Регистрационный № 26614 [Электронный ресурс] // Министерство Здравоохранения РФ. – Режим доступа: <https://www.rosminzdrav.ru /ministry/61/22/stranitsa-979/stranitsa-983/2-standarty-spetsializirovannoy-meditsinskoy-pomoschi/klass-i-nekotorye-infektsionnye-i-parazitarnye-bolezni-a00-b99>
47. Приказ МЗ РФ от 7 ноября 2012 г. № 625н "Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при сальмонеллезе тяжелой степени тяжести". Зарегистрировано в Минюсте РФ 4 февраля 2013 г. Регистрационный № 26800 [Электронный ресурс] // Министерство Здравоохранения РФ. – Режим доступа: <https://www.rosminzdrav.ru/documents/8432-prikaz-ministerstva-zdravoohraneniya-rossiyskoy-federatsii-ot-7-noyabrya-2012-g-625n-ob-utverzhdanii-standarta-spetsializirovannoy-meditsinskoy-pomoschi-pri-salmonelleze-tyazheloy-stepeni-tyazhesti>
48. Приказ МЗ РФ от 7 ноября 2012 г. № 630н "Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при сальмонеллезе средне-тяжелой степени тяжести". Зарегистрировано в Минюсте РФ 21 января 2013 г. Регистрационный № 26626 [Электронный ресурс] // Министерство Здравоохранения РФ. – Режим доступа: <https://www.rosminzdrav.ru/documents/8433-prikaz-ministerstva-zdravoohraneniya-rossiyskoy-federatsii-ot-7-noyabrya-2012-g-630n-ob-utverzhdanii-standarta-spetsializirovannoy-meditsinskoy-pomoschi-pri-salmonelleze-sredne-tyazheloy-stepeni-tyazhesti>
49. Приказ МЗ РФ от 9 ноября 2012 г. № 734н "Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при генерализованной форме сальмонеллеза". Зарегистрировано в Минюсте РФ 26 февраля 2013 г. Регистрационный № 27340 [Электронный ресурс] // Министерство Здравоохранения РФ. – Режим доступа: <https://www.rosminzdrav.ru/documents/8434-prikaz-ministerstva-zdravoohraneniya-rossiyskoy-federatsii-ot-9-noyabrya->

2012-g-734n-ob-utverzhdanii-standarta-spetsializirovannoy-meditsinskoj-pomoschi-pri-generalizovannoy-forme-salmonelleza

50. Приказ МЗ РФ от 9 ноября 2012 г. № 805н "Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при сальмонеллезе средней степени тяжести". Зарегистрировано в Минюсте РФ 20 февраля 2013 г. Регистрационный № 27231 [Электронный ресурс] // Министерство Здравоохранения РФ. – Режим доступа: <https://www.rosminzdrav.ru/documents/8435-prikaz-ministerstva-zdravoohraneniya-rossiyskoy-federatsii-ot-9-noyabrya-2012-g-805n-ob-utverzhdanii-standarta-spetsializirovannoy-meditsinskoj-pomoschi-detyam-pri-salmonelleze-sredney-stepeni-tyazhesti>
51. Приказ МЗ РФ от 24 декабря 2012 г. № 1369н "Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при брюшном тифе средне-тяжелой степени тяжести". Зарегистрировано в Минюсте РФ 11 февраля 2013 г. Регистрационный № 26972 [Электронный ресурс] // Министерство Здравоохранения РФ. – Режим доступа: <https://www.rosminzdrav.ru/documents/8441-prikaz-ministerstva-zdravoohraneniya-rossiyskoy-federatsii-ot-24-dekabrya-2012-g-1369n-ob-utverzhdanii-standarta-spetsializirovannoy-meditsinskoj-pomoschi-detyam-pri-bryushnom-tife-sredne-tyazheloy-stepeni-tyazhesti>
52. Приказ МЗ РФ от 24 декабря 2012 г. № 1370н "Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при брюшном тифе тяжелой степени тяжести". Зарегистрировано в Минюсте РФ 6 февраля 2013 г. Регистрационный № 26845 [Электронный ресурс] // Министерство Здравоохранения РФ. – Режим доступа: <https://www.rosminzdrav.ru/documents/8442-prikaz-ministerstva-zdravoohraneniya-rossiyskoy-federatsii-ot-24-dekabrya-2012-g-1370n-ob-utverzhdanii-standarta-spetsializirovannoy-meditsinskoj-pomoschi-detyam-pri-bryushnom-tife-tyazheloy-stepeni-tyazhesti>
53. Приказ МЗ РФ от 24 декабря 2012 г. № 1435н "Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при брюшном тифе легкой степени тяжести". Зарегистрировано в Минюсте РФ 7 марта 2013 г. Регистрационный № 27550 [Электронный ресурс] // Министерство



- Здравоохранения РФ. – Режим доступа: <https://www.rosminzdrav.ru/documents/8444-prikaz-ministerstva-zdravoohraneniya-rossiyskoy-federatsii-ot-24-dekabrya-2012-g-1435n-ob-utverzhenii-standarta-spetsializirovannoy-meditsinskoj-pomoschi-detyam-pri-bryushnom-tife-legkoy-stepeni-tyazhesti>
54. Распоряжение Правительства РФ от 30.03.2019 N 604-р «Об утверждении Плана мероприятий на 2019 - 2024 годы по реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года, утв. Распоряжением Правительства РФ от 25.09.2017 N 2045-р» [Электронный ресурс] // СПС КонсультантПлюс: Законодательство: Версия Проф. – Режим доступа: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_321959/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_321959/)
55. Решетнева, И.Т. Антибиотикорезистентность сальмонелл, выделенных на территории Красноярского края / И.Т. Решетнева, О.В. Перьянова, Г.М. Дмитриева, Т.С. Остапова // Гигиена и санитария. – 2015. – Т. 94, № 2. – С. 35-38.
56. Рожнова, С.Ш. Микробиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за сальмонеллезом: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук: 14.00.30/ Рожнова Софья Шаевна. – М., 1993. – 59 с.
57. Рожнова, С.Ш. Сальмонеллез: проблемы и решения // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 1999. – № 2. – С. 39-41.
58. Рожнова, С.Ш. Современные подходы к мониторингу за сальмонеллезом / С.Ш. Рожнова, О.А. Христюхина, Н.К. Акулова, Е.И. Агафонова, А.В. Волкова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – Т. 69, № 2. – С. 12-18.
59. Рожнова, С.Ш. Этиологическая структура сальмонеллезом у детей раннего возраста / С.Ш. Рожнова, Н.К. Акулова, О.А. Христюхина // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2015. – Т. 80, № 1. – С. 56-58.
60. Рожнова, С.Ш. Перспективы организации расширенной системы надзора за сальмонеллезом в России / С.Ш. Рожнова, Н.К. Акулова, О.А. Христюхина // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2015. – Т. 85, № 6. – С. 28-34.

61. Рожнова, С.Ш. Роль современных методов типирования в изучении генетического разнообразия и чувствительности к антибиотикам штаммов сальмонелл, выделенных из различных источников / С.Ш. Рожнова, А.Н. Гусева, О.А. Христюхина, О.Н. Виткова, Н.Е. Крутова // Эпидемиология и инфекционные болезни.– 2017. – № 3. – С. 15-24.
62. Сальмонеллез у детей: учеб. -метод. пособие / Р. Н. Манкевич, Л. И. Матуш, Г. М. Лагир. – Минск: БГМУ, 2017. – 39 с.
63. Скитович, Г.С. Идентификация и антибиотикорезистентность изолятов бактерий рода *Salmonella* / Г.С. Скитович, Н.Б. Шадрова, О.В. Прунтова, К.В. Серова, С.Е. Шмайхель // Ветеринария сегодня. – 2018. – Т. 27, № 4. – С. 3-11.
64. Соловьева А.С. Антибиотикорезистентность штаммов *Salmonella Enteritidis*, выделенных в Дальневосточном и Сибирском федеральном округах / А.С. Соловьева, Ф.Н. Шубин, Н.А. Кузнецова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2017. – Т. 72, № 5. – С. 15–21.
65. Справочник по антимикробной химиотерапии. Выпуск 3. / Под ред. Р.С. Козлова, А.В. Дехнича. – Смоленск: МАКМАХ. – 2013. – 480 с.
66. Стасев, А.Н. Сальмонеллезный эндокардит митрального клапана: клиническое наблюдение / А.Н. Стасев, Н.В. Рутковская, С.Г. Кокорин, Ю.В. Левадин // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2017. – Т. 2, № 6. – С.123-126.
67. Халиуллина, С.В. Антибиотикорезистентность современных возбудителей внебольничных бактериальных кишечных инфекций у детей / С.В. Халиуллина, В.А. Анохин, Е.С. Герасимова, Н.С. Леонтьева, Л.М. Малышева, И.А. Гутор // Практическая медицина. – 2010. – Т. 40, № 1. – С. 85-88.
68. Харитонова, Н.Е. Изучение генетической гетерогенности изолятов *Salmonella* spp., *Shigella* spp., выделенных в очагах групповой и спорадической заболеваемости в Российской Федерации / Н.Е. Харитонова, К.В. Кулешов, С.Ш. Рожнова, О.А. Христюхина, А.Т. Подколзин // Молекулярная диагностика: сб. трудов / Под ред. В.И. Покровского. – 2014. – С. 372-373.

69. Шитова, О.И. Эпидемиологические особенности, биологическая характеристика и чувствительность к антимикробным препаратам сальмонелл, циркулирующих в Пермском крае / О.И. Шитова, А.В. Казьянин, Ю.А. Захарова // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26, № 2(2). – С. 116-120.
70. Яковлев, А.А. Клинические проявления брюшного тифа в Санкт-Петербурге / А.А. Яковлев, А.Н. Коваленко, И.П. Федуняк, М.Д. Сорокина, С.С. Першин // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – № 1. – С. 37-41.
71. Яковлев, А.А. Клинико-лабораторная картина брюшного тифа в мегаполисе / А.А. Яковлев, С.И. Котлярова, Г.Ю. Черенкова, С.С. Першин, Л.А. Кафтырева, В.Б. Мусатов // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2010. – № 2. – С. 27-31.
72. Abouzeed, Y.M. ramR Mutations involved in Efflux-Mediated Multidrug Resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / Y.M. Abouzeed, S. Baucheron, A. Cloeckert / Antimicrob Agents Chemother. – 2008. – Vol. 7(52). – P. 2428-2434.
73. Accou-Demartin, M. *Salmonella enterica* serotype Typhi with Nonclassical Quinolone Resistance Phenotype / M. Accou-Demartin, V. Gaborieau, Y. Song, P. Roumagnac, B. Marchou, M. Achtman, F-X. Weill // Emerg Infect Dis. – 2011. – Vol. 6(17) – P.1091-1094.
74. Achtman, M. Enterica MLST Study Group. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica* / M. Achtman, J. Wain, F-X. Weill, S. Nair, Z. Zhou, V. Sangal, M.G. Krauland, J. L. Hale, H. Harbottle, A. Uesbeck, G. Dougan, L. H. Harrison, S. Brisse // PLoS pathogens. – 2012. – Vol. 6(8) – e1002776.
75. Agersø, Y. Tentative colistin epidemiological cut-off value for *Salmonella* spp. / Y. Agersø, M. Torpdahl, C. Zachariasen, A. Seyfarth, A.M. Hammerum, E.M. Nielsen // Foodborne Pathog. Dis. – 2012. – Vol. 4(9). – P. 367-369.
76. Ahamed, R. Typhoid Fever due to Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Salmonella enterica* serovar Typhi: A Case Report and Literature Review / R. Ahamed, V. Perera, S. Sivakumaran, N. de Silva // Hindawi. Case Reports in Infect Dis. – 2018. – Article ID 4610246.

77. Ahmed, D. *Salmonella enterica* serovar Typhi strain producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases in Dhaka / D. Ahmed, A. Hoque, R. Mazumder, K. Nahar, N. Islam, S.A. Gazi, M.A. Hossain // Bangladesh J Med Microbiol. – 2012. – Vol. 61(7). – P. 1032–1033.
78. Akinyemi, K.O. bla CTX-M-I group extended spectrum beta lactamase-producing *Salmonella* Typhi from hospitalized patients in Lagos, Nigeria / K.O. Akinyemi, B.A. Iwalokun, O.O. Alafe, S.A. Mudashiru, C. Fakorede // Infect Drug Resist. – 2015. – Vol. 8. – P. 99-106.
79. Akinyemi K.O. Occurrence of extended-spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamases in multiple drug resistant *Salmonella* isolates from clinical samples in Lagos, Nigeria / K.O. Akinyemi, B.A. Iwalokun, A.O. Oyefolu, C.O. Fakorede // Infect Drug Resist. – 2017. – Vol. 10. – P. 19-25.
80. Alcock, B.P. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database /B.P. Alcock, A.R. Raphenya, T.T.Y. Lau, K.K. Tsang, M. Bouchard, A. Edalatmand, W. Huynh, A.V. Nguyen, A.A. Cheng, S. Liu, S.Y. Min, A. Miroshnichenko, H.K. Tran, R.E. Werfalli, J.A. Nasir, M. Oloni, D.J. Speicher, A. Florescu, B. Singh, M. Faltyn, A. Hernandez-Koutoucheva, A.N. Sharma, E. Bordeleau, A.C. Pawlowski, H.L. Zubyk, D. Dooley, E. Griffiths, F. Maguire, G.L. Winsor, R.G. Beiko, F.S.L. Brinkman, W.W.L. Hsiao, G.V. Domselaar, A.G. McArthur // Nucleic Acids Res. – 2020. – Vol. 48(D1). – D517-D525.
81. Allard, M.W. High resolution clustering of *Salmonella enterica* serovar Montevideo strains using a next-generation sequencing approach / M.W. Allard, Y. Luo, E. Strain, C. Li, C.E. Keys, I. Son, R. Stones, S.M. Musser, E.W. Brown // BMC Genomics. – 2012. – Vol. 13. – Article 32.
82. Allard, M.W. The Future of Whole-Genome Sequencing for Public Health and the Clinic / M.W. Allard // J Clin Microbiol. – 2016. – Vol. 54(8). – P. 1946-1948.
83. Allard, M.W. Practical Value of Food Pathogen Traceability through Building a Whole-Genome Sequencing Network and Database / M.W. Allard, E. Strain, D.

- Melka, K. Bunning, S.M. Musser, E.W. Brown, R. Timme // *J Clin Microbiol.* – 2016. – Vol. 54(8). – P. 1975-1983.
84. Al Naiemi, N. Extended-spectrum-beta-lactamase production in a *Salmonella enterica* serotype Typhi strain from the Philippines / N. Al Naiemi, B. Zwart, M.C. Rijnsburger, R. Roosendaal, Y.J. Debets Ossenkopp, J.A. Mulder, C.A. Fijen, W. Maten, C.M. Vandenbroucke-Grauls, P.H. Savelkoul // *J Clin Microbiol.* – 2008. – Vol. 46(8). – P. 2794–2795.
85. Als, D. Global Trends in Typhoidal Salmonellosis: A Systematic Review / D. Als, A. Radhakrishnan, P. Arora, M.F. Gaffey, S. Campisi, R. Velummailum, F. Zareef, Z.A. Bhutta // *Am J Trop Med Hyg.* – 2018. – Vol. 99(3). – P. 10–19.
86. Andino, A. *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars / A. Andino, I. Hanning // *Scientific World J.* – 2015. – Vol. 2015. – Article 520179.
87. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars [Электронный ресурс]. – 9th edition. – 2007. – 167 p. – Режим доступа: [https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng\\_0.pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf)
88. Antunes, P. Illegal use of nitrofurans in food animals: Contribution to human salmonellosis? / P. Antunes, J. Machado, L. Peixe // *Clin Microbiol Infect.* – 2006. – Vol. 11(12). – P. 1047-1049.
89. Antunes, P. Salmonellosis: the role of poultry meat / P. Antunes, J. Mourao, J. Campos, L. Peixe // *Clin Microbiol Infect.* – 2016. – Vol. 22(2). – P. 110–121.
90. Area of Technical Uncertainty (ATU) in antimicrobial susceptibility testing [Электронный ресурс] // European Society of Clinical Microbiology and Infectious. – 2018. – 6 p. – Режим доступа: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Area\\_of\\_Technical\\_Uncertainty-guidance\\_2019-1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Area_of_Technical_Uncertainty-guidance_2019-1.pdf)
91. Ashton, P.M. Whole genome sequencing for the retrospective investigation of an outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 8 / P.M. Ashton, T. Peters, L. Ameh, R. McAleer, S. Petrie, S. Nair, I. Muscat, E. de Pinna, T. Dallman // *PLoS Curr.* – 2015. – Vol. 7. – pii currents.outbreaks.2c05a47d292f376afc5a6fcdd8a7a3b6

92. Ashton, P.M. Identification of *Salmonella* for public health surveillance using whole genome sequencing / P.M. Ashton, S. Nair, T.M. Peters, J.A. Bale, D.G. Powell, A. Painset, R. Tewolde, U. Schaefer, C. Jenkins, T.J. Dallman, E.M. de Pinna, K.A. Grant // PeerJ. – 2016. – Vol. 4. – e1752.
93. Baker, S. Fitness benefits in fluoroquinolone-resistant *Salmonella* Typhi in the absence of antimicrobial pressure / S. Baker, P.T. Duy, T.V.T. Nga, T.T.N. Dung, V.V. Phat, T.T. Chau, A.K. Turner, J. Farrar, M.F. Boni // eLife. – 2013. – Vol. 2. – e01229.
94. Baker, S. Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens / S. Baker, N. Thomson, F-X. Weill, K.E. Holt // Science. – 2018. – Vol. 360 (6390). – P.733-738.
95. Bakour, S. Identification of virulence factors and antibiotic resistance markers using bacterial genomics / S. Bakour, S.A. Sankar, J. Rathored, P. Biagini, D. Raoult, P-E. Fournier // Future Microbiol. – 2016. – Vol. 11(3). – P. 455–466.
96. Bale, J. Characterization of new *Salmonella* serovars by whole-genome sequencing and traditional typing techniques / J. Bale, D. Meunier, F-X. Weill, E. de Pinna, T. Peters, S. Nair // J Med Microbiol. – 2016. – Vol. 65(10). – P. 1074-1078.
97. Baltazar, M. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhi, Gulf of Guinea Region, Africa / M. Baltazar, A. Ngandjio, K.E. Holt, E. Lepillet, M. Pardos de la Gandara, J.M. Collard, R. Bercion, A. Nzouankeu, S. Le Hello, G. Dougan, M.C. Fonkoua, F-X. Weill // Emerg Infect Dis. – 2015. – Vol. 21(4). – P. 655-659.
98. Batchelor, M. Characterization of AmpC-mediated resistance in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans during the period 1992 to 2003 in England and Wales / M. Batchelor, K.L. Hopkins, E.J. Threlfall, F.A. Clifton-Hadley, A.D. Stallwood, R.H. Davies, E. Liebana // J Clin Microbiol. – 2005. – Vol. 43(5). – P. 2261–2265.
99. Baucheron, S. Lack of efflux mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A / S. Baucheron, I. Monchaux, S. Le Hello, F-X Weill, A. Cloeckert // Front Microbiol. – 2014. –Vol. 5. – Article 12.

100. Beaubrun, J. Evaluation of a multiplex PCR method to serotype *Salmonella* in animal feeds pre-enrichment broth cultures / J. Beaubrun, L. Ewing, K. Dudley, F. Benhamed, H. Wang, D.E. Hanes // *MethodsX*. – 2017. – Vol. 4. – P. 335–345.
101. Bekal, S. Usefulness of high-quality core genome single-nucleotide variant analysis for subtyping the highly clonal and the most prevalent *Salmonella enterica* serovar Heidelberg clone in the context of outbreak investigations / S. Bekal, C. Berry, A.R. Reimer, G. Van Domselaar, G. Beaudry, E. Fournier, F. Doualla-Bell, E. Levac, C. Gaulin, D. Ramsay, C. Huot, M. Walker, C. Sieffert, C. Tremblay // *J Clin Microbiol*. – 2016. – Vol. 54(2). – P. 289–295.
102. Bengtsson-Palme, J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance / J. Bengtsson-Palme, E. Kristiansson, D.G.J. Larsson // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2018. – Vol. 42(1). – fux053.
103. Bevan, E.R. Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype / E.R. Bevan, A.M. Jones, P.M. Hawkey // *J Antimicrob Chemother.* – 2017. – Vol. 72(8). – P. 2145–2155.
104. Bhatti, J.M. An Unusual Case of Extensively Drug Resistant Typhoid Fever / J.M. Bhatti, Y. Memon, S. Sarfaraz, N. Salahuddin // *Cureus*. – 2019. – Vol. 11(5). – e4664.
105. Bindiganavile Gokul, B.N. ACC-1  $\beta$ -Lactamase– producing *Salmonella enterica* Serovar Typhi, India / B.N. Gokul, A. G. Menezes, B. N. Harish // *Emerg Infect Dis*. – 2010. – Vol. 16(7). – P. 1170-1171.
106. Braun, S.D. Fast DNA Serotyping and Antimicrobial Resistance Gene Determination of *Salmonella enterica* with an Oligonucleotide Microarray-Based Assay / S.D. Braun, A. Ziegler, U. Methner, P. Slickers, S. Keiling, S. Monecke, R. Ehricht // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 10(7). – e46489.
107. Britto, C.D. A systematic review of antimicrobial resistance of typhoidal *Salmonella* in India / C.D. Britto, J. John, V.P. Verghese, A.J. Pollard // *Indian J Med Res*. – 2019. – Vol. 149(2). – P.151–163.
108. Bugarel, M. Molecular detection assay of five *Salmonella* serotypes of public interest: Typhimurium, Enteritidis, Newport, Heidelberg, and Hadar / M. Bugarel,

- A. Tudor, G.H. Loneragan, K.K. Nightingale // *J Microbiol Methods*. – 2017. – Vol. 134. – P. 14-20.
109. Bush, K. Updated functional classification of beta-lactamases / K. Bush, G.A. Jacoby // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2010. – Vol. 54(3). – P. 969–976.
110. Byrne, L. A multi-country outbreak of *Salmonella* Newport gastroenteritis in Europe associated with watermelon from Brazil, confirmed by whole genome sequencing October 2011 to January 2012 / L. Byrne, I. Fisher, T. Peters, A. Mather, N. Thomson, B. Rosner, H. Bernard, P. McKeown, M. Cormican, J. Cowden, V. Aiyedun, C. Lane // *Euro Surveill*. – 2014. – Vol. 19(31). – P. 6–13.
111. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) Annual Report 2013 [Электронный ресурс] // Public Health Agency of Canada, Guelph, Ontario. – Government of Canada. 2015. – Режим доступа: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/surveillance/canadian-integrated-program-antimicrobial-resistance-surveillance-cipars/cipars-reports.html>
112. Capalonga, R. *Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012 / R. Capalonga, R.C. Ramos, J.M.C. Both, M.L.T. Soeiro, S.M. Longaray, S. Haas, E.C. Tondo // *J Infection in developing countries*. – 2014. – Vol. 8. – P. 811-817.
113. Capoor, M.R. Minimum inhibitory concentration of carbapenems and tigecycline against *Salmonella* spp. // M.R. Capoor, D. Nair, J. Posti, S. Singhal, M. Deb, P. Aggarwal, P. Pillai // *J Med Microbiol*. – 2009. – Vol. 58(3). – P. 337-341.
114. Carattoli, A. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998 / A. Carattoli, F. Tosini, W.P. Giles, M.E. Rupp, S.H. Hinrichs, F.J. Angulo, T.J. Barrett, P.D. Fey // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2002. – Vol. 46(5). – P. 1269–72.
115. Carattoli, A. Animal reservoirs for extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers / A. Carattoli // *Clin Microbiol Infect*. – 2008. – Vol. 14(1). – P.117-123.
116. Castellanos, L.R. Genomic Characterization of Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Salmonella enterica* in the Colombian Poultry Chain / L.R.



- Castllanos, L. Graaf-van Bloois, P. Donado-Godoy, M. León, V. Clavijo, A. Arévalo, J.F. Bernal, D.J. Mevius, J.A. Wagenaar, A. Zomer, J. Hordijk // *Front Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – Article 2431.
117. Cattoir, V. Prevalence of qnr genes in *Salmonella* in France / V. Cattoir, F-X. Weill, L. Poirel, L. Fabre, C.J. Soussy, P. Nordmann // *J Antimicrob Chemother.* – 2007. – Vol. 59(4). – P.751-754.
118. Cavaco, L.M. qnrD, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance+ in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin / L. M. Cavaco, H. Hasman, S. Xia, F.M. Aarestrup // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53(2). – P. 603-608.
119. CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Surveillance Report for 2015 (Final Report) [Электронный ресурс] // Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services. – CDC. – 2018. – Режим доступа: [https://www.cdc.gov/narms/pdf/2015-NARMS-Annual-Report-cleared\\_508.pdf](https://www.cdc.gov/narms/pdf/2015-NARMS-Annual-Report-cleared_508.pdf)
120. CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) Now: Human Data. Atlanta, Georgia: U.S [Электронный ресурс] // Department of Health and Human Services. – CDC. – 2019. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/narmsnow>
121. CDC. National *Salmonella* Surveillance Annual Report, 2016 [Электронный ресурс] // Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. – CDC. – 2018. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/2016-Salmonella-report-508.pdf>
122. Centers for Disease Control and Prevention [Электронный ресурс] // *Yellow Book*, 2020. – Chapter 2. – Travelers' Diarrhea. – Режим доступа: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/preparing-international-travelers/travelers-diarrhea#5437>.
123. Chatman-Stephens, K. Emergence of Extensively Drug-Resistant *Salmonella* Typhi Infections Among Travelers to or from Pakistan – United states, 2016-2018 / K. Chatman-Stephens, F. Medalla, M. Hughes, G. D. Appiah, R.D. Aubert, H.

- Caidi, K. M. Angelo, A. T. Walker, N. Hatley, S. Masani, J. Nash, J. Belko, E. T. Ryan, E. Mintz, C.R. Friedman // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* – 2019. – Vol. 68(1). – P.11-13.
124. Chau, T.T. Antimicrobial drug resistance of *Salmonella enterica* serovar typhi in Asia and molecular mechanism of reduced susceptibility to the fluoroquinolones / T.T. Chau, J.I. Campbell, C.M. Galindo, N. Van Minh Hoang, T.S. Diep, T.T. Nga, N. Van Vinh Chau, P.Q. Tuan, A.L. Page, R.L. Ochiai, C. Schultsz, J. Wain, Z.A. Bhutta, C.M. Parry, S.K. Bhattacharya, S. Dutta, M. Agtini, B. Dong, Y. Honghui, D.D. Anh, D.G. Canh, A. Naheed, M.J. Albert, R. Phetsouvanh, P.N. Newton, B. Basnyat, A. Arjyal, T.T. La, N.N. Rang, L.T. Phuong, P. Van Be Bay, L. von Seidlein, G. Dougan, J.D. Clemens, H. Vinh, T.T. Hien, N.T. Chinh, C.J. Acosta, J. Farrar, C. Dolecek // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2007. – Vol. 51(12). – P. 4315-4323.
125. Chen, C.Y. Molecular epidemiology of the emerging ceftriaxone resistant non-typhoidal *Salmonella* in southern Taiwan / C.Y. Chen, P.H. Hsieh, C.Y. Chang, S.T. Yang, Y.H. Chen, K. Chang, P.L. Lu // *J Microbiol Immunol Infect.* – 2018. – Vol. 52(2). – P. 289-296.
126. Chen, Y. Efflux Pump Overexpression Contributes to Tigecycline Heteroresistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / Y. Chen, D. Hu, Q. Zhang, X-P. Liao, Y-H. Liu, J. Sun // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2017. – Vol. 7. – Article 37.
127. Cloeckaert, A. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella* / A. Cloeckaert, E. Chaslus-Dancla // *Vet Res.* – 2001. – Vol. 32(3-4). – P. 291-300.
128. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. – 29th ed. – CLSI supplement M100. Wayne, PA // Clinical Laboratory Standards Institute. – 2019.
129. Crim, S. *Salmonella enterica* serotype Newport infections in the US, 2004–2013: increased incidence investigated through four surveillance systems / S. Crim, S. Chai, B. Karp, M. Judd, J. Reynolds, K. Swanson, A. Nisler, A. McCullough, H. Gould // *Foodborne Pathog Dis.* – 2018. – Vol. 15(10). – P. 612-620.

130. Crump, J.A. The global burden of typhoid fever / J.A. Crump, S.P. Luby, E.D. Mintz // *Bull World Health Organ.* – 2004. – Vol. 82. – P. 346-353.
131. Crump, J.A. Clinical response and outcome of infection with *Salmonella enterica* serotype Typhi with decreased susceptibility to fluoroquinolones: a United States FoodNet multicentre retrospective study / J.A. Crump, K. Kretsinger, K. Gay, R.M. Hoekstra, D.J. Vugia, S. Hurd, S.D. Segler, M. Megginson, L.J. Luedeman, B. Shiferaw, S.S. Hanna, K.W. Joyce, E.D. Mintz, F.J. Angulo // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2008. – Vol. 52(4). – P. 1278–1284.
132. Crump, J.A. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections / J.A. Crump, M. Sjölund-Karlsson, M.A. Gordon, C.M. Parry // *Clin Microbiol Rev.* – 2015. – Vol. 28(4). – P. 901-937.
133. Dahiya, S. Multiple locus sequence typing of *Salmonella* Typhi, isolated in north India-a preliminary study / S. Dahiya, A. Kapil, R. Kumar, B.K. Das, S. Sood, R. Chaudhry, S.K. Kabra, R.K. Lodha // *Indian J Med Res.* – 2013. – Vol. 137(5). – P. 957–962.
134. Dallenne, C. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae / C. Dallenne, A. Da Costa, D. Decré, C. Favier, G. Arlet // *J Antimicrob Chemother.* – 2010. – Vol. 65(3). – P. 490-495.
135. Dallman, T. SnapperDB: a database solution for routine sequencing analysis of bacterial isolates / T. Dallman, P. Ashton, U. Schafer, A. Jironkin, A. Painset, S. Shaaban, H. Hartman, R. Myers, A. Underwood, C. Jenkins, K. Grant // *Bioinformatics.* –2018. – Vol. 34(17). – P. 3028-3029.
136. Das, S. Molecular Subtyping of *Salmonella enterica* Serovar Typhi by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis in India: Their Association with Antimicrobial Resistance Profiles./ S. Das, S. Samajpati, I. Roy, S. Sankar, R. Gaiind, M. Deb, R. Kulkarni, D.K. Paul, S. Dutta // *Jpn J Infect Dis.* –2017. – Vol. 70(5). – P. 536-543.

137. den Bakker H.C. Rapid whole-genome sequencing for surveillance of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis / H.C. den Bakker, M.W. Allard, D. Bopp, E.W. Brown, J. Fontana, Z. Iqbal, A. Kinney, R. Limberger, K.A. Musser, M. Shudt, E. Strain, M. Wiedmann, W.J. Wolfgang // *Emerg Infect Dis.* – 2014. – Vol. 20(8). – P.1306–1314.
138. Deng, X. Comparative analysis of subtyping methods against a whole-genome-sequencing standard for *Salmonella enterica* serotype Enteritidis / X. Deng, N. Shariat, E.M. Driebe, C.C. Roe, B. Tolar, E. Trees, P. Keim, W. Zhang, E.G. Dudley, P.I. Fields, D.M. Engelthaler // *J Clin Microbiol.* – 2015. – Vol. 53(1). – P. 212–218.
139. Denny, J. Multinational *Salmonella* Paratyphi B variant Java (*Salmonella* Java) outbreak, August – December 2007 / J. Denny, J. Threlfall, J. Takkinen, S. Löfdahl, T. Westrell, C. Varela, B. Adak, N. Boxall, S. Ethelberg, M. Torpdahl, M. Straetemans, W. van Pelt // *Euro Surveill. Weekly releases (1997–2007).* – 2007. – Vol. 12. – Article 3332.
140. Derek, F. J. Mechanism of nitrofurantoin resistance in *Salmonella* Enteritidis Phage type 4 and interpretation of nitrofurantoin susceptibility tests / F. J. Derek, A. Brown, R. Upson, P. Brenwald Nigel, A. Rampling // *J Antimicrob Chemother.* – 1991. – Vol. 27(1). – P. 23–28.
141. Desenclos, J.C. Large outbreak of *Salmonella enterica* serotype paratyphi B infection caused by a goats' milk cheese, France, 1993: a case finding and epidemiological study [Электронный ресурс] / J.C. Desenclos, P. Bouvet, E. Benz-Lemoine, F. Grimont, H. Desqueyroux, I. Rebire, P. A. Grimont // *BMJ (Clinical research ed.)*. – 2006. – P. 312. – Режим доступа: <http://www.biomedsearch.com/nih/Large-outbreak-Salmonella-enterica-serotype/8555937.html>
142. Dimitrov, T. Ciprofloxacin-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhi from Kuwait with Novel Mutations in *gyrA* and *parC* Genes / T. Dimitrov, A.A. Dashti, O. Albaksami, E.E. Udo, M.M. Jadaon, M.J. Albert // *J Clin Microbiol.* – 2009. – Vol. 47(1). – P. 208-211.
143. Dolecek, C. A multi-center randomised controlled trial of gatifloxacin versus azithromycin for the treatment of uncomplicated typhoid fever in children and adults in Vietnam/ C. Dolecek, T.P. Tran, N.R. Nguyen, T.P. Le, V. Ha, Q.T. Phung, C.D.

- Doan, T.B. Nguyen, T.L. Duong, B.H. Luong, T.B. Nguyen, T.A. Nguyen, N.D. Pham, N.L. Mai, V.B. Phan, A.H. Vo, V.M. Nguyen, T.T. Tran, T.C. Tran, C. Schultsz, S.J. Dunstan, K. Stepniewska, J.I. Campbell, S.D. To, B. Basnyat, V.V. Nguyen, V.S. Nguyen, T.C. Nguyen, T.H. Tran, J. Farrar // PLoS One. – 2008. – Vol. 3. – e2188.
144. Du, X.D. Tn1548-associated *armA* is co-located with *qnrB2*, *aac(6')-Ib-cr* and *blaCTX-M-3* on an IncFII plasmid in a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B strain isolated from chickens in China/ X.D. Du, D.X. Li, G.Z. Hu, Y.Wang, Y.H. Shang, C.M. Wu, H.B. Liu, X.S. Li // J Antimicrob Chemother. – 2012. – Vol. 67(1). – P. 246-248.
145. Dunbar, S.A. Luminex(®) multiplex bead suspension arrays for the detection and serotyping of *Salmonella* spp / S.A. Dunbar, V.B. Ritchie, M.R. Hoffmeyer, G.S. Rana, H. Zhang // In H. Schatten, A. Eisenstark (eds) *Salmonella*. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol. 1255 – New York, NY, 2015. – 301 pp. – P. 1-27.
146. Dunne, E.F. Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC beta-lactamase / E.F. Dunne, P.D. Fey, P. Kludt, R. Reporter, F. Mostashari, P. Shillam, J. Wicklund, C. Miller, B. Holland, K. Stamey, T.J. Barrett, J.K. Rasheed, F.C. Tenover, E.M. Ribot, F.J. Angulo // JAMA. – 2000. – Vol. 284(24). – P. 3151–3156.
147. Dutta, S. Antimicrobial Resistance, Virulence Profiles and Molecular Subtypes of *Salmonella enterica* Serovars Typhi and Paratyphi A Blood Isolates from Kolkata, India during 2009-2013 / S. Dutta, S. Das, U. Mitra, P. Jain, I. Roy, P. Dutta, D.K. Paul // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9(8). – e101347.
148. Dyson, Z.A. Antibiotic Resistance and Typhoid / Z.A. Dyson, E.J. Klemm, S. Palmer, G. Dougan // Clin Infect Dis. – 2019. – Vol. 68(2). – P. S165–S170.
149. Eaves, D.J. Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica* / D.J. Eaves, A.P. White, D.T. Gray, A.

- Buckley, M.J. Woodward, L.J. Piddock // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48(10). – P. 4012-4015.
150. ECDC strategic framework for the integration of molecular and genomic typing into European surveillance and multi-country outbreak investigations 2019–2021 [Электронный ресурс] // Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control. – 2019. – Режим доступа: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/framework-for-genomic-surveillance.pdf>
151. Edelstein, M. Multiple outbreaks of nosocomial salmonellosis in Russia and Belarus caused by a single clone of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium producing an extended-spectrum beta-lactamase / M. Edelstein, M. Pimkin, L. Stratchunski, N. Kozlova, D. Gladin, T. Dmitrachenko, V. Semenov, A. Baraniak // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48(8). – P. 2808–2815.
152. Effa, E.E. Azithromycin for treating uncomplicated typhoid and paratyphoid fever (enteric fever)/ E.E. Effa, H. Bukirwa // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2011. – Vol. 10. – CD006083.
153. Effa, F.Q. Fluoroquinolones for treating typhoid and paratyphoid fever (enteric fever) / F.Q. Effa, E.E. Effa, Z.S. Lassi, J.A. Critchley, P. Garner, D. Sinclair, P.L. Olliaro, Z.A. Bhutta // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2011. – Vol. 10. – CD004530.
154. EFSA and ECDC technical report on the collection and analysis of whole genome sequencing data from food-borne pathogens and other relevant microorganisms isolated from human, animal, food, feed and food/feed environmental samples in the joint ECDC–EFSA molecular typing database [Электронный ресурс] / I. Van Walle, B. Guerra, V. Borges, J.A. Carriço, G. Cochrane, T. Dallman, E. Franz, R. Karpíšková, E. Litrup, M-Y. Mistou, S. Morabito, J. Mossong, E. Alm, F. Barrucci, C. Bianchi, G. Costa, S. Kotila, I. Mangone, D. Palm, L. Pasinato, J. Revez, M. Struelens, D. Thomas-López, V. Rizzi // EFSA supporting publication. – 019. – 92 pp. – Режим доступа: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/food-borne-pathogens-collection-analysis-whole-genome-sequencing-data.pdf>
155. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains

- [Электронный ресурс] // EFSA Journal. –2010. –Vol. 8(10). – P. 1826. – Режим доступа: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2010.1826>
156. Espié, E. An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections linked to the consumption of imported horse meat in France / E. Espié, H. de Valk, V. Vaillant, N. Quelquejeu, F. Le Querrec, F-X. Weill // *Epidemiol Infect.* – 2005. – Vol. 133(2). – P. 373–376.
157. European EU protocol for harmonized monitoring of antimicrobial resistance in human *Salmonella* and *Campylobacter* isolates [Электронный ресурс] // European centre for Disease Prevention and Control. – Stockholm: ECDC. – 2016. – Режим доступа: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-Salmonella-Campylobacter-harmonised-monitoring.pdf>
158. EUCAST Expert rules, intrinsic resistance and exceptional phenotypes v 3.1 [Электронный ресурс]. – 2016. – Режим доступа: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Expert\\_Rules/Expert\\_rules\\_intrinsic\\_exceptional\\_V3.1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/Expert_rules_intrinsic_exceptional_V3.1.pdf)
159. European Centre for Disease Prevention and Control. Eighth external quality assessment scheme for *Salmonella* typing [Электронный ресурс]. – Stockholm. – ECDC. – 2018. – Режим доступа: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/eighth-external-quality-assessment-scheme-salmonella-typing>
160. European Centre for Disease Prevention and Control. Typhoid and paratyphoid fevers. In: ECDC [Электронный ресурс] // Annual epidemiological report for 2016. – Stockholm. – ECDC. – 2018. – Режим доступа: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/typhoid-and-paratyphoid-fevers-annual-epidemiological-report-2016>
161. European Centre for Disease Prevention and Control/ European Food Safety Authority. Multi-country outbreak of *Salmonella* Agona possibly linked to ready-to-eat food [Электронный ресурс] // Stockholm and Parma: European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. – 2018. – Режим доступа: [https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/2018\\_07\\_ECDC-EFSA\\_ROA\\_%20UI-478\\_%20S\\_Agona\\_UK.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/2018_07_ECDC-EFSA_ROA_%20UI-478_%20S_Agona_UK.pdf)

162. European Centre for Disease Prevention and Control. Salmonellosis [Электронный ресурс] // Annual epidemiological report for 2016. – Stockholm: ECDC. – 2019. – Режим доступа: [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER\\_for\\_2016-salmonellosis.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2016-salmonellosis.pdf)
163. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [Электронный ресурс] // European Society of Clinical Microbiology and Infectious. – 2020. – Режим доступа: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
164. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. MIC distributions and epidemiological cut-off value (ECOFF) setting, EUCAST SOP 10.0 [Электронный ресурс]. – 2017. – 17 pp. Режим доступа: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/EUCAST\\_SOPs/EUCAST\\_SOP\\_10.0\\_MIC\\_distributions\\_and\\_epidemiological\\_cut-off\\_value\\_\\_ECOFF\\_\\_setting\\_20171117.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_SOPs/EUCAST_SOP_10.0_MIC_distributions_and_epidemiological_cut-off_value__ECOFF__setting_20171117.pdf)
165. Fernández, J. Resistance to Carbapenems in Non-Typhoidal *Salmonella enterica* Serovars from Humans, Animals and Food / J. Fernández, B. Guerra, M.R. Rodicio // Veterinary sciences. – Vol. 5(2). – E40.
166. Fernandez-Cuesta, Quick, J. Rapid draft sequencing and real-time nanopore sequencing in a hospital outbreak of *Salmonella* / J. Quick, P. Ashton, S. Calus, C. Chatt, S. Gossain, J. Hawker, S. Nair, K. Neal, K. Nye, T. Peters, E. De Pinna, E. Robinson, K. Struthers, M. Webber, A. Catto, T.J. Dallman, P. Hawkey, N.J. Loman // Genome Biology. – 2015. – Vol. 16. – Article 114.
167. Ferrari, R.G. Phenotypic and Genotypic Eligible Methods for *Salmonella* Typhimurium Source Tracking / R.G. Ferrari, P.H.N Panzenhagen, CA Conte-Junior // Front Microbiol. – 2017. – Vol. 8. – Article 2587.
168. Fonteneau, L. Multinational outbreak of travel-related *Salmonella* Chester infections in Europe, summers 2014 and 2015 / L. Fonteneau, Da Silva N. Jourdan, L. Fabre, P. Ashton, M. Torpdahl, L. Müller, B. Bouchrif, A. El Boulani, E. Valkanou, W. Mattheus, I. Friesema, S. Herrera Leon, C. Varela Martínez, J. Mossong, E. Severi, K. Grant, F-X. Weill, C.M. Gossner, S. Bertrand, T. Dallman, S. Le Hello // Euro Surveill. – 2017. – Vol. 22(7). – Article 30463.



169. Francisco, M. First report on antimicrobial resistance and molecular characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhi isolated from human specimens in Luanda, Angola / M. Francisco, S.S. Costa, A. Belas, J. Ramos, I. Couto, C. Pomba, M. Viveiros // *J Antimicrob Chemother.* – 2018. – Vol. 13. – P. 246-249.
170. Franklin K. Rapid genoserotyping tool for classification of *Salmonella* serovars / K. Franklin, E.J. Lingohr, C. Yoshida, M. Anjum, L. Bodrossy, C.G. Clark, A.M. Kropinski, M.A. Karmali // *J Clin Microbiol.* – 2011. – Vol. 49(8). – P. 2954–2965.
171. Franz, E. Significance of whole genome sequencing for surveillance, source attribution and microbial risk assessment of foodborne pathogens / E. Franz, L.M. Gras, T. Dallman // *Curr Opin Food Sci.* – 2016. – Vol. 8. – P. 74–79.
172. Frye, J.G. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals / J.G. Frye, C.R. Jackson // *Front Microbiol.* – 2013. – Vol. 4. – Article 135.
173. García-Fernández, A. Emergence of Ciprofloxacin-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhi in Italy / A. García-Fernández, S. Gallina, S. Owczarek, A.M. Dionisi, I. Benedetti, L. Decastelli, I. Luzzi // *Public Library of Science.* – 2015. – Vol. 10(6). – e0132065.
174. Gay, K. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Non-Typhi Serotypes of *Salmonella enterica* / K. Gay, A. Robicsek, J. Strahilevitz, C.H. Park, G. Jacoby, T.J. Barrett, F. Medalla, T.M. Chiller, D.C. Hooper // *Clin Infect Dis.* – 2006. – Vol. 43(3). – P. 297-304.
175. Geetha, V.K. Plasmid-mediated quinolone resistance in typhoidal *Salmonellae*: a preliminary report from South India / V.K. Geetha, T. Yugendran, R. Srinivasan, B.N. Harish // *Indian J Med Microbiol.* – 2014. – Vol. 32(1). – P. 31–34.
176. General Consultation on “Considerations in the numerical estimation of epidemiological cutoff (ECOFF) values” [Электронный ресурс] // *European Society of Clinical Microbiology and Infectious.* – 2018. – 10 p. – Режим доступа: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Consultation/2018/ECOFF\\_procedure\\_2018\\_General\\_Consultation\\_20180531.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/2018/ECOFF_procedure_2018_General_Consultation_20180531.pdf)

177. Glenn, L.M. Antimicrobial resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from animals, retail meats, and humans in the United States and Canada / L.M. Glenn, R.L. Lindsey, J.P. Folster, G. Pecic, P. Boerlin, M.W. Gilmour, H. Harbottle, S. Zhao, P.F. McDermott, P.J. Fedorka-Cray, J.G. Frye // *Microbial Drug Resistance*. – 2013. – Vol. 19(3). – P.175–184.
178. González-López, J. ESBL-producing *Salmonella enterica* serovar Typhi in traveler returning from Guatemala to Spain/ J. González-López, N. Piedra-Carrasco, F. Salvador, V. Rodríguez, A. Sánchez-Montalvá, A.M. Planes, I. Molina, M.N. Larrosa // *Emerg Infect Dis*. – 2014. – Vol. 20(1). – P.1918-1920.
179. Guarino, A. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases Evidence-Based Guidelines for the Management of Acute Gastroenteritis in Children in Europe: update 2014 / A. Guarino, S. Ashkenazi, D. Gendrel, A.L. Vecchio, R. Shamir, H. Szajewska // *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. – 2014. – Vol. 59(1). – P. 132–152.
180. Gul, D. Draft Genome Sequence of a *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strain Resistant to Fourth-Generation Cephalosporin and Fluoroquinolone Antibiotics / D. Gul, R.F. Potter, H. Riaz, S.T. Ashraf, M.A. Wallace, T. Munir, A. Ali, C.A. Burnham, G. Dantas, S. Andleeb // *Genome Announc*. – 2017. – Vol. 5(42). – e00850-17.
181. Guo, D. Development of a DNA microarray for molecular identification of all 46 *Salmonella* O serogroups / D. Guo, B. Liu, F. Liu, B. Cao, M. Chen, X. Hao, L. Feng, L. Wang // *Appl Environ Microbiol*. – 2013. – Vol. 79(11). – P. 3392–3399.
182. Gupta, A. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins in the United States / A. Gupta, J. Fontana, C. Crowe, B. Bolstorff, A. Stout, S. Van Duyne, M.P. Hoekstra, J.M. Whichard, T.J. Barrett, F.J. Angulo // *J Infect Dis*. – 2003. – Vol. 188(11). – P. 1707–1716.
183. Gupta, R. Characterization of non-classical quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi: Report of a novel mutation in *gyrB* gene and diagnostic challenges / R. Gupta, R. Gaiind, J. Wain, M. Deb, L.C. Singh, S.F. Basir // *Biomolecular Detection and Quantification*. – 2015. – Vol. 2. – P. 30-34.

184. Gympøse, P. Investigation of Outbreaks of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Its Monophasic Variants Using Whole-Genome Sequencing, Denmark / P. Gympøse, G. Sørensen, E. Litrup, J.E. Olsen, E.M. Nielsen, M. Torpdahl // *Emerg Infect Dis.* – 2017. – Vol. 23(10). – P. 1631–1639.
185. Harvey, R.R. Epidemiology of *Salmonella enterica* Serotype Dublin Infections among Humans, United States, 1968-2013 / R.R. Harvey, C.R. Friedman, S.M. Crim, M. Judd, K.A. Barrett, B. Tolar, J.P. Folster, P.M. Griffin, A.C. Brown // *Emerg Infect Dis.* – 2017. – Vol. 23(9). – P. 1493–1501.
186. Hawkey, J. Global phylogenomics of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 / J. Hawkey, S. Le Hello, B. Doublet, S.A. Granier, R.S. Hendriksen, W.F. Fricke, P.J. Ceysens, C. Gomart, H. Billman-Jacobe, K.E. Holt, F.X. Weill // *Microbial genetics.* – 2019. – Vol. 5(7). – e000269.
187. Hendriksen, R.S. WHO Global Salm-Surv external quality assurance system for serotyping of *Salmonella* isolates from 2000 to 2007 / R.S. Hendriksen, R. Mikoleit, V.P. Carlson, S. Karlslose, A.R. Vieira, A.B. Jensen, A.M. Seyfarth, S.M. DeLong, F-X. Weill, D.M. Lo Fo Wong, F.J. Angulo, H.C. Wegener, F.M. Aarestrup // *J Clin Microbiol.* – 2009. – Vol. 47(9). – P. 2729–2736.
188. Hendriksen, R.S. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007 / R.S. Hendriksen, A.R. Vieira, S. Karlslose, D.M. Lo Fo Wong, A.B. Jensen, H.C. Wegener, F.M. Aarestrup // *Foodborne Pathog Dis.* – 2011. – Vol. 8(8). – P. 887–900.
189. Hendriksen, R.S. Genomic signature of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhi isolates related to a massive outbreak in Zambia between 2010 and 2012 / R.S. Hendriksen, P. Leekitcharoenphon, O. Lukjancenko, C. Lukwesa-Musyani, B. Tambatamba, J. Mwaba, A. Kalonda, R. Nakazwe, G. Kwenda, J.D. Jensen, C.A. Svendsen, K.K. Dittmann, R.S. Kaas, L.M. Cavaco, F.M. Aarestrup, H. Hasman, J.C. Mwansa // *J Clin Microbiol.* – 2015. – Vol. 53(1). – P. 262–272.
190. Hendriksen, R.S. Genomic dissection of travel-associated extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar typhi isolates originating from

- the Philippines: a one-off occurrence or a threat to effective treatment of typhoid fever / R.S. Hendriksen, P. Leekitcharoenphon, M. Mikoleit, J.D. Jensen, R.S. Kaas, L. Roer, H.B. Joshi, S. Pornruangmong, C. Pulsrikarn, G. D. Gonzalez-Aviles, E.A. Reuland, N. Al Naiemi, A.L. Wester, F.M. Aarestrup, H. Hasman // *J Clin Microbiol.* – 2015. – Vol. 53(2). – P. 677-680.
191. Herrera-Leo'n, S. Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of *Salmonella* / S. Herrera-Leo'n, J.R. McQuiston, M.A. Usera, P.I. Fields, J. Garaizar, M.A. Echeita // *J Clin Microbiol.* – 2004. – Vol. 42(6). – P. 2581-2586.
192. Heymans, R. Rapid detection and differentiation of *Salmonella* species, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by multiplex quantitative PCR / R. Heymans, A. Vila, C.A.M. van Heerwaarden, C.C.C. Jansen, G.A.A. Castelijm, M. van der Voort, E.G. Biesta-Peters // *PLOS One.* – 2018. – Vol. 13(10). – e0206316.
193. Hindermann, D. *Salmonella enterica* serovar Infantis from Food and Human Infections, Switzerland, 2010-2015: Poultry-Related Multidrug Resistant Clones and an Emerging ESBL Producing Clonal Lineage / D. Hindermann, G. Gopinath, H. Chase, F. Negrete, D. Althaus, K. Zurfluh, B.D. Tall, R. Stephan, M. Nüesch-Inderbinen // *Front Microbiol.* – 2017. – Vol. 8. – Article 1322.
194. Hoffmann, M. Tracing origins of the *Salmonella* Bareilly strain causing a food-borne outbreak in the United States / M. Hoffmann, Y. Luo, S.R. Monday, N. Gonzalez-Escalona, A.R. Ottesen, T. Muruvanda, C. Wang, G. Kastanis, C. Keys, D. Janies, I.F. Senturk, U.V. Catalyurek, H. Wang, T.S. Hammack, W.J. Wolfgang, D. Schoonmaker-Bopp, A. Chu, R. Myers, J. Haendiges, P.S. Evans, J. Meng, E.A. Strain, M.W. Allard, E.W. Brown // *J Infect Dis.* – 2013. – Vol. 213(4). – P. 502–508.
195. Holt, K.E. High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi / K.E. Holt, J. Parkhill, C.J. Mazzoni, P. Roumagnac, F-X. Weill, I. Goodhead, R. Rance, S. Baker, D.J. Maskell, J. Wain, C. Dolecek, M. Achtman, G. Dougan // *Nature Genetics.* – 2008. – Vol. 40(8). – P. 987-993.
196. Holt, K.E. Emergence of a globally dominant IncHI1 plasmid type associated with multiple drug resistant typhoid / K. E. Holt, M.D. Phan, S. Baker, P.T. Duy,

- T.V. Nga, S. Nair, A.K. Turner, C. Walsh, S. Fanning, S. Farrell-Ward, S. Dutta, S. Kariuki, F-X. Weill, J. Parkhill, G. Dougan, J. Wain // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2011. – Vol. 5(7). – e1245.
197. Hombach, M. Standardisation of disk diffusion results for antibiotic susceptibility testing using the sirscan automated zone reader / M. Hombach, R. Zbinden, E.C. Bottger // *BMC Microbiol.* – 2013. – Vol. 13. – Article 225.
198. Hombach, M. The critical influence of the intermediate category on interpretation errors in revised EUCAST and CLSI antimicrobial susceptibility testing guidelines / M. Hombach, E.C. Böttger, M. Roos // *Clin Microbiol Infect.* – 2013. – Vol. 19(2). –e5971.
199. Hombach, M. Relative contribution of biological variation and technical variables to zone diameter variations of disc diffusion susceptibility testing / M. Hombach, C. Ochoa, F.P. Maurer, T. Pfiffner, E.C. Bottger, R. Furrer // *J Antimicrob Chemother.* – 2016. – Vol. 71(1). – P. 141-151.
200. Hopkins, K.L. Stability of multiple-locus variable-number tandem repeats in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / K.L. Hopkins, C. Maguire, E. Best, E. Liebana, E.J. Threlfall // *J Clin Microbiol.* – 2007. – Vol. 45(9). – P. 3058–3061.
201. Hopkins, K.L. Standardisation of multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) for subtyping of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis / K.L. Hopkins, T.M. Peters, E. de Pinna, J. Wain // *Euro Surveill.* – 2011. – Vol. 16(32). – Article 19942.
202. Hoszowski, A. Fifteen years of successful spread of *Salmonella enterica* serovar Mbandaka clone ST413 in Poland and its public health consequences / A. Hoszowski, M. Zając, A. Lalak, P. Przemysk, D. Wasyl // *Annals Agricult Environ Medicine.* – 2016. – Vol. 23(2). – P. 237-241.
203. Ibrahim, G.M. *Salmonella* Serotyping Using Whole Genome Sequencing / G.M. Ibrahim, P.M. Morin // *Front Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – Article 2993.
204. Inns, T. Prospective use of whole genome sequencing (WGS) detected a multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis / T. Inns, P.M. Ashton, S. Herrera-Leon, J. Lighthill, S. Foulkes, T. Jombart, Y. Rehman, A. Fox, T. Dallman, E. De Pinna,

- L. Browning, J.E. Coia, O. Edeghere, R. Vivancos // *Epidemiology and Infection*. – 2017. – Vol. 145(2). – P. 289–298.
205. Issenhuth-Jeanjean, S. Supplement 2008– 2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le minor scheme / S. Issenhuth-Jeanjean, P. Roggentin, M. Mikoleit, M. Guibourdenche, E. de Pinna, S. Nair, P.I. Fields, F-X. Weill // *Research in Microbiol.* – 2015. – Vol. 165(7). – P. 526–530.
206. Jacoby, G.A. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance / G.A. Jacoby, J. Strahilevitz, D.C. Hooper // *Microbiology Spectrum*. – 2014. – Vol. 2(5). – PLAS-0006-2013.
207. Jeon, H.Y. Characteristics of cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates from poultry in Korea, 2010–2017 / H.Y. Jeon, Y.B. Kim, S.K. Lim, Y.J. Lee, K.W. Seo // *Poultry Science*. – 2019. – Vol. 98(2). – Article 957.
208. Jourdan-da Silva, N. Ongoing nationwide outbreak of *Salmonella* Agona associated with internationally distributed infant milk products, France, December 2017 / N. Jourdan-da Silva, L. Fabre, E. Robinson, N. Jourdan-da Silva, L. Fabre, E. Robinson, N. Fournet, A. Nisavanh, M. Bruyand, A. Mailles, E. Serre, M. Ravel, V. Guibert, S. Issenhuth-Jeanjean, C. Renaudat, M. Tourdjman, A. Septfonds, H. de Valk, S. Le Hello // *Euro Surveill.* – 2018. – Vol. 23(2). – Article 17-00852.
209. Jure, M.A. Emergence of KPC-2-Producing *Salmonella enterica* Serotype Schwarzengrund in Argentina / M.A. Jure, M. Duprilot, H.E. Musa, C. López, M.C. de Castillo, F-X. Weill, G. Arlet, D. Decré // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2014. – Vol. 58(10). – P. 6335-6336.
210. Kariuki, S. Typhoid in Kenya is associated with a dominant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi haplotype that is also widespread in Southeast Asia / S. Kariuki, G. Revathi, J. Kiiru, D.M. Mengo, J. Mwituria, J. Muyodi, A. Munyalo, Y.Y. Teo, K.E. Holt, R.A. Kingsley, G. Dougan // *J Clin Microbiol.* – 2010. – Vol. 48(6). – P. 2171–2176.
211. Karki M. Cotrimoxazole treats fluoroquinolone-resistant *Salmonella* Typhi H58 infection / M. Karki, S. Pandit, S. Baker, B. Basnyat // *BMJ Case Reports*. – 2016. – bcr2016217223.

212. Katz, L.S. A Comparative Analysis of the Lyve-SET Phylogenomics Pipeline for Genomic Epidemiology of Foodborne Pathogens / L.S. Katz, T. Griswold, A.J. Williams-Newkirk, D. Wagner, A. Petkau, C. Sieffert, G. Van Domselaar, X. Deng, H.A. Carleton // *Front Microbiol.* – 2017. – Vol. 8. – Article 375.
213. Keddy, K.H. Fluoroquinolone-Resistant Typhoid, South Africa / K.H. Keddy, A.M. Smith, A. Sooka, H. Ismail, S. Oliver // *Emerg Infect Dis.* – 2010. – Vol. 16(5). – P. 879–880.
214. Kidgell, C. *Salmonella* Typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old / C. Kidgell, U. Reichard, J. Wain, B. Linz, M. Torpdahl, G. Dougan, M. Achtman // *Infection, Genetics and Evolution.* – 2002. – Vol. 2(1). – P. 39–45.
215. Klemm, E.J. Emergence of an extensively drug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi clone harboring a promiscuous plasmid encoding resistance to fluoroquinolones and third-generation cephalosporins / E.J. Klemm, S. Shakoor, A.J. Page, F.N. Qamar, K. Judge, D.K. Saeed, V.K. Wong, T.J. Dallman, S. Nair, S. Baker, G. Shaheen, S. Qureshi, M.T. Yousafzai, M.K. Saleem, Z. Hasan, G. Dougan, R. Hasan // *MBio.* – 2018. – Vol. 9(1). – pii: e00105-18. doi: 10.1128/mBio.00105-18.
216. Koirala, S. Gatifloxacin Versus Ofloxacin for the Treatment of Uncomplicated Enteric Fever in Nepal: An Open-Label, Randomized, Controlled Trial / S. Koirala, B. Basnyat, A. Arjyal, O. Shilpakar, K. Shrestha, R. Shrestha, U.M. Shrestha, K. Agrawal, K.D. Koirala, S.D. Thapa, A. Karkey, S. Dongol, A. Giri, M. Shakya, K.R. Pathak, J. Campbell, S. Baker, J. Farrar, M. Wolbers, C. Dolecek // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2013. – Vol. 7(10). – e2523.
217. Kothari, A. The burden of enteric fever / A. Kothari, A. Pruthi, T.D. Chugh // *J Infection in Developing Countries.* – 2008. – Vol. 2(4). – P. 253-259.
218. Kozyreva, V.K. Long-term dissemination of CTX-M-5-producing hypermutable *Salmonella enterica* serovar typhimurium sequence type 328 strains in Russia, Belarus, and Kazakhstan / V.K. Kozyreva, E.N. Ilina, M.V. Malakhova, A. Carattoli, I.S. Azizov, D.V. Tapalski, R.S. Kozlov, M.V. Edelstein // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2014. – Vol. 58(9). – P. 5202–5210.

219. Kronvall, G. Setting interpretive breakpoints for antimicrobial susceptibility testing using disk diffusion / G. Kronvall, C.G. Giske, G. Kahlmeter // *Int J Antimicrob Agents*. – 2011. – Vol. 38(4). – P. 281–290.
220. Kuang, D. Increase in ceftriaxone resistance and widespread extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases Genes Among *Salmonella enterica* from Human and Nonhuman Sources / D. Kuang, J. Zhang, X. Xu, W. Shi, X. Yang, X. Su, X. Shi, J. Meng // *Foodborne Pathog Dis*. – 2018. – Vol. 15(12). – P. 770-775.
221. Kuijpers, L.M.F. The clinical and microbiological characteristics of enteric fever in Cambodia, 2008-2015 / L.M.F. Kuijpers, T. Phe, C.H. Veng, K. Lim, S. Ieng, C. Kham, N. Fawal, L. Fabre, S. Le Hello, E. Vlieghe, F-X. Weill, J. Jacobs, W.E. Peetermans // *PLoS Negl Trop Dis*. – 2017. – Vol. 11(9). – e0005964.
222. Kuleshov, K.V. Comparative genomic analysis of two isolates of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa El Tor isolated during outbreak in Mariupol in 2011 / K.V. Kuleshov, A. Kostikova, S.V. Pisarenko, D.A. Kovalev, S.N. Tikhonov, I.V. Savelieva, V.N. Saveliev, O.V. Vasilieva, L.S. Zinich, N.N. Pidchenko, A.N. Kulichenko, G.A. Shipulin // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2016. – Vol. 44. – P. 471-478.
223. Larsson, J.T. Development of a new nomenclature for *Salmonella* Typhimurium multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) / J.T. Larsson, M. Torpdahl, R.F. Petersen, G. Sørensen, B.A. Lindstedt, E.M. Nielsen // *Euro Surveill*. – 2009. – Vol. 14(15). – Article 19174.
224. Le, T.A. Clonal expansion and microevolution of quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhi in Vietnam from 1996 to 2004 / T.A. Le, L. Fabre, P. Roumagnac, P.A. Grimont, M.R. Scavizzi, F-X. Weill // *J Clin Microbiol*. – 2007. – Vol. 45(11). – P. 3485–3492.
225. Le Hello, S. International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin / S. Le Hello, R.S. Hendriksen, B. Doublet, I. Fisher, E.M. Nielsen, J.M. Whichard, B. Bouchrif, K. Fashae, S.A. Granier, N. Jourdan-Da Silva, A. Cloeckert, E.J. Threlfall, F.J. Angulo, F.M. Aarestrup, J. Wain, F-X. Weill // *J Infect Dis*. – 2011. – Vol. 204(5). – P. 675-684.



226. Le Hello, S. Highly drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198-X1: a microbiological study / S. Le Hello, D. Harrois, B. Bouchrif, L. Sontag, D. Elhani, V. Guibert, K. Zerouali, F.X. Weill // *Lancet Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 13(8). – P. 672-679.
227. Le Hello, S. The global establishment of a highly-fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 strain / S. Le Hello, A. Bekhit, S.A. Granier, H. Barua, J. Beutlich, M. Zając, S. Münch, V. Sintchenko, B. Bouchrif, K. Fashae, J.L. Pinsard, L. Sontag, L. Fabre, M. Garnier, V. Guibert, P. Howard, R.S. Hendriksen, J.P. Christensen, P.K. Biswas, A. Cloeckert, W. Rabsch, D. Wasyl, B. Doublet, F-X.Weill // *Front Microbiol.* – 2013. – Vol. 18(4). – Article 395.
228. Levine, M.M. The gathering storm: is untreatable typhoid fever on the way? / M.M. Levine, R. Simon // *MBio*. – 2018. – Vol. 9(2). – e00482-18.
229. Li, L. Co-spread of *oqxAB* and *blaCTX-M-9G* in non-Typhi *Salmonella enterica* isolates mediated by ST2-IncHI2 plasmids / L. Li, X. Liao, Z. Liu, T. Huang, X. Li, J. Sun, B. Liu, Q. Zhang, Y. Liu // *J Antimicrob Agents*. – 2014. – Vol. 44(3). – P. 263-268.
230. Lienemann, T. Characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from domestically acquired infections in Finland by phage typing, antimicrobial susceptibility testing, PFGE and MLVA / T. Lienemann, A. Kyyhkynen, J. Halkilahti, K. Haukka, A. Siitonen // *BMC Microbiol.* –2015. – Vol. 15 – Article 131.
231. Lima, T. Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review / T. Lima, S. Domingues, G.J. Da Silva // *Microorganisms*. – 2019. – Vol. 7(2). – Article 55.
232. Lindstedt, B.A. Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight European countries, 2012 / B.A. Lindstedt, M. Torpdahl, G. Vergnaud, S. Le Hello, F. X. Weill, E. Tietze, B. Malorny, D.M. Prendergast, E. Ní Ghallcháoir, R.F. Lista, L.M. Schouls, R. Söderlund, S. Börjesson, S. Åkerström // *Euro Surveill.* – 2013. – Vol. 18(4). – Article 20385.

233. Liu, C.Y. In vitro activities of tigecycline against clinical isolates of *Aeromonas*, *Vibrio*, and *Salmonella* species in Taiwan / C.Y. Liu, Y.T. Huang, C.H. Liao, P.R. Hsueh // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2008. – Vol. 52(7). – P. 2677–2679.
234. Liu, Y. The evaluation and application of multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) for the molecular epidemiological study of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis infection / Y. Liu, X. Shi, Y. Li, Q. Chen, M. Jiang, W. Li, Y. Qiu, Y. Lin, Y. Jiang, B. Kan, Q. Sun, Q. Hu // *Annals Clin Microbiol Antimicrob.* – 2016. – Vol. 15. – Article 4.
235. Madec, J.Y. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals: a threat for humans? / J.Y. Madec, M. Haenni, P. Nordmann, L. Poirel // *Clin Microbiol Infect.* – 2017. – Vol. 23(11). – P. 826-833.
236. Mahindroo, J. Endemic fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky ST198 in northern India / J. Mahindroo, D.P. Thanh, T. Nguyen, B. Mohan, S. Thakur, S. Baker, N. Taneia // *Microbial genetics.* – 2019. – Vol. 5(7). – e000275.
237. Majowicz, S.E. The global burden of non-typhoidal *Salmonella* gastroenteritis / S.E. Majowicz, J. Musto, E. Scallan, F.J. Angulo, S.J. O’Brein, T.F. Jones, A. Fazil, R.M. Hoekstra // *Clin Infect Dis.* – 2010. – Vol. 50(6). – P. 882–889.
238. Marchello, C.S. Global Typhoid Fever Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis / C.S. Marchello, C.Y. Hong, J.A. Crump // *Clin Infect Dis.* – 2019. – Vol. 68(2). – S105–S116.
239. Martínez-Gamboa, A. IS200 and multilocus sequence typing for the identification of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains from Indonesia / A. Martínez-Gamboa, C. Silva, A. Fernández-Mora, M. Wiesner, A. Ponce de León, E. Calva // *Int Microbiology.* – 2015. – Vol. 18(2). – P. 99–104.
240. Mashe, T. Laboratory characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhi isolates from Zimbabwe, 2009-2017 / T. Mashe, M. Gudza-Mugabe, A. Tarupiwa, E. Munemo, S. Mtapuri-Zinyowera, S.L. Smouse, A. Sooka, B. Stray-Pedersen, A.M. Smith, J. Mbanga // *BMC Infect Dis.* – 2019. – Vol. 19(1). – Article 487.

241. Matono, T. Emergence of Resistance Mutations in *Salmonella enterica* Serovar Typhi Against Fluoroquinolones / T. Matono, M. Morita, K. Yahara, K. Lee, H. Izumiya, M. Kaku, M. Ohnishi // *Open Forum Infect Dis.* – 2017. – Vol. 4(4). – ofx230. doi:10.1093/ofid/ofx230.
242. Maurer, F.P. Integrating forecast probabilities in antibiograms: a way to guide antimicrobial prescriptions more reliably? / F.P. Maurer, P. Courvalin, E.C. Bottger, M. Hombach // *J Clin Microbiol.* – 2014. – Vol. 52(10). – P. 3674–84.
243. McDermott, P.F. Whole-genome sequencing for detecting antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* / P.F. McDermott, G.H. Tyson, C. Kabera, Y. Chen, C. Li, J.P. Folster, S.L. Ayers, C. Lam, H.P. Tate, S. Zhao // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2016. – Vol. 60(9). – P. 5515–5520.
244. Medalla, F. Ciprofloxacin-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhi, United States, 1999–2008 / F. Medalla, M. Sjölund-Karlsson, S. Shin, E. Harvey, K. Joyce, L. Theobald, B.L. Nigren, G. Pecic, K. Gay, J. Austin, A. Stuart, E. Blanton, E.D. Mintz, J. M. Whichard, E.J. Barzilay // *Emerg Infect Dis.* – 2011. – Vol. 17(6). – P.1095-1098.
245. Milligan, R. Vaccines for preventing typhoid fever / R. Milligan, M. Paul, M. Richardson, A. Neuberger // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2018. – Vol. 2018(5). – CD001261.
246. Miró, E. Resistance to quinolones and beta-lactams in *Salmonella enterica* due to mutations in topoisomerase-encoding genes, altered cell permeability and expression of an active efflux system / E. Miró, C. Vergés, I. García, B. Mirelis, F. Navarro, P. Coll, G. Prats, L. Martínez-Martínez // *Enferm Infecc Microbiol Clinical.* – 2004. – Vol. 22(4). – P. 204-211.
247. Mirza, S. Multi-drug resistant typhoid: a global problem / S. Mirza, N. Beeching, C. Hart // *J Med Microbiol.* – 1996. – Vol. 44(5). – P. 317-319.
248. Mughini-Gras, L. New paradigms for *Salmonella* source attribution based on microbial subtyping / L. Mughini-Gras, E. Franz, W. van Pelt // *Food Microbiology.* – 2018. – Vol. 71. – P. 60-67.

249. Multicountry outbreak of *Salmonella* Enteritidis infections linked to Polish eggs [Электронный ресурс] // European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority: Stockholm and Parma. – 2017. – Режим доступа: [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/12-12-2017-RRA-UPDATE-4-Salmonella-Enteritidis\\_0.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/12-12-2017-RRA-UPDATE-4-Salmonella-Enteritidis_0.pdf)
250. Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage type 8, MLVA type 2-9-7-3-2 and 2-9-6-3-2 infections, 7 March 2017 [Электронный ресурс] // European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority: Stockholm and Parma. – 2017. – Режим доступа: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/rapid-outbreak-assessment-Salmonella-Enteritidis-7-mar-2017.pdf>
251. Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage types 56 and 62, MLVA profile 2-11-3-3-2 and 2-12-3-3-2 infections // European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority: Stockholm. – 2017. [Электронный ресурс] режим доступа: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/rapid-risk-assessment-multi-country-outbreak-Salmonella-Enteritidis.pdf>
252. Muvhali, M. Investigation of *Salmonella* Enteritidis outbreaks in South Africa using multi-locus variable-number tandem-repeats analysis, 2013-2015 / M. Muvhali, A.M. Smith, A.M. Rakgantso, K.H. Keddy // BMC Infect Dis. – 2017. – Vol. 17(1). – Article 661.
253. Nakaya, H. Life-threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium with mutations in both *gyrA* and *parC* / H. Nakaya, A. Yasuhara, K. Yoshimura, Y. Oshihoi, H. Izumiya, H. Watanabe // Emerg Infect Dis. – 2003. – Vol. 9(2). – P. 255-257.
254. Navarro, F. CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999–December 2000) / F. Navarro, E. Perez-Trallero, J.M. Marimon, R. Aliaga, M. Gomariz, B. Mirelis // J Antimicrob Chemother. – 2001. – Vol. 48(3). – P. 383–389.

255. Nga, T.V.T. The Control of Typhoid Fever in Vietnam / T.V.T. Nga, P.T. Duy, N.P. Huong Lan, N.V. Vinh Chau, S. Baker // *The American J Trop Medicine and Hygiene*. – 2018. – Vol. 99(3). – P. 72–78.
256. Nishino, K. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / K. Nishino, T. Latifi, E.A. Groisman // *Molecular Microbiology*. – 2006. – Vol. 59(1). – P. 126-141.
257. Nüesch-Inderbinen, M. Antimicrobial susceptibility of travel-related *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates detected in Switzerland (2002–2013) and molecular characterization of quinolone resistant isolates / M. Nüesch-Inderbinen, H. Abgottspon, G. Sägesser, N. Cernela, R. Stephan // *BMC Infect Dis*. – 2015. – Vol. 15. – Article 212.
258. Okanda, T. Characteristics of Resistance Mechanisms and Molecular Epidemiology of Fluoroquinolone-Nonsusceptible *Salmonella enterica* Serovar Typhi and Paratyphi A Isolates from a Tertiary Hospital in Dhaka, Bangladesh / T. Okanda, A. Haque, T. Ehara, Q. Huda, K. Ohkusu, R.A. Miah, T. Matsumoto // *Microb Drug Resistance*. – 2018. – Vol. 24(10). – P. 1460-1465.
259. Park, C.H. Prevalence in the United States of aac(6<sup>3</sup>)-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme / C.H. Park, A. Robicsek, G.A. Jacoby, D. Sahn, D.C. Hooper // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2006. – Vol. 50(11). – P. 3953-3955.
260. Park, S.E. The phylogeography and incidence of multi-drug resistant typhoid fever in Sub-Saharan Africa / S.E. Park, D.T. Pham, C. Boinett, V.K. Wong // *Nature Communications*. – 2018. – Vol. 9(1). – Article 5094.
261. Parry, C.M. Randomized controlled comparison of ofloxacin, azithromycin, and an ofloxacin-azithromycin combination for treatment of multidrug-resistant and nalidixic acid-resistant typhoid fever / C.M. Parry, V.A. Ho, L.T. Phuong, P.V. Bay, M.N. Lanh, le T. Tung, N.T. Tham, J.Wain, T.T. Hien, J.J. Farrar // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2007. – Vol. 51(3). – P. 819-825.
262. Parry, C.M. Clinically and microbiologically derived azithromycin susceptibility breakpoints for *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A / C.M. Parry, N.T. Thieu, C. Dolecek, A. Karkey, R. Gupta, P. Turner, D. Dance, R.R. Maude,

- V. Ha, C.N. Tran, P.L. Thi, B.P. Be, L.T. Phi, R.N. Ngoc, A. Ghose, S. Dongol, J.I. Campbell, D.P. Thanh, T.H. Thanh, C.E. Moore, S. Sona, R. Gaiind, M. Deb, H.V. Anh, S.N. Van, H.T. Tinh, N.P. Day, A. Dondorp, G. Thwaites, M.A. Faiz, R. Phetsouvanh, P. Newton, B. Basnyat, J.J. Farrar, S. Baker // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2015. – Vol. 59(7). – P. 2756–2764.
263. Pearce, M.E. Comparative analysis of core genome MLST and SNP typing within a European *Salmonella* serovar Enteritidis outbreak / M.E. Pearce, N.F. Alikhan, T.J. Dallman, Z. Zhou, K. Grant, M.C.J. Maiden // *Int J Food Microbiol.* – 2018. – Vol. 274. – P.1-11.
264. Petrovska, L. Microevolution of Monophasic *Salmonella* Typhimurium during Epidemic, United Kingdom, 2005-2010 / L. Petrovska, A.E. Mather, M. AbuOun, P. Branchu, S.R. Harris, T. Connor, K.L. Hopkins, A. Underwood, A.A. Lettini, A. Page, M. Bagnall, J. Wain, J. Parkhill, G. Dougan, R. Davies, R.A. Kingsley // *Emerg Infect Dis.* – 2016. – Vol. 22(4). – P. 617–624.
265. Pfeifer, Y. *Salmonella enterica* serovar Typhi with CTX-M  $\beta$ -lactamase, Germany / Y. Pfeifer, J. Matten, W. Rabsch // *Emerg Infect Dis.* – 2009. – Vol. 15(9). – P.1533–1535.
266. Pham Thanh, D. A novel ciprofloxacin-resistant subclade of H58 *Salmonella* Typhi is associated with fluoroquinolone treatment failure / D. Pham Thanh, A. Karkey, S. Dongol, N. Ho Thi, C.N. Thompson, M.A. Rabaa, A. Arjyal, K.E. Holt, V. Wong, N. Tran Vu Thieu, P. Voong Vinh, T. Ha Thanh, A. Pradhan, S.K. Shrestha, D. Gajurel, D. Pickard, C.M. Parry, G. Dougan, M. Wolbers, C. Dolecek, G.E Thwaites, B. Basnyat, S. Baker // *Elife.* – 2016. – Vol. 5. – e14003.
267. Phan, M.D. Wain J. IncHI plasmids, a dynamic link between resistance and pathogenicity / M.D. Phan, J. Wain // *J Infect Developing Countries.* – 2008. – Vol. 2(4). – P. 272-278.
268. Phan, M.D. Variation in *Salmonella enterica* serovar Typhi IncHI1 plasmids during the global spread of resistant typhoid fever / M.D. Phan, C. Kidgell, S. Nair, K.E. Holt, A.K. Turner, J. Hinds, P. Butcher, F.J. Cooke, N.R. Thomson, R. Titball,

- Z.A. Bhutta, R. Hasan, G. Dougan, J. Wain // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53(2). – P. 716–727.
269. Phoba, M.F. *Salmonella enterica* serovar Typhi Producing CTX-M-15 Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase in the Democratic Republic of the Congo / M.F. Phoba, B. Barbé, O. Lunguya, L. Masendu, D. Lulengwa, G. Dougan, V.K. Wong, S. Bertrand, P.J. Ceysens, J. Jacobs, S. Van Puyvelde, S. Deborggraeve // *Clin Infect Dis.* – 2017. – Vol. 65(7). – P. 1229-1231.
270. Piddock, L.J. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals / L.J. Piddock // *FEMS Microbiol Rev.* – 2002. – Vol. 26(1). – P. 3-16.
271. Pijnacker, R. An international outbreak of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis linked to eggs from Poland: a microbiological and epidemiological study / R. Pijnacker, T.J. Dallman, S.L. Aloys Tjisma, Int. Outbreak Invest. Team // *The Lancet Infect Dis.* – 2019. – Vol. 19(7). – P. 778-786.
272. Pokharel, B.M. Multidrug-resistant and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Salmonella enterica* (serotypes Typhi and Paratyphi A) from blood isolates in Nepal: surveillance of resistance and a search for newer alternatives / B.M. Pokharel, J. Koirala, R.K. Dahal, S.K. Mishra, P.K. Khadga, N.R. Tuladhar // *J Infect Dis.* – 2006. – Vol. 10(6). – P. 434-438.
273. Prendergast, D.M. Application of multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA), phage typing and antimicrobial susceptibility testing to subtype *Salmonella* serovar Typhimurium isolated from pig farms, pork slaughterhouses and meat producing plants in Ireland / D.M. Prendergast, D. O’Grady, S. Fanning, M. Cormican, N. Delappe, J. Egan, C. Mannion, M. Fanning, M. Gutierrez // *Food Microbiol.* – 2011. – Vol. 28(5). – P. 1087-1094.
274. Rahman, S.I.A. Population structure and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* Typhi isolates in urban Dhaka, Bangladesh from 2004 to 2016 / S.I.A. Rahman, Z.A. Dyson, E.J. Klemm, F. Khanam, K.E. Holt, E.K. Chowdhury, G. Dougan, F. Qadri // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2020. – Vol. 14(2). – e0008036.

275. Ramachandran, A. Detection of blaCTX-M Extended Spectrum Beta-lactamase Producing *Salmonella enterica* Serotype Typhi in a Tertiary Care Centre / A. Ramachandran, M. Shanthi, U. Sekar // J Clin Diagnostic Research. – 2017. – Vol. 11(9). – DC21-DC24.
276. Ramadan, H. Draft genome sequences of two ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Kentucky ST198 isolated from retail chicken carcasses in Egypt / H. Ramadan, S.K. Gupta, P. Sharma, K.I. Sallam, L.M. Hiott, H. Elsayed, J.B. Barrett, J.G. Frye, C.R. Jackson // J Global Antimicrob Resistance. – 2018. – Vol. 14. – P. 101-103.
277. Ranjbar, R. Detection of common clones of *Salmonella enterica* serotype Infantis from human sources in Tehran hospitals / R. Ranjbar, H. Rahmati, L. Shokoohizadeh // Gastroenterol Hepatol Bed Bench. – 2018. – Vol. 11(1). – P. 54-59.
278. Ranjbar, R. Distribution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) among *Salmonella* serogroups isolated from pediatric patients / R. Ranjbar, M. Ardashiri, S. Samadi, D. Afshar // Iranian J Microbiol. – 2018. – Vol. 10(5). – P. 294–299.
279. Rankin, S.C. Molecular characterization of cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport isolates from animals in Pennsylvania / S.C. Rankin, H. Aceto, J. Cassidy, J. Holt, S. Young, B. Love, D. Tewari, D.S. Munro, C.E. Benson // J Clin Microbiol. – 2002. – Vol. 40(12). – P. 4679–4684.
280. Rebelo, A.R. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes / A.R. Rebelo, V. Bortolaia, J.S. Kjeldgaard, S.K. Pedersen, P. Leekitcharoenphon // Euro Surveill. – 2018. – Vol. 23(6). – Article 17-00672.
281. Riddle, M.S. ACG Clinical Guideline: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Acute Diarrheal Infections in Adults / M.S. Riddle, H.L. DuPont, A. Bradley, B.A. Connor // American J Gastroenterology. – 2016. – Vol. 111(5). – P. 602–622.
282. Robertson, J. Comprehensive assessment of the quality of *Salmonella* whole genome sequence data available in public sequence databases using the *Salmonella* in silico Typing Resource (SISTR) / J. Robertson, C. Yoshida, P. Kruczkiewicz,



- C. Nadon, A. Nichani, E. N. Taboada, J.H.E. Nash // *Microbial Genom.* – 2018. – Vol. 4(2). – e000151.
283. Robicsek, A. Qnr prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States / A. Robicsek, J. Strahilevitz, D.F. Sahn, G.A. Jacoby, D.C. Hooper // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2006. – Vol. 50(8). – P. 2872-2874.
284. Rodriguez-Martinez, J.M. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update / J.M. Rodriguez-Martinez, M.E. Cano, C. Velasco, L. Martinez-Martinez, A. Pascual // *J Infect Chemother.* – 2011. – Vol. 17(2). – P. 149-182.
285. Ronholm, J. Navigating Microbiological Food Safety in the Era of Whole-Genome Sequencing / J. Ronholm, N. Naseri, N. Petronella, F. Pagotto // *Clin Microb Rev.* – 2016. – Vol. 29(4). – P. 837-857.
286. Rotimi, V. Emergence of CTX-M-15 type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella* spp. in Kuwait and the United Arab Emirates / V. Rotimi, W. Jamal, T. Pal, A. Sovenned, M. John Albert // *J Med Microbiol.* – 2008. – Vol. 57(7). – P. 881–886.
287. Roumagnac, P. Evolutionary History of *Salmonella* Typhi / P. Roumagnac, F-X. Weill, C. Dolecek, S. Baker, S. Brisse, N.T. Chinh, T.A. Le, C.J. Acosta, J. Farrar, G. Dougan, M. Achtman // *Science.* – 2006. – Vol. 314(5803). – P.1301-1304.
288. *Salmonella* spp. Pefloxacin 5  $\mu$ g as screen for fluoroquinolone resistance [Электронный ресурс] // EUCAST. European Society of Clinical Microbiology and Infectious. – 2020. – Режим доступа: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_criteria/Validation\\_2020/Salmonella\\_and\\_pefloxacin\\_v\\_1.4\\_January\\_2020.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_criteria/Validation_2020/Salmonella_and_pefloxacin_v_1.4_January_2020.pdf)
289. Scientific Opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling, outbreak investigation and scanning surveillance: Part 1 (evaluation of methods and applications) // *EFSA Journal.* – 2013. – Vol. 11(12). – Article 3502.
290. Sharma, P. Typhoidal *Salmonellae*: Use of Multi-Locus Sequence Typing to Determine Population Structure / P. Sharma, S. Dahiya, V. Balaji, A. Kanga, P.

- Panda, R. Das, A. Dhanraju, D.K. Mendiratta, S. Sood, B.K. Das, A. Kapil // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11(9). – e0162530.
291. Sharma, P. Pefloxacin as a surrogate marker for quinolone susceptibility in *Salmonella enterica* serovars Typhi & Paratyphi A in India / P. Sharma, S. Dahiya, B. Kumari, V. Balaji, S. Sood, B.K. Das, A. Kapil // Indian J Med Research. – 2017. – Vol. 145(5). – P. 687-692.
292. Sirinavin, S. Antibiotics for treating salmonella gut infections / S. Sirinavin, P. Garner // Cochrane database of systematic reviews. – 2000. – Vol. 2. – CD001167.
293. Sjölund-Karlsson, M. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance among non-Typhi *Salmonella enterica* isolates from humans in the United States / M. Sjölund-Karlsson, J.P. Folster, G. Pecic, K. Joyce, F. Medalla, R. Rickert, J.M. Whichard // Antimicrob Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53(5). – P. 2142-2144.
294. Skov, R. Development of a Pefloxacin Disk Diffusion Method for Detection of Fluoroquinolone-Resistant *Salmonella enterica* / R. Skov, E. Matuschek, M. Sjölund-Karlsson, J. Ahman, A. Petersen, M. Stegger, M. Torpdahl, G. Kahlmeter // J Clin Microbiol. – 2015. – Vol. 53(11). – P. 3411-3417.
295. Song, Y. A multiplex single nucleotide polymorphism typing assay for detecting mutations that result in decreased fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A / Y. Song, P. Roumagnac, F-X. Weill, J. Wain, C. Dolecek, C.J. Mazzoni, K.E. Holt, M. Achtman // J Antimicrob Chemother. – 2010. – Vol. 65(8). – P. 1631-1641.
296. Standard operating procedure for analysis of MLVA data of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in BioNumerics [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/mlva.html>
297. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>
298. Stewart B. Genetic variation for antibiotic persistence in *Escherichia coli* / B. Stewart, D.E. Rozen // Evolution. – 2012. – Vol. 66(3). – P.933–939.

299. Strahilevitz, J. A Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat / J. Strahilevitz, G. Jacoby, D. Hooper, A. Robicsek // Clin Microbiol Rev. – 2009. – Vol. 22(4). – P. 664-689.
300. Tack, D.M. Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10. U.S. Sites. 2015-2018 / D.M. Tack, E.P. Marder, P.M. Griffin, P.R. Cieslak, J. Dunn, S. Hurd, E. Scallan, S. Lathrop, A. Muse, P. Ryan, K. Smith, M. Tobin-D'Angelo, D.J. Vugia, K.G. Holt, B.J. Wolpert, R. Tauxe, A.L. Geissler // MMWR Morb Mortal Wkly Rep. – 2019. – Vol. 68(16). – P. 369–373.
301. Tadesse, G. Molecular epidemiology of fluoroquinolone resistant *Salmonella* in Africa: A systematic review and meta-analysis / G. Tadesse, T.S. Tessema, G. Beyene, A. Aseffa // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13(2). – e0192575.
302. Takahashi, S. Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis / S. Takahashi, Y. Nagano // J Clin Microbiol. – 1984. – Vol. 20(4). – P. 608-613.
303. Tamang, M.D. Prevalence and mechanisms of quinolone resistance among selected nontyphoid *Salmonella* isolated from food animals and humans in Korea / M.D. Tamang, H.M. Nam, A. Kim, H.S. Lee, T.S. Kim, M.J. Kim, G.C. Jang, S.C. Jung, S.K. Lim // Foodborne Pathog Dis. – 2011. – Vol. 8(11). – P. 1199-206.
304. Tang, H.J. In vitro and in vivo intracellular killing effects of tigecycline against clinical nontyphoid *Salmonella* isolates using ceftriaxone as a comparator / H.J. Tang, W.C. Ko, C.C. Chen, P.L. Chen, H.S. Toh, T.C. Weng, W.L. Yu, S.R. Chiang, Y.C. Chuang // Antimicrob Agents Chemother. – 2011. – Vol. 55(6). – P. 2755–2759.
305. Tang, H.J. Tigecycline therapy for bacteremia and aortitis caused by *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: A case report / H.J. Tang, C.C. Chen, W.C. Ko // J Microbiol Immunol Infect. – 2016. – Vol. 49(1). – P. 131-133.
306. Taylor, A.J. Characterization of foodborne outbreaks of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with whole-genome sequencing single nucleotide polymorphism-based analysis for surveillance and outbreak detection / A.J. Taylor, V. Lappi, W.J.

- Wolfgang, P. Lapierre, M.J. Palumbo, C. Medus, D. Boxrud // J Clin Microbiol. – 2015. – Vol. 53(10). – P. 3334–3340.
307. Technical report EFSA. Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage type 8, MLVA profile 2-9-7-3-2 and 2-9-6-3-2 infections [Электронный ресурс] // EFSA Supporting publication. – 2017. – EN-1188. – Режим доступа: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1188>
308. Thanh, D.P. A novel ciprofloxacin-resistant subclade of H58 *Salmonella* Typhi is associated with fluoroquinolone treatment failure / D.P. Thanh, A. Karkey, S. Dongol, N.H. Thi, C.N. Thompson, M.A. Rabaa, A. Arjyal, K.E. Holt, V. Wong, N. Tran Vu Thieu, P. Voong Vinh, T. Ha Thanh, A. Pradhan, S.K. Shrestha, D. Gajurel, D. Pickard, C.M. Parry, G. Dougan, M. Wolbers, C. Dolecek, G.E. Thwaites, B. Basnyat, S. Baker// Elife. – 2016. – Vol. 5. – e14003.
309. The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms v. 2.0 [Электронный ресурс]. – 2017. – Режим доступа: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_170711.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf)
310. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control // EFSA Journal. – 2019. – Vol. 17(12). – Article 5926.
311. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016 // EFSA Journal. – 2016. – Vol. 16(2). – Article 5182.
312. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017 // EFSA Journal. – 2019. – Vol. 17(2). – Article 5598.
313. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016 // EFSA Journal. – 2017. – Vol. 15(12). – Article 5077.

314. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017 // EFSA Journal. – 2018. – Vol. 16(12). – Article 5500.
315. Thompson, C.N. Treatment Response in Enteric Fever in an Era of Increasing Antimicrobial Resistance: An Individual Patient Data Analysis of 2092 Participants Enrolled into 4 Randomized, Controlled Trials in Nepal / C.N. Thompson, A. Karkey, S. Dongol, A. Arjyal, M. Wolbers, T. Darton, J.J. Farrar, G.E. Thwaites, C. Dolecek, B. Basnyat, S. Baker // Clin Infect Dis. – 2017. – Vol. 64(11). – P. 1522–1531.
316. Timme, R.E. Phylogenetic diversity of the enteric pathogen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* inferred from genome-wide reference-free SNP characters / R.E. Timme, J.B. Pettengill, M.W. Allard, E. Strain, R. Barrangou, C. Wehnes, J.S. Van Kessel, J.S. Karns, S.M. Musser, E.W. Brown // Genome Biology and Evolution. – 2013. – Vol. 5(11). – P. 2109–2123.
317. Torpdahl, M. Detection of qnr genes in *Salmonella* isolated from humans in Denmark / M. Torpdahl, A.M. Hammerum, C. Zachariasen, E.M. Nielsen // J Antimicrob Chemother. – 2009. – Vol. 63(2). – P. 406–408.
318. Turnidge, J. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values / J. Turnidge, G. Kahlmeter, G. Kronvall // Clin Microbiol Infect.–2006.– Vol. 12(5). – P. 418-425.
319. Turnidge, J. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints / J. Turnidge, D.L. Paterson // Clin Microbiol Rev. – 2007. – Vol. 20(3). – P. 391– 408.
320. Tyson, G.H. Proposed Epidemiological Cutoff Values for Ceftriaxone, Cefepime, and Colistin in *Salmonella* / G.H. Tyson, S. Bodeis-Jones, H. Caidi, K. Cook, U. Dessai, J. Haro, A.E. McCullough, J. Meng, C.A. Morales, J. P. Lawrence, G.E. Tillman, A. Winslow, R.A. Miller // Foodborne Pathog Dis. – 2018. – Vol. 15(11). – P. 701-704.
321. Varma, J.K. Highly resistant *Salmonella* Newport-MDRampC transmitted through the domestic US food supply: a FoodNet case-control study of sporadic *Salmonella* Newport infections, 2002–2003 / J.K. Varma, R. Marcus, S.A. Stenzel, S.S. Hanna, S.

- Gettner, B.J. Anderson, T. Hayes, B. Shiferaw, T.L. Crume, K. Joyce, K.E. Fullerton, A.C. Voetsch, F.J. Angulo // *J Infect Dis.* – 2006. – Vol. 194(2). – P. 222–230.
322. Varon, E. *Quinolones and Gram-positive bacteria* / E. Varon, P. Courvalin, R. Leclerc, L.B. Rice // *Antibiogram.* – Portland: ESKA Publishing, ASM Press. – 2010. – P. 243–59.
323. Veeraraghavan, B. *Pefloxacin as a Surrogate Marker for Fluoroquinolone Susceptibility for Salmonella Typhi: Problems and Prospects* / B. Veeraraghavan, S. Anandan, D.P. Sethuvel, N.K. Ragupathi // *J Clin Diagn Res.* – 2016. – Vol. 10(8). – DL01–DL2.
324. Veeraraghavan, B. *Typhoid fever: issues in laboratory detection, treatment options and concerns in management in developing countries* / B. Veeraraghavan, A.K. Pragasam, Y. Bakthavatchalam, R. Ralph // *Future Sci. OA.* – 2018. – Vol. 04(06). – FSO312.
325. Wang, M. *New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of Proteus mirabilis* / M. Wang, Q. Guo, X. Xu, X. Wang, X. Ye, S. Wu, D.C. Hooper, M. Wang // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53(5). – P. 1892–1897.
326. Weill, F-X. *Multiple-antibiotic resistance in Salmonella enterica serotype Paratyphi B isolates collected in France between 2000 and 2003 is due mainly to strains harboring Salmonella genomic islands 1, 1-B, and 1-C* / F-X. Weill, L. Fabre, B. Grandry, P.A.D. Grimont, I. Casin // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49(7). – P. 2793-2801.
327. Weill, F-X. *La fièvre typhoïde n'est plus aussi simple à soigner* / F-X. Weill // *Med. Sci.* – 2010. – Vol. 26. – P. 969-975.
328. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. News Release 27.02.2017 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.who.int/ru/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

329. WHO. Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0005/136454/e94889.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/136454/e94889.pdf?ua=1)
330. Williams-Nguyen, J. Antibiotics and Antibiotic Resistance in Agroecosystems: State of the Science / J. Williams-Nguyen, J.B. Sallach, S. Bartelt-Hunt, A.B. Boxall, L.M. Durso, J.E. McLain, R.S. Singer, D.D. Snow, J.L. Zilles // *J Environ Qual.* – 2016. – Vol. 45(2). – P. 394-406.
331. Wong, M.H. PMQR genes *oqxAB* and *aac(6)Ib-cr* accelerate the development of fluoroquinolone resistance in *Salmonella* Typhimurium / M.H. Wong, E.W. Chan, L.Z. Liu, S. Chen // *Front Microbiol.* – 2014. – Vol. 5. – Article 521.
332. Wong, V.K. Phylogeographical analysis of the dominant multidrug-resistant H58 clade of *Salmonella* Typhi identifies inter-and intracontinental transmission events / V.K. Wong, S. Baker, D.J. Pickard, Int. Typhoid Consortium // *Nature Genetics.* – 2015. – Vol. 47(6). – P. 632-641.
333. Wong, V.K. An extended genotyping framework for *Salmonella enterica* serovar Typhi, the cause of human typhoid / V.K. Wong, S. Baker, T.R. Connor, D. Pickard, Int Typhoid Consortium // *Nature communications.* – 2016. – Vol. 7. – Article 12827.
334. Wong, V.K. Molecular Surveillance Identifies Multiple Transmissions of Typhoid in West Africa / V.K. Wong, K.E. Holt, C. Okoro, Int Typhoid Consortium // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2016. – Vol. 10(9). – e0004781.
335. World Health Organization. The diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever. WHO/ V&B/03.07 [Электронный ресурс] // Geneva: WHO. – 2003. – Режим доступа: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/68122>.
336. World Health Organization. Typhoid vaccine prequalified [Электронный ресурс]. – 2018. – Режим доступа: <http://www.who.int/medicines/news/2018/WHOprequalifies-breakthrough-typhoidvaccine/en/>
337. World Health Organization. Typhoid vaccines: WHO position paper, March 2018—recommendations. Vaccine 2018 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.022>.

338. Wuyts, V. Whole genome sequence analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 outbreaks from a national reference laboratory's viewpoint [Электронный ресурс] / V. Wuyts, S. Denayer, N.H.C. Roosens, W. Mattheus, S. Bertrand, K. Marchal, K. Dierick, S.C.J. De Keersmaecker // PLoS Curr. – 2015. – Vol. 7. – pii: ecurrents.outbreaks.aa5372d90826e6cb0136ff66bb7a62fc.
339. Yachison, C.A. The Validation and Implications of Using Whole Genome Sequencing as a Replacement for Traditional Serotyping for a National *Salmonella* Reference Laboratory / C.A. Yachison, C. Yoshida, J. Robertson, J.H.E. Nash, P. Kruczkiewicz, E.N. Taboada, M. Walker, A. Reimer, S. Christianson, A. Nichani, C. Nadon // Front Microbiol. – 2017. – Vol. 8. – Article 1044.
340. Yap, K.P. Global MLST of *Salmonella* Typhi revisited in post-genomic era: genetic conversation, population structure, and comparative genomics of rare sequence types / K.P. Yap, W.S. Ho, H.M. Gan, L.C. Chai, K.L. Thong // Front Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – Article 270.
341. Yap, K.P. Thong KL. *Salmonella* Typhi genomics: envisaging the future of typhoid eradication / K.P. Yap, K.L. Thong // Trop Medicine Int Health. – 2017. – Vol. 22(8). – P. 918-925.
342. Yoshida, C.E. The *Salmonella* In Silico Typing Resource (SISTR): An Open Web-Accessible Tool for Rapidly Typing and Subtyping Draft *Salmonella* Genome Assemblies / C.E. Yoshida, P. Kruczkiewicz, C.R. Laing, E.J. Lingohr, V.P.J. Gannon, J.H.E. Nash, E.N. Taboada // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11(1). – e0147101.
343. Yoshida, C. Evaluation of molecular methods for identification of *Salmonella* serovars / C. Yoshida, S. Gurnik, A. Ahmad, T. Blimkie, S.A. Murphy, A.M. Kropinski, J.H.E. Nash // J Clin. Microbiol. – 2016. – Vol. 54(8). – P. 1992–1998.
344. Zankari, E. Identification of acquired antimicrobial resistance genes / E. Zankari, H. Hasman, S. Cosentino, M. Vestergaard, S. Rasmussen, O. Lund, F.M. Aarestrup, M.V. Larsen // J Antimicrob Chemother. – 2012. – Vol. 67(11). – P. 2640–2644.
345. Zhang, H. Genotyping of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains isolated from 1959 to 2006 in China and analysis of genetic diversity by genomic microarray /



- H. Zhang, X. Zhang, M. Yan, B. Pang, B. Kan, H. Xu, X. Huang // Croatian Medical J. – 2011. – Vol. 52(6). – P. 688–693.
346. Zhao, S. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolated from humans and food animals / S. Zhao, S. Qaiyumi, S. Friedman, R. Singh, S.L. Foley, D.G. White, P.F. McDermott, T. Donkar, C. Bolin, S. Munro, E.J. Baron, R.D. Walker // J Clin Microbiol. – 2003. – Vol. 41(12). – P. 5366–5371.
347. Zheng, Z. Serotype determination of *Salmonella* by xTAG assay / Z. Zheng, W. Zheng, H. Wang, J. Pan, X. Pu // J Microbiol Methods. – 2017. – Vol. 141. – P. 101-107.
348. Ziebell, K. Subtyping of Canadian isolates of *Salmonella* Enteritidis using Multiple Locus variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) alone and in combination with pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and phage typing / K. Ziebell, L. Chui, R. King, S. Johnson, P. Boerlin, R.P. Johnson // J Microbiol Methods. – 2017. – Vol. 139. – P. 29-36.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

## Приложение 1

Профили множественной резистентности штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг. (абс. число штаммов / % от числа устойчивых штаммов)

Профиль устойчивости	Всего	S. Enteritidis	S. Typhimurium	S. Infantis	Др.серовары
<b>1 класс АМП</b>	<b>379 (77,5)</b>	<b>360 (86,8)</b>	<b>9 (29,0)</b>	<b>1 (4,0)</b>	<b>9 (50,0)</b>
ХИН	365 (74,6)	356 (85,8)	1	1	7
АМП	9	2	7	0	0
ТЕТ	3	1	1	0	1
ТСМ	2	1	0	0	1
<b>2 класса АМП</b>	<b>35 (7,2)</b>	<b>15 (3,6)</b>	<b>11 (35,5)</b>	<b>5 (20,0)</b>	<b>4 (22,2)</b>
ХИН+ТЕТ	13	3	3	4	3
АМП+ТЕТ	8	2	6	0	0
ХИН+ТСМ	7	6	0	1	0
АМП+ХИН	4	4	0	0	0
АМП+ТСМ	2	0	2	0	0
АМП+ЦРС	1	0	0	0	1
<b>3 класса АМП</b>	<b>60 (12,3)</b>	<b>36 (8,7)</b>	<b>5 (16,1)</b>	<b>18 (72,0)</b>	<b>1 (5,55)</b>
ХИН+ХЛФ+ТЕТ	24	24	0	0	0
ХИН+ТСМ+ТЕТ	21	4	0	16	1 (S. Virchow)
АМП+ЦРС+ХИН	6	6	0	0	0
АМП+ТСМ+ТЕТ	4	0	4	0	0
АМП+ХИН+ТЕТ	3	1	0	2	0
АМП+ТСМ+ХЛФ	1	1	0	0	0
АМП+ЦРС+ТЕТ	1	0	1	0	0
<b>4 класса АМП</b>	<b>11 (2,2)</b>	<b>3 (0,7)</b>	<b>4 (13,0)</b>	<b>1 (4,0)</b>	<b>3 (16,7)</b>
АМП+ХИН+ТСМ+ТЕТ	3	3	0	0	0
АМП+ ХЛФ+ТЕТ+АМГ	2	0	2	0	0
АМП+ХИН+ТЕТ+АМГ	2	0	0	0	2 (S. Kentucky)
АМП+ХИН+ХЛФ+ТЕТ	1	0	1	0	0
АМП+ТСМ+ХЛФ+ТЕТ	1	0	0	0	1 (S. London)
ХИН+ТСМ+ТЕТ+АМГ	1	0	0	1	0
АМП+ЦРС+ТСМ+ТЕТ	1	0	1	0	0
<b>5 классов АМП</b>	<b>3 (0,6)</b>	<b>1 (0,2)</b>	<b>1 (3,2)</b>	<b>0</b>	<b>1 (5,55)</b>
АМП+ХИН+ТСМ+ХЛФ+ТЕТ	1	0	0	0	1 (S. Bredeney)
АМП+ЦРС+ХИН+ТСМ+ТЕТ	1	0	1	0	0
АМП+ЦРС+ХИН+ХЛФ+АМГ	1	1	0	0	0
<b>6 классов АМП</b>	<b>1 (0,2)</b>	<b>0</b>	<b>1 (3,2)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
АМП+ЦРС+ХИН+ХЛФ+ТЕТ+АМГ	1	0	1	0	0
<b>ВСЕГО устойчивых штаммов</b>	<b>489</b>	<b>415</b>	<b>31</b>	<b>25</b>	<b>18</b>

Примечание: АМП – aminopenicillins, ЦРС – цефалоспорины расширенного спектра, ХИН – хинолоны, ТЕТ – тетрациклины, ТСМ – триметоприм/сульфаметоксазол, ХЛФ – хлорамфеникол, АМГ – аминогликозиды

Устойчивость к антимикробным препаратам штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2002-2005 гг. и 2014-2019 гг.

Фенотип	2002-2005 гг. <sup>1</sup>						2014-2019 гг.					
	Всего (n=562)			S. Enteritidis (n=450)			Всего (n=746)			S. Enteritidis (n=594)		
	абс	%	95% ДИ	абс	%	95% ДИ	абс	%	95% ДИ	абс	%	95% ДИ
Чувствительные	468	83,3	80,0-86,1	379	84,2	80,6-87,3	257	34,5	31,1-37,9	179	30,1	26,6-33,9
Устойчивые к 1 и более классам АМП	94	16,7	13,9-20,0	71	15,8	12,7-19,4	489	65,5	62,1-68,9	415	69,9	66,1-73,4
Устойчивые к 3 и более классам АМП	37	6,6	4,8-8,9	31	6,9	4,9-9,6	75	10,1	8,1-12,4	40	6,7	5,0-9,0
Устойчивость к:												
- аминопенициллинам	52	9,3	7,1-11,9	39	8,6	6,4-11,6	41	5,5	4,1-7,4	13	2,2	1,3-3,7
- ЦРС	2	0,4	0,1-1,3	0	0	0-0,8	12	1,6	0,9-2,8	7	1,2	0,6-2,4
- карбапенемам	0	0	0-0,7	0	0	0-0,8	0	0	0-0,5	0	0	0-0,6
- хинолонам	33	5,9	4,2-8,1	28	6,2	4,3-8,8	454	60,9	57,3-64,3	408	68,7	64,8-72,3
- аминогликозидам	2	0,4	0,1-1,3	0	0	0-0,8	7	0,9	0,5-1,9	1	0,2	0-0,9
- триметоприм/сульфаметоксазолу	6	1,1	0,5-2,3	3	0,7	0,2-1,9	45	6,0	4,5-8,0	15	2,5	1,5-4,1
- хлорамфениколу	41	7,3	5,4-9,7	32	7,1	5,1-9,9	32	4,3	3,1-6,0	26	4,4	3,0-6,3
- тетрациклину	54	9,6	7,4-12,3	36	8,0	5,8-10,9	91	12,2	10,0-14,7	38	6,4	4,7-8,7

Примечание: ДИ – доверительный интервал, АМП – антимикробный препарат, ЦРС – цефалоспорины расширенного спектра;

<sup>1</sup>данные Северо-Западного регионального центра по сальмонеллезам (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера)

## БАЗЫ ДАННЫХ, СОДЕРЖАЩИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

### 1. БАЗА ДАННЫХ «*SALMONELLA* – MUSEUM: АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ»

Свидетельство о регистрации базы данных 2019622278 Российская Федерация. *Salmonella*-Museum: антибиотикочувствительность и механизмы резистентности / Егорова С.А., Кафтырева Л.А.; заявитель и правообладатель: ФБУН НИИЭМ имени Пастера (RU). - № 2019622251; заявл. 28.11.2019; опубл. 06.12.2019.

*Состав базы данных:* создана в среде Microsoft Excel (версия для MSWindows 98/2000/XP/Vista/7/10); содержит информацию о 746 штаммах *Salmonella*, выделенных от больных острыми кишечными инфекциями и контактных лиц на территории Санкт-Петербурга. Информация систематизирована по следующим разделам: эпидемиологическая информация, антигенная характеристика, чувствительность к антибиотикам, детерминанты резистентности. Каждый раздел представлен на отдельной вкладке (листе) в файле Excel и содержит уникальные номера штаммов *Salmonella* и соответствующие характеристики каждого штамма.

*Область применения базы данных.* База данных содержит информацию, позволяющую оптимизировать схемы лечения острых кишечных инфекций сальмонеллезной этиологии. Предназначена для использования учреждениями Роспотребнадзора в системе эпидемиологического надзора за сальмонеллезами; для использования в референс-центрах и научно-исследовательских учреждениях, занимающихся изучением бактерий рода *Salmonella*; для практического применения в лечебно-профилактических учреждениях при выборе тактики этиотропной терапии сальмонеллезов в Санкт-Петербурге.

*Описание базы данных.*

1. Раздел «Эпидемиологическая информация» включает уникальный регистрационный номер штамма в базе данных, номер штамма в направлении приславшего учреждения, наименование лечебного учреждения, выделившего штамм и год выделения (Рисунок 1).
2. Раздел «Антигенная характеристика» содержит название сероваров и комплекс О-антигенов и Н-антигенов, обнаруженных у штаммов *Salmonella* (Рисунок 2).
3. Раздел «Чувствительность к антибиотикам» содержит информацию о чувствительности штаммов к 12 антибиотикам. Информация представлена в виде клинических категорий чувствительности: «S» - чувствительный при стандартной дозировке; «R» - резистентный или «I» - чувствительный при увеличенной экспозиции. Кроме того, в таблице представлена информация о комплексном фенотипе чувствительности и количестве маркеров резистентности. Цветовая маркировка облегчает восприятие информации (Рисунок 3)
4. Раздел «Детерминанты резистентности» содержит информацию о детерминантах резистентности к бета-лактамам препаратам и хинолонам: представлены результаты детекции генов, кодирующих бета-лактамазы различных генетических семейств, а также хромосомные мутации в гене *gyrA*, обуславливающие резистентность к хинолонам (Рисунок 4).

	A	B	C	D	E
1	№ п/п	№ регистрационный	№ в направлении	Учреждение, выделившее штамм	Год выделения
2	1	14_12	к262	ГИБ имени Боткина	2014
3	2	14-14	5136	ф-л 4 ФБУЗ ЦГиЭ в г.СПб	2014
4	3	14-15	625дб	ф-л 4 ФБУЗ ЦГиЭ в г.СПб	2014
5	4	14-16	6996	ф-л 4 ФБУЗ ЦГиЭ в г.СПб	2014
6	5	14-17	832дб	ф-л 4 ФБУЗ ЦГиЭ в г.СПб	2014
7	6	14-18	454дб	ф-л 4 ФБУЗ ЦГиЭ в г.СПб	2014
8	7	14-48	952	ф-л 4 ФБУЗ ЦГиЭ в г.СПб	2014
9	8	14-49	873	ф-л 4 ФБУЗ ЦГиЭ в г.СПб	2014
10	9	14-50	841	ф-л 4 ФБУЗ ЦГиЭ в г.СПб	2014
11	10	14-51	1380	ф-л 4 ФБУЗ ЦГиЭ в г.СПб	2014

Рисунок 1 – Вкладка «Эпидемиологическая информация»

	A	B	C	E	F
1	№ п/п	№ регистрационный	Серовар	О-антигенный комплекс	Н-антигенный комплекс
2	1	14_12	S.Enteritidis	9,12	g,m
3	2	14-14	S.Enteritidis	9,12	g,m
4	3	14-15	S.Enteritidis	9,12	g,m
5	4	14-16	S.Enteritidis	9,12	g,m
6	5	14-17	S.Typhimurium	4,12	i; 1,2
7	6	14-18	S.Typhimurium	4,12	i; 1,2
8	7	14-48	S.Typhimurium	4,12	i; 1,2
9	8	14-49	S.Infantis	6,7	r;1,2
10	9	14-50	S.Enteritidis	9,12	g,m
11	10	14-51	S.Enteritidis	9,12	g,m
12	11	14-53	S.Enteritidis	9,12	g,m
13	12	14-54	S.Enteritidis	9,12	g,m
14	13	14-55	S.Enteritidis	9,12	g,m

Рисунок 2 – Вкладка «Антигенная характеристика»

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	Q
1	№ п/п	№ регистрационный	комплексный фенотип чувствительности	кол-во маркеров (классов)	ампициллин	цефалоспорины	налиндиксовая кислота	пепфлоксацин	ципрофлоксацин	триметоприм/сульфаметоксазол	нитрофурантоин	хлорамфеникол	тетрациклин	гентамицин	тобрамицин	алимпазин
2	1	14_12	R	1	S	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S
3	2	14-14	S	0	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	3	14-15	R	2	S	S	R	S	I	S	R	S	S	S	S	S
5	4	14-16	R	1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
6	5	14-17	S	0	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	6	14-18	R	1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
8	7	14-48	R	1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
9	8	14-49	R	1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
10	9	14-50	R	1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
11	10	14-51	R	4	S	S	R	S	I	S	R	R	R	S	S	S
12	11	14-53	R	1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S

Рисунок 3 – Вкладка «Чувствительность к антибиотикам»

	A	B	гены бета-лактамаз					хромосомные мутации
1	№ п/п	№ регистр	БЛРС	SHV	TEM	PSE	OXA	
2								
3	1	1146	CTX-M1 (CTX-M3)	отр	полож	отр	отр	отсутствуют
4	2	9854	CMY-2	отр	отр	отр	отр	gyrA Ser83Tyr
5	3	1502	gr.CTX-M1	отр	полож	отр	отр	gyrA Asp87Asn
9	7	12-303	gr.CTX-M1+ CTX-M2	отр	отр	отр	отр	gyrA Ser83Phe
10	8	13-238	gr.CTX-M2	отр	отр	отр	отр	gyrA Ser83Phe
11	9	13-245	gr.CTX-M2	отр	отр	отр	полож	gyrA Ser83Phe
12	10	14-182	AmpC, gr.CIT	отр	отр	отр	отр	gyrA Ser83Tyr
13	11	14-431	gr.CTX-M1	отр	отр	отр	отр	отсутствуют
14	12	14-726	gr.CTX-M1	отр	отр	отр	отр	gyrA Asp87Asn
15	13	14-806	gr.CTX-M1	отр	полож	отр	отр	gyrA Ser83Tyr
17	15	14-951	gr.CTX-M9	отр	отр	отр	отр	отсутствуют
18	16	14-969	gr.CTX-M1	отр	отр	отр	отр	отсутствуют
19	17	14-1049	gr.CTX-M9	отр	отр	отр	отр	gyrA Ser83Tyr
20	18	14-1056	gr.CTX-M9	отр	отр	отр	отр	gyrA Asp87Asn
21	19	15-281	gr.CTX-M1	отр	полож	отр	отр	gyrA Asp87Asn
22	8	15-1116	gr.CTX-M1	отр	полож	отр	отр	отсутствуют

Рисунок 4 – Вкладка «Детерминанты резистентности»

*Управление базой данных:* осуществляется через систему фильтров Microsoft Excel, позволяющую выбрать характеристики, присущие для конкретного штамма, а также отобрать штаммы, относящиеся к конкретным категориям чувствительности, или штаммы, имеющие заданные антигенные и молекулярные характеристики.

### Пример использования базы данных

Для отбора всех штаммов, относящихся к категории «R» к пепфлоксацину, необходимо выполнить следующие действия:

1. Открыть базу данных, дождаться ее загрузки. Перейти на вкладку «Чувствительность к антибиотикам»
2. Выделить столбцы с интересующими антибиотиками и активировать функцию «Фильтр».
3. Выбрать интересующий антибиотик, раскрыть вкладку фильтра и выбрать интересующую категорию.
4. Проанализировать полученные результаты.

## 2. БАЗА ДАННЫХ «S. ТУРНИ-MUSEUM: БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЯ БРЮШНОГО ТИФА»

Свидетельство о регистрации базы данных 2019621507 Российская Федерация. S.Typhi-Museum: биологические свойства возбудителя брюшного тифа / Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Порин А.А.; заявитель и правообладатель: ФБУН НИИЭМ имени Пастера (RU). - № 2019620836; заявл. 20.05.2019; опубл. 27.08.2019.

*Состав базы данных:* создана в среде Microsoft Access (версия для Office 365 MSO (16.0.11328.20156), лицензия 00201-10407-75268-AA172); содержит информацию о 325 штаммах *Salmonella* Typhi, возбудителя брюшного тифа, выделенных на территориях РФ в 2005-2019 гг. Информация хранится в таблицах, одна из которых является главной и содержит паспортные данные штамма, а остальные – подчиненные, связанные с главной отношением 1→∞ (Рисунок 5). Информация систематизирована по следующим разделам: эпидемиологические данные; биохимические свойства; устойчивость к антибиотикам, включая МПК; генетические особенности.

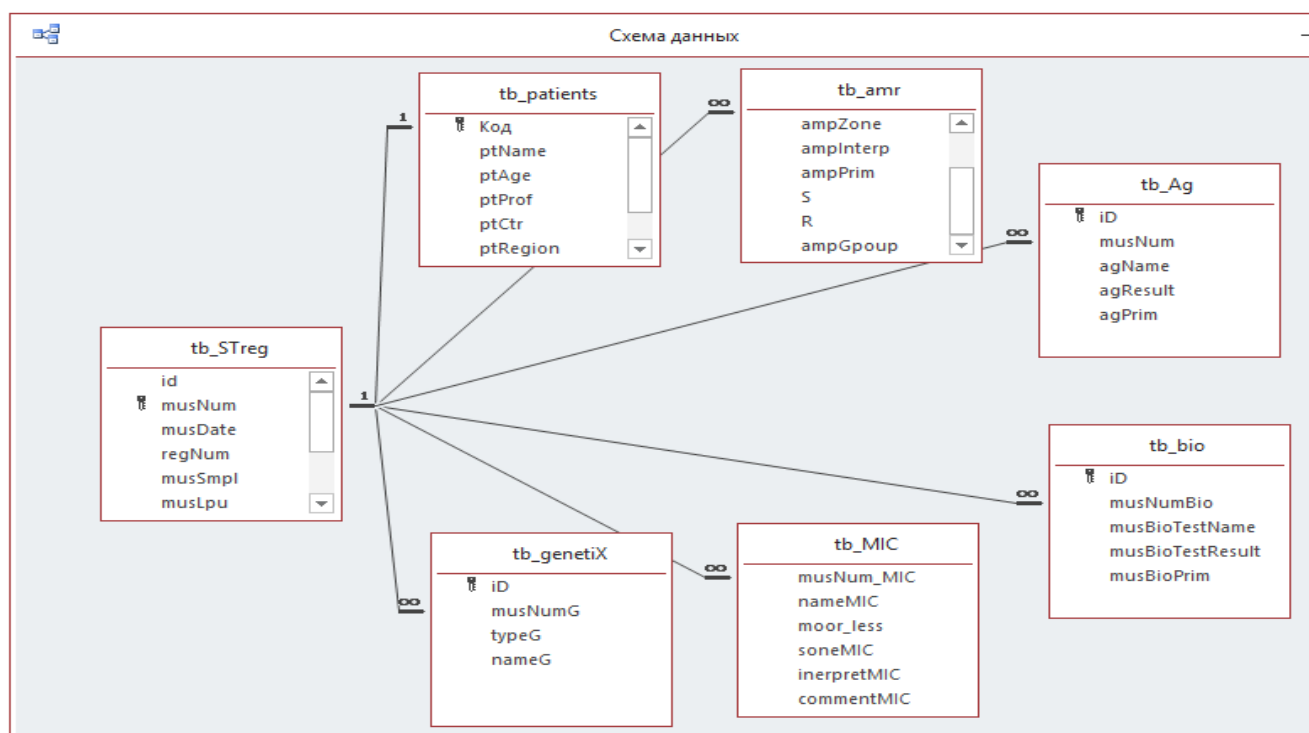


Рисунок 5 – Структура базы данных. Таблицы, их взаимосвязи и отношения.

*Область применения базы данных.* База данных содержит информацию, необходимую для проведения эпидемиологического надзора за брюшным тифом, а также позволяющую оптимизировать схемы лечения заболевания в РФ. Предназначена для использования учреждениями Роспотребнадзора при мониторинге циркуляции *S. Typhi* на территориях, для установления географического региона «завоза» штаммов в РФ, для оценки филогенетического родства возбудителя, выделенного в РФ и других странах; для практического применения в лечебно-профилактических учреждениях в рамках лабораторной диагностики брюшного тифа.

*Описание базы данных.*

1. Раздел «Эпидемиологические данные» включает номер штамма, год выделения, вид клинического материала, из которого он выделен; территорию, на которых он был выделен, учреждение, которое направило штамм на исследование (Рисунок 6).

The screenshot shows a web browser window displaying a form titled "Новый штамм S. Typhi". The form is divided into several sections:

- Metadata:** Fields for "Музейный №" (35), "Дата поступления" (1229), and "Имя штамма (по журналу)".
- Source Information:** A section titled "Как произошло заражение" with a dropdown menu showing "Фабр ЦЭ в Иркутской области". Below it is a field for "ИТФ".
- Specimen Details:** Fields for "№ Пробы" (2) and "Дата регистрации заболевания" (06.2005). A "Категория" dropdown is set to "И".
- Location Information:** A section titled "Информация об источнике" with fields for "Ф.И.О." (Моисеев В.Г.), "Возраст" (26 лет), "Профессия" (Водитель), "Страна" (Россия), "Область, регион" (Иркутская область), "Город, поселок" (г. Иркутск), and "Эпидемический".

The interface includes a sidebar on the left labeled "Область навигации" and a top navigation bar with options like "Главная", "Создание", "Внесение данных", "Работа с базой данных", and "Справка".

Рисунок 6 – Раздел «Эпидемиологические данные»

2. Раздел «Устойчивость к АМП» содержит информацию в виде клинических категорий чувствительности: «S» - чувствительный при стандартной дозировке; «R» - резистентный или «I» - чувствительный при увеличенной экспозиции. Количественные значения представлены в виде значений диаметров зон задержки роста, мм (Рисунок 7).

3. Раздел «МПК» содержит информацию в виде клинических категорий чувствительности «S», «R» или «I». Количественные значения представлены в виде значений минимальных подавляющих концентраций (мг/л) (Рисунок 8).



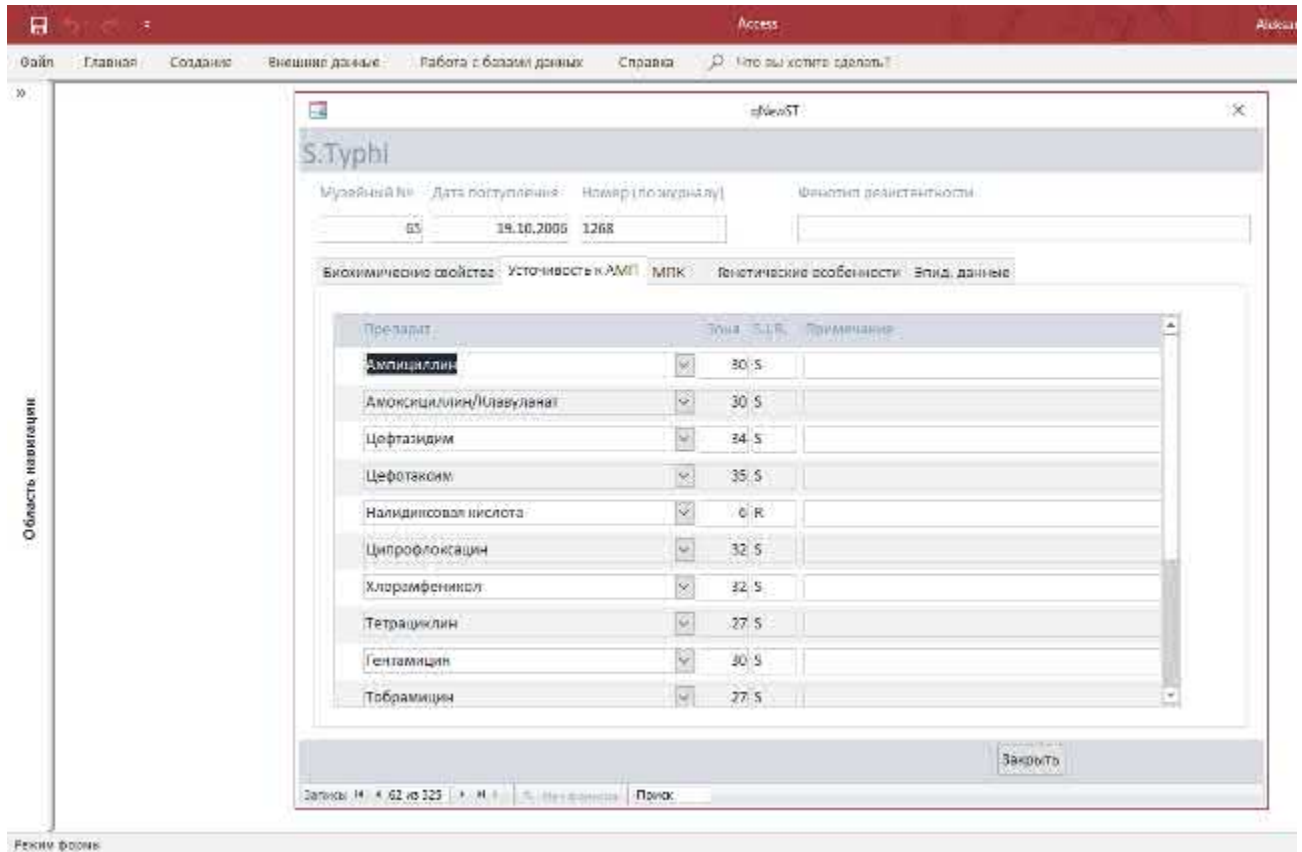


Рисунок 7 – Значения диаметров зон задержки роста, мм

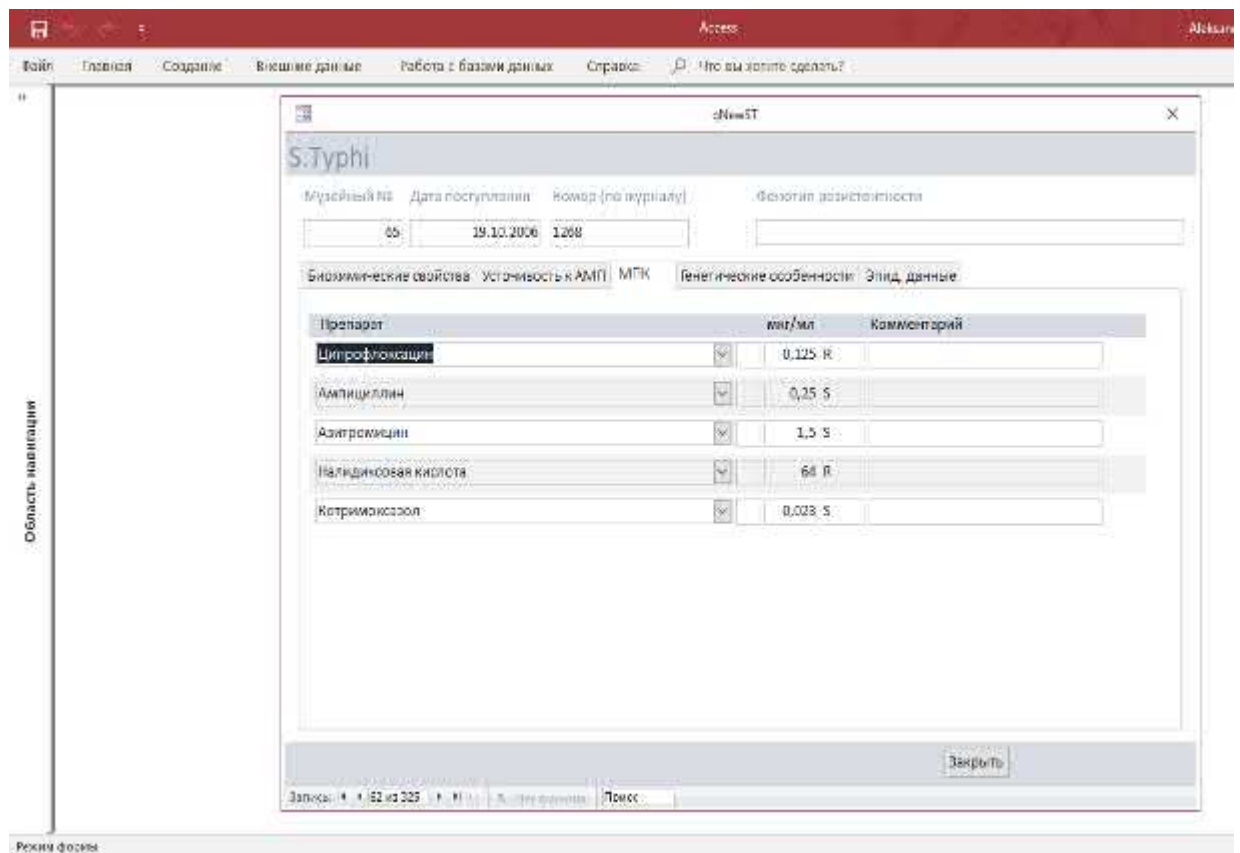


Рисунок 8 – Значения минимальных подавляющих концентраций антимикробных препаратов, мг/л.

4. Раздел «Генетические особенности» содержит совокупные результаты молекулярных исследований в виде общей таблицы с указанием вида выявленных мутаций, генов резистентности и плазмид (Рисунок 9), а также филогенетическую информацию – наименование генетической группы (клады) и сиквенс-типа (Рисунок 10).

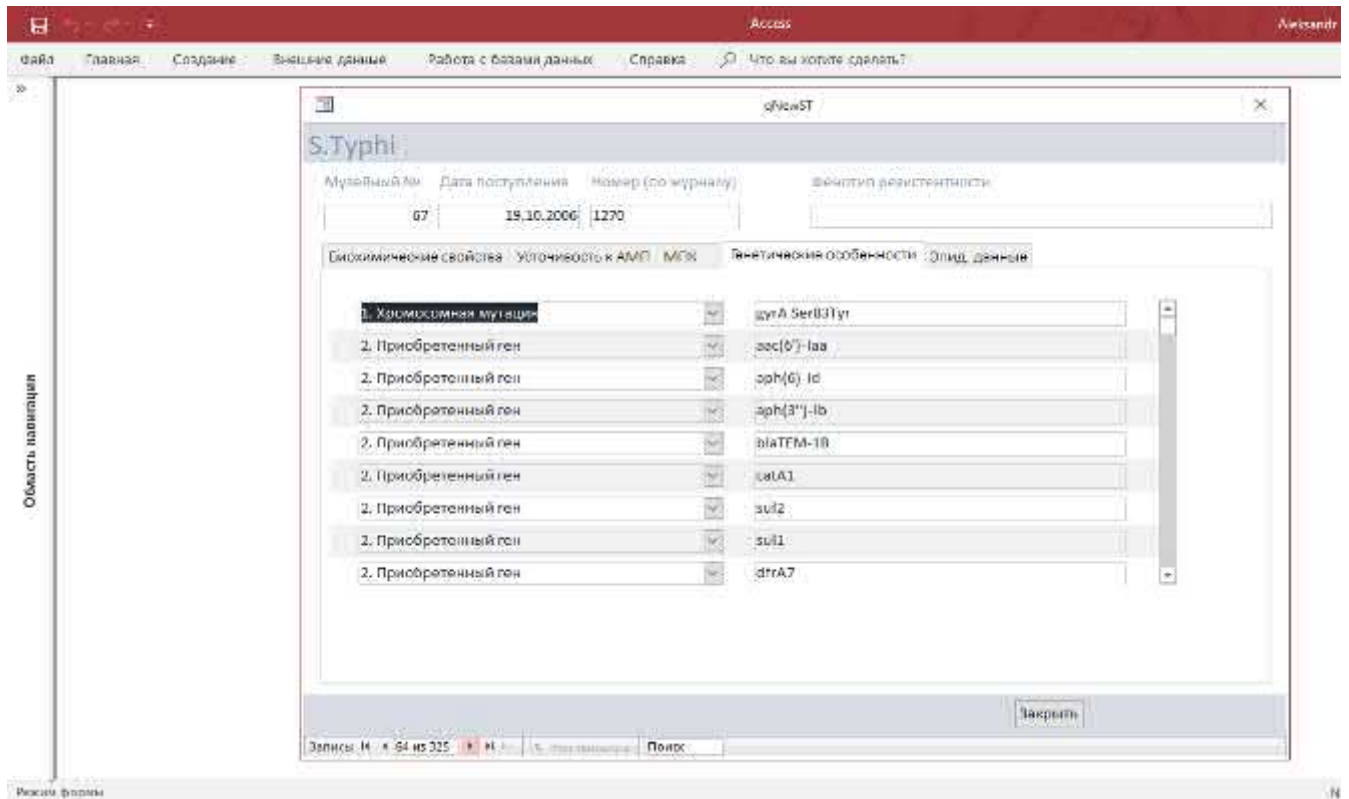


Рисунок 9 – Информация о наличии мутаций и генах резистентности.

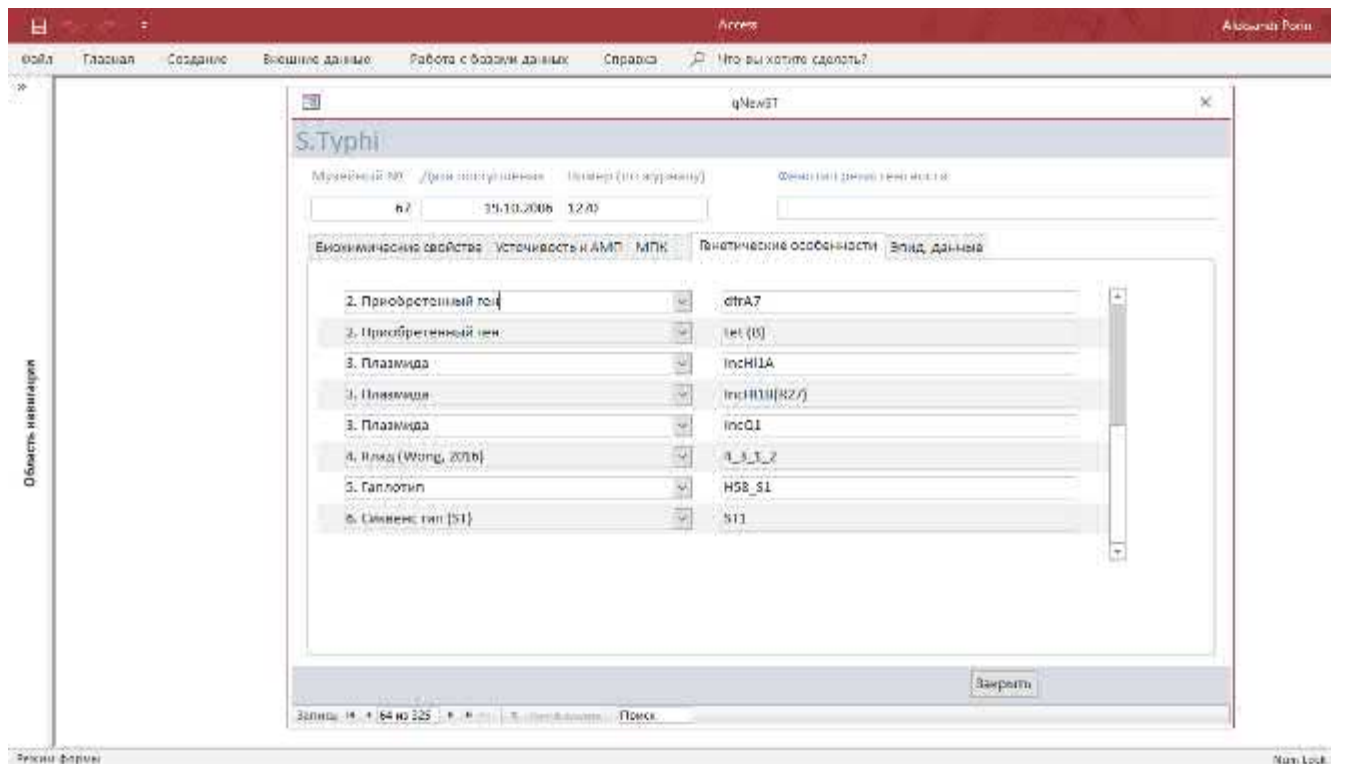


Рисунок 10 – Характеристика плазмид и филогенетическая информация

*Управление базой данных:* осуществляется посредством стандартных средств Microsoft Access через навигационную форму, позволяющую выбрать один из трех основных разделов (Рисунок 11):

- раздел «Ввод информации» - ввод информации о новых штаммах и редактирование уже введенных данных;
- раздел «Редактирование свойств» – внесение информации по разным группам биологических свойств штаммов, внесенных в базу, при этом программа предусматривает последовательный доступ ко всем штаммам или выбор конкретного штамма по его номеру;
- раздел «Просмотр информации» – последовательный просмотр информации или поиск конкретного штамма. В режиме просмотра данные блокируются от случайного изменения или удаления.

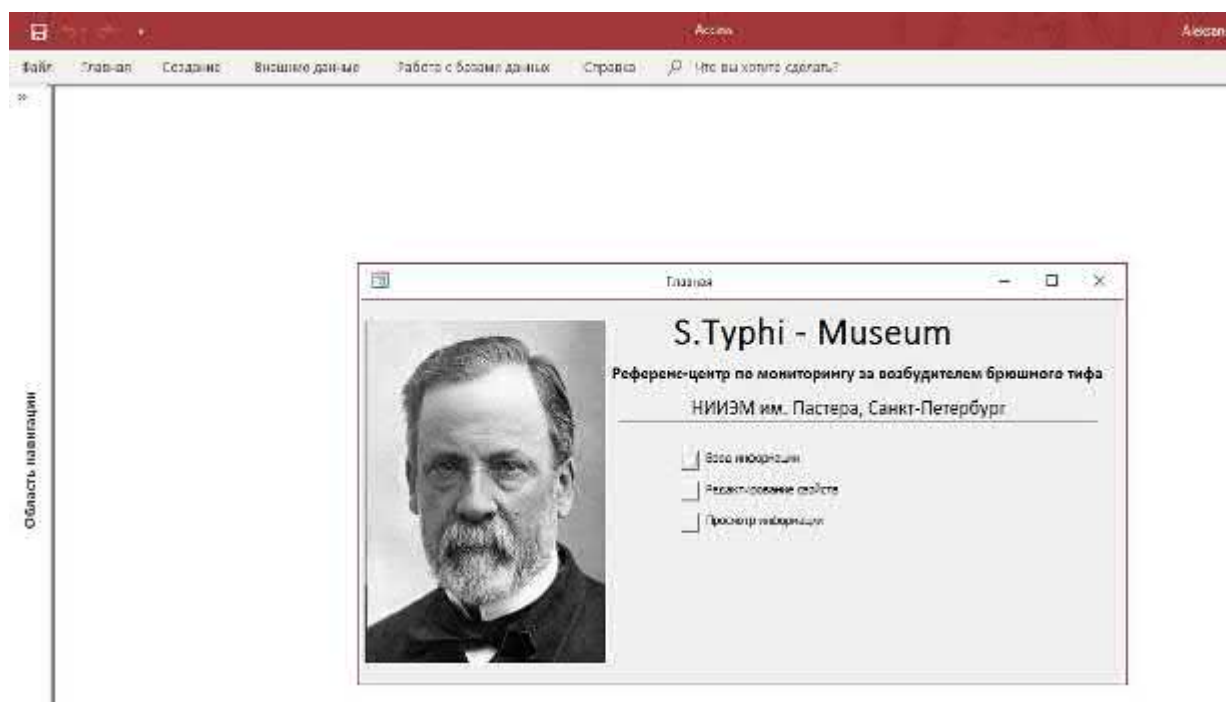


Рисунок 11 – Главная страница навигационной формы

*Пример использования базы данных:* для получения информации о штамме необходимо выполнить следующие действия:

1. Открыть базу данных, дождаться ее загрузки и появления навигационной формы (Рисунок 11).
2. Выбрать в навигационной форме пункт «Просмотр информации» и перейти на следующую страницу
3. Выбрать пункт «Выбор по номеру» (Рисунок 12).
4. После появления запроса ввести номер штамма (Рисунок 13)
5. После открытия карточки штамма, выбирая соответствующие вкладки, изучить свойства штамма (Рисунок 14).

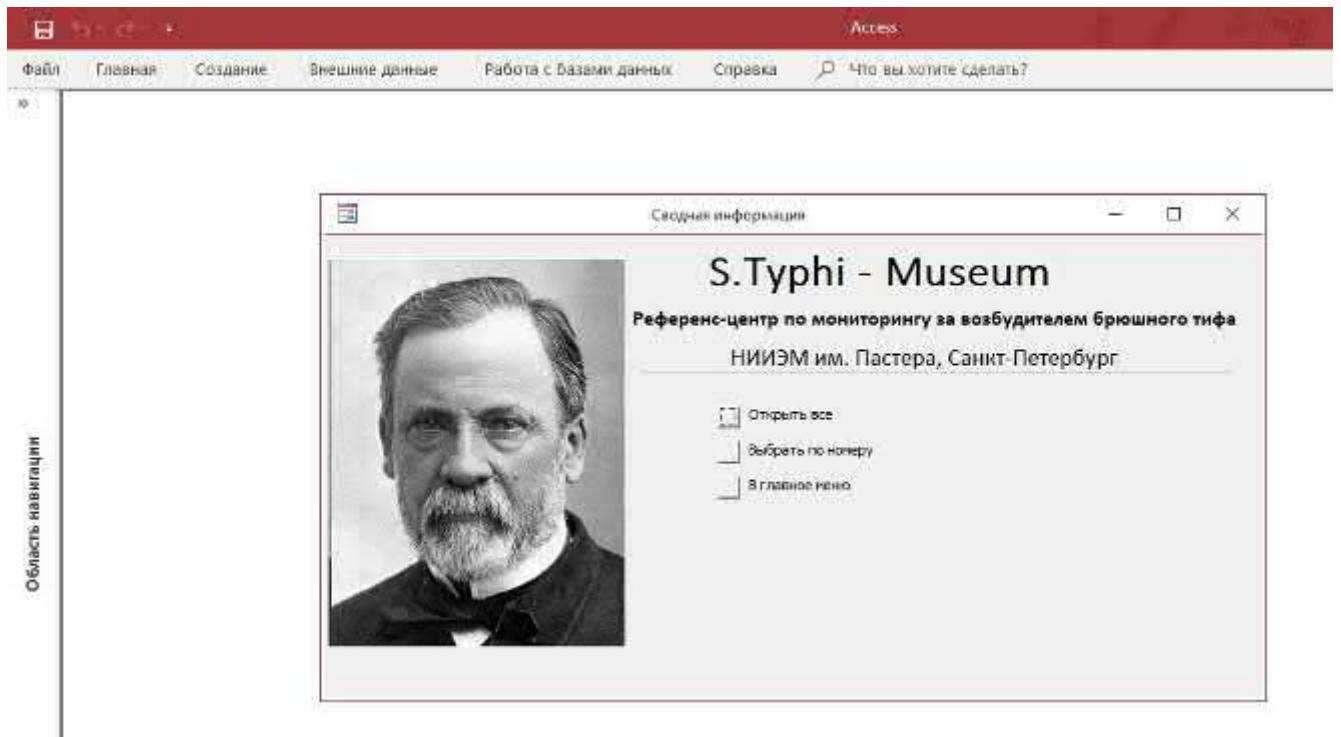


Рисунок 12 – Выбор вкладки для «Выбор по номеру»

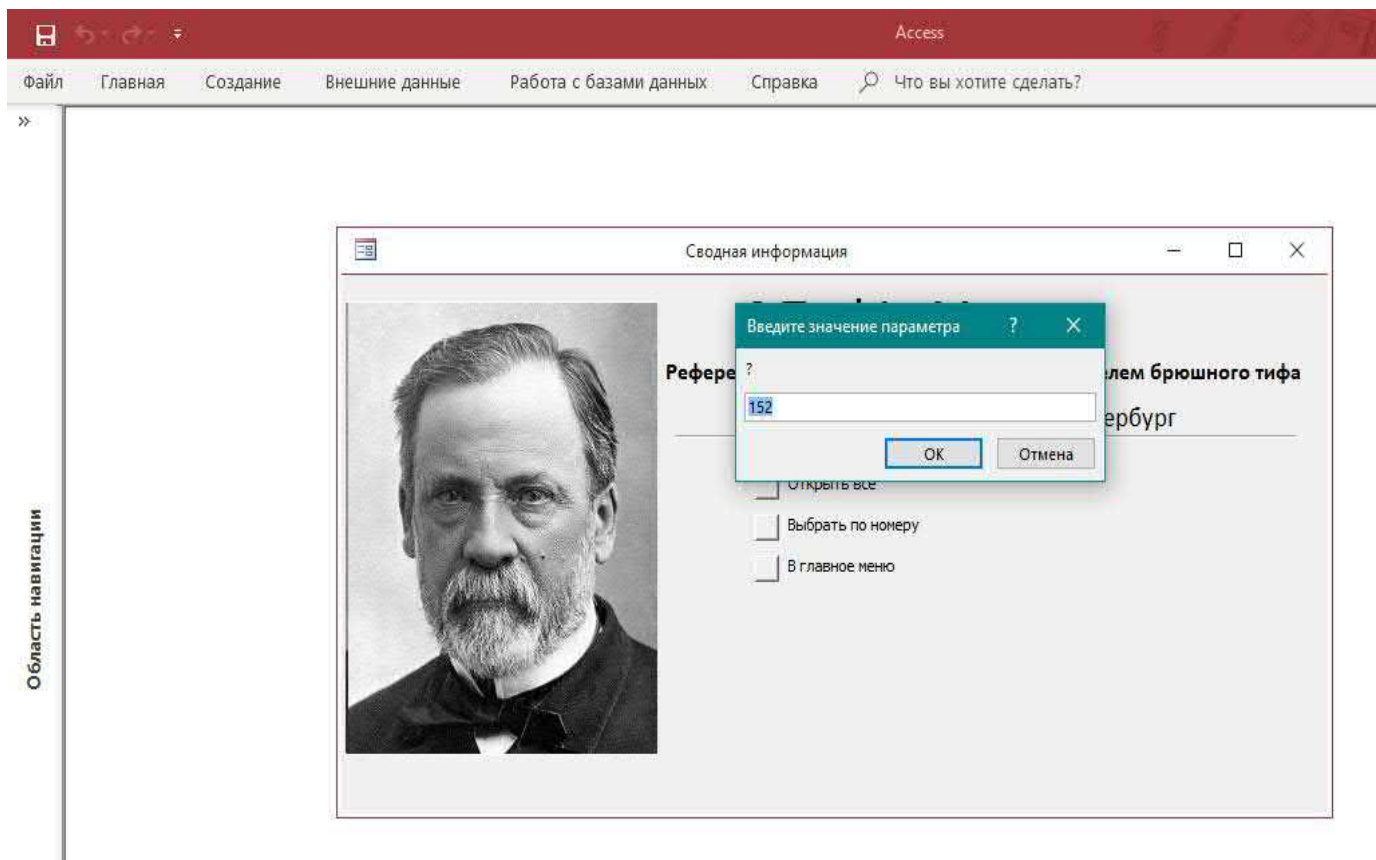


Рисунок 13 – Ввод номера штамма.

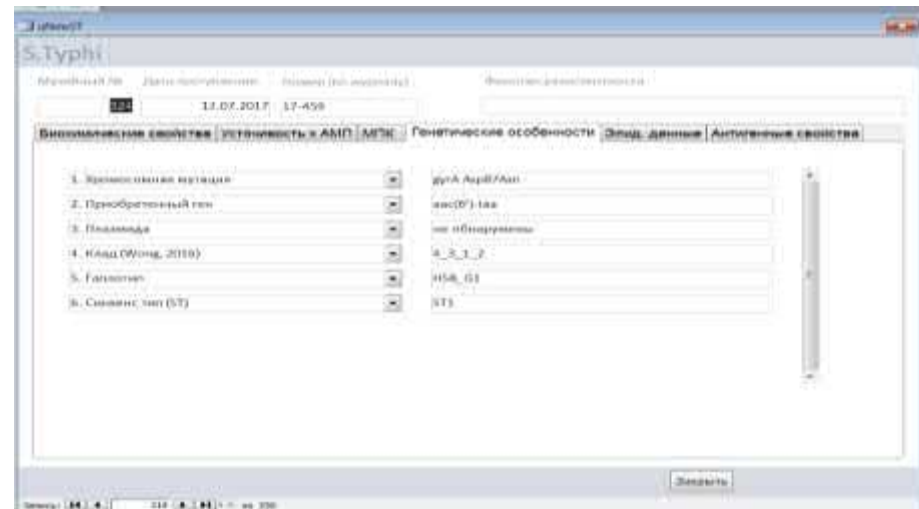
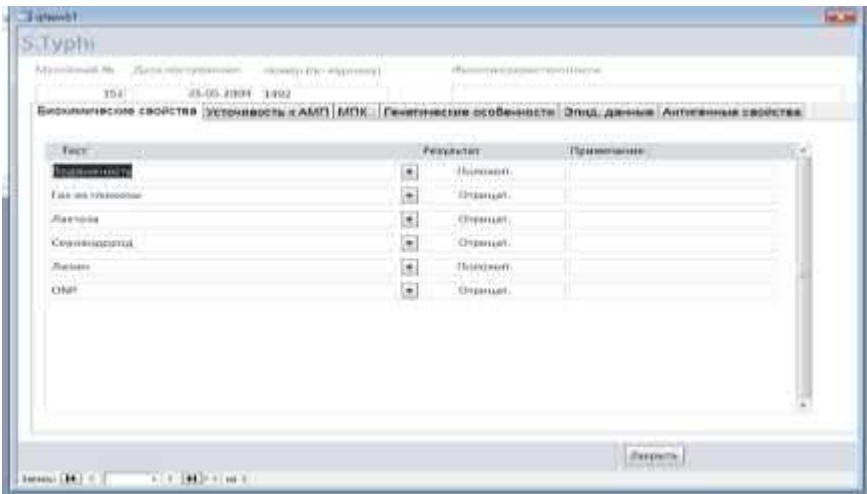
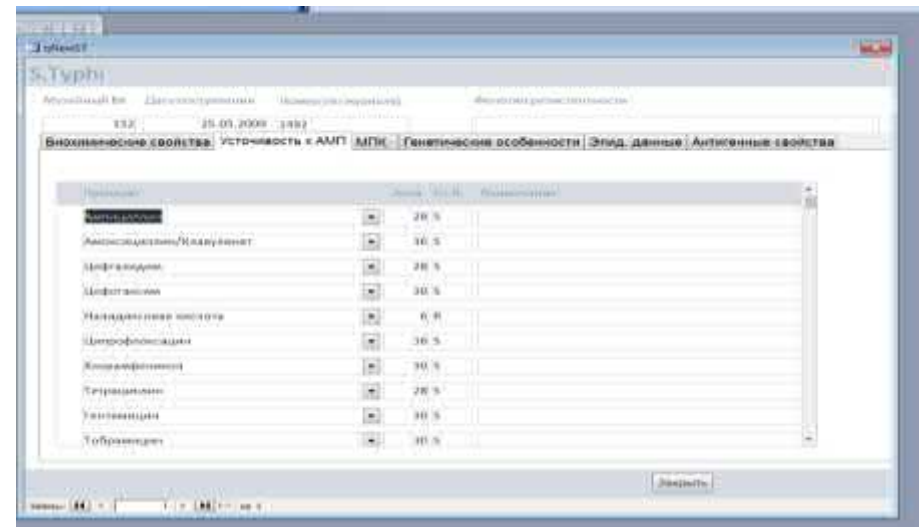
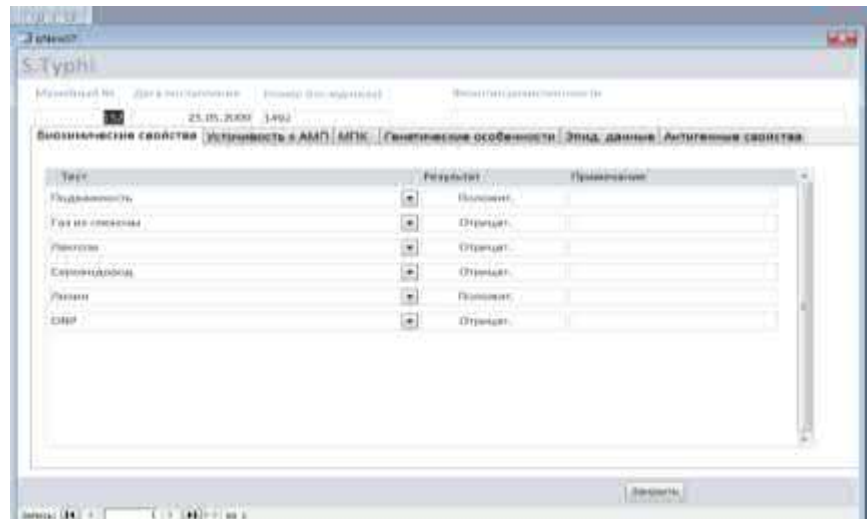


Рисунок 14 – Отдельные вкладки с характеристиками штамма.

### 3. БАЗА ДАННЫХ «S.TYPHI – MUSEUM: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ»

Свидетельство о регистрации базы данных 2020620406 Российская Федерация. S. Typhi-Museum: молекулярные детерминанты резистентности / Егорова С.А., Кафтырева Л.А.; заявитель и правообладатель: ФБУН НИИЭМ имени Пастера (RU). - № 2020620236; заявл. 20.02.2020; опублик. 03.03.2020.

*Состав базы данных:* создана в среде Microsoft Excel (версия для MSWindows 98/2000/XP/Vista/7/10); содержит информацию о 299 штаммах *Salmonella* Typhi, выделенных в РФ в 2005-2019 гг. Информация систематизирована по следующим разделам: сиквенс-типы cgMLST; хинолоны; плазмиды; плазмиды – GenBank; MDR-штаммы. Каждый раздел представлен на отдельной вкладке (листе) в файле Excel и содержит уникальные номера штаммов *Salmonella* и соответствующие характеристики каждого штамма.

*Область применения базы данных.* База данных содержит информацию, необходимую для проведения эпидемиологического надзора за брюшным тифом. Предназначена для использования учреждениями Роспотребнадзора в системе эпидемиологического надзора за брюшным тифом, а также научно-исследовательскими организациями при изучении механизмов резистентности *Salmonella* к антимикробным препаратам.

*Описание базы данных.*

1. Раздел «Сиквенс-типы cgMLST» включает уникальный номер штамма в базе данных, а также результаты анализа данных полногеномного секвенирования методом cgMLST. Для каждого штамма представлена полная информация относительно числа проанализированных локусов и полученных аллелей для каждого локуса, а также уникальный номер сиквенс-типа. Кроме того, добавлена информация о фенотипах резистентности, хромосомных мутациях, генетических группах возбудителя (кладах) и сиквенс-типе, полученном методом «классического» MLST (Рисунок 15).

номер штамма	Total number of loci	Number of called alleles	% Called alleles	cgST	Allele matches in cgST	% Allele matches	фенотип	мутации	клада (Wong)	глоб. филогения	MLST (7 bk-genes)
159	3002	1519	50.6	12589	1501	50.0	S	WT	1.2.1	nonH58_S7	ST2
164	3002	1848	61.56	57740	1843	61.39	FQ-LLR	ggtA p.D87N	4.3.1.1	H58_G2	ST1
181	3002	1330	44.3	36935	1326	44.17	FQ-LLR	ggtA p.D87N	4.3.1.1	H58_G2	ST1
183	3002	1493	49.73	10741	1488	49.57	FQ-LLR	ggtA p.D87N	4.3.1.1	H58_G3	ST1
185	3002	1909	63.59	38477	1872	62.36	S	WT	2.3.2	nonH58_S7	ST2
190	3002	1847	61.53	12716	1824	60.76	S	WT	1.2.1	out_G6	ST2
203	3002	1556	51.83	12589	1543	51.4	S	WT	1.2	out_G6	ST2
212	3002	1427	47.53	58972	1423	47.4	S	WT	3.0.1	nonH58_G4	ST2
214	3002	1801	59.99	37104	1794	59.76	FQ-LLR	ggtA p.D87N	4.3.1.1	H58_G3	ST1
215	3002	2008	66.89	34873	1998	66.56	FQ-LLR	ggtA p.D87N	4.3.1.1	H58_G3	ST1
216	3002	1606	53.5	37158	1600	53.3	S	WT	3.0.1	nonH58_G4	ST2
218	3002	1368	45.57	37655	1362	45.37	FQ-LLR	ggtA p.D87N	4.3.1.1	H58_G2	ST1
219	3002	1799	59.93	57717	1760	58.63	S	WT	1.2	out_G6	ST2
223	3002	1794	59.76	57740	1792	59.69	FQ-LLR	ggtA p.D87N	4.3.1.1	H58_G3	ST1
224	3002	1752	58.36	65422	1728	57.56	S	WT	1.2.1	out_G6	ST2
225	3002	2233	74.38	9140	2229	74.25	FQ-HLR	ggtA p.S80F, ggtA p.D87N, ggtC p.S80I	4.3.1.2	H58_G1	ST1

Рисунок 15 – Раздел «Сиквенс-типы cgMLST»

2. Раздел «Хинолоны» содержит уникальные номера штаммов, соответствующий фенотип резистентности к хинолонам (FQ-LLR – устойчивость низкого уровня, S- чувствительный, MDR-FQ\_LLRLR – множественная устойчивость к антибиотикам, включая устойчивость низкого уровня к хинолонам) и информацию о молекулярных детерминантах устойчивости к хинолонам: хромосомных мутациях и приобретенной резистентности (плазмидах). Мутации описаны в виде аминокислотных и олигонуклеотидных замен, для каждой мутации дана работающая ссылка на научную статью. Приобретенная резистентность представлена геном, описанием контига и его расположения в контиге и работающей ссылкой на научную литературу (Рисунок 16).

3. Раздел «Плазмиды» содержит уникальные номера штаммов и соответствующую им информацию о плазмидах этих штаммов. Для каждой плазмиды представлен показатель идентичности с имеющимися в международных базах данных, размер, номер контига и положение плазмиды в контиге, а также номер в GenBank, который является работающей ссылкой (Рисунок 17).

4. Раздел «Плазмиды-GenBank» содержит общую информацию о референсных плазмидах, представленных в GenBank: номер, являющийся работающей ссылкой; перечисление генов, которые локализованы на данной плазмиде, с описанием их функций; указание продукта данного гена (Рисунок 18).

5. Раздел «MDR-штаммы» содержит сводную информацию о штаммах S.Typhi с множественной резистентностью к антибиотикам. Перечислены хромосомные мутации, приобретенные гены резистентности и соответствующие им плазмиды. Раздел также включает работающие ссылки на соответствующие разделы GenBank или научную литературу (Рисунок 19).

№ штамма	Фенотип резистентности к фторхинолонам	Хромосомные мутации				Приобретенная резистентность к хинолонам								
		Mutation	Nucleotide change	Amino acid change	Resistance gene	PMID	Resistance gene	Identity	Query	INSF	Contig	Position in contig	Phenotype	Accession no.
35	FQ-LLR	gyrA Asp87Asn	GAC → AAC	D → N	Quinolones	15848289								
37	S	parE Val61Gly	GTC → GGC	V → G	Quinolones	18258817								
67	MDR-FQ-LLR	gyrA Ser83Tyr	TCC → TAC	S → Y	Quinolones	15848289								
70	FQ-LLR	gyrA Asp87Asn	GAC → AAC	D → N	Quinolones	15848289								
73	FQ-LLR	gyrA Asp87Asn	GAC → AAC	D → N	Quinolones	15848289								
85	S				not found									
86	MDR-FQ-LLR	gyrA Asp87Asn	GAC → AAC	D → N	Quinolones	15848289								
87	FQ-LLR	gyrA Asp87Asn	GAC → AAC	D → N	Quinolones	15848289								
92	FQ-LLR	gyrA Asp87Asn	GAC → AAC	D → N	Quinolones	10471913								
95	FQ-LLR	gyrA Asp87Asn	GAC → AAC	D → N	Quinolones	15848289								
98	FQ-LLR	gyrA Asp87Asn	GAC → AAC	D → N	Quinolones	15848289								
103	FQ-LLR	gyrA Asp87Asn	GAC → AAC	D → N	Quinolones	15848289								
264	FQ-LLR				not found		qnrX1	100.00	457/427	NC_027307.1	length_307_cov_67_7254_41	1..427		AB187514
269	FQ-LLR	gyrA Asp87Asn	GAC → AAC	D → N	Quinolones	15848289								
272	FQ-LLR	gyrA Asp87Asn	GAC → AAC	D → N	Quinolones	15848289								
276	FQ-LLR	gyrA Asp87Asn	GAC → AAC	D → N	Quinolones	15848289								
293	MDR-FQ-LLR	gyrA Asp87Asn	GAC → AAC	D → N	Quinolones	15848289								
295	FQ-LLR	gyrA Asp87Asn	GAC → AAC	D → N	Quinolones	15848289								
299	S				not found									
300	FQ-LLR	gyrA Asp87Asn	GAC → AAC	D → N	Quinolones	15848289								
		gyrA Ser51Phe	TCC → TTC	S → F	Quinolones	15848289								

Рисунок 16 – Раздел «Хинолоны»

№ плазмиды	Plasmid	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Note	Accession number
35				not found			
37				not found			
67	IncIIIa	99.76	420 / 420	NODE_263 length 3159 cov 14.779996	2900..3319	S. typhi R27 plasmid	AF250878
	IncIII(B/R27)	100	540 / 540	NODE_18 length 20231 cov 15.626464	16218..16757	S. typhi R27 plasmid	AF250878
70	IncQ1	100	529 / 796	NODE_190 length 1505 cov 16.314285	983..1511	E. coli plasmid RSF1010	MG8829.1
73	IncY	99.74	765 / 765	NODE_1916 length 1054 cov 13.773245	191..955	Enterobacteria phage P1	K02380
85				not found			
86	Inc IIIa	99.76	420 / 420	NODE_160 length 18293 cov 13.002241	11480..11899	S. typhi R27 plasmid	AF250878
	IncIII(B/R27)	100	540 / 540	NODE_101 length 5563 cov 13.461442	1519..2058	S. typhi R27 plasmid	AF250878
	IncY	99.74	765 / 765	NODE_1141 length 984 cov 12.375000	43..807	Enterobacteria phage P1	K02380
87	IncIIIa	99.76	420 / 420	NODE_26 length 34744 cov 96.545784	11462..11881		AF250878
	IncIII(B/R27)	100	540 / 540	NODE_54 length 20815 cov 107.300987	12164..12703	R27	AF250878
	IncQ1	100	529 / 796	NODE_71 length 4415 cov 80.480287	25..553		MG8829.1
	IncY	99.74	765 / 765	NODE_41 length 60156 cov 149.461838	42498..43262		K02380
92	IncIIIa	99.76	420 / 420	NODE_227 length 16657 cov 83.789940	4850..5269		AF250878
	IncIII(B/R27)	100	540 / 540	NODE_147 length 17754 cov 94.135971	9020..9568	R27	AF250878
	IncQ1	100	529 / 796	NODE_132 length 4415 cov 147.381195	25..553		MG8829.1
	IncY	99.74	765 / 765	NODE_94 length 71163 cov 125.692169	8290..9054		K02380
95				not found			
98				not found			

Рисунок 17 – Раздел «Плазмиды»

Название плазмиды	Accession number	Описание в GenBank	Гены	Функции	Продукт гена
IncIII(B/R27)-IncIIIa	AF250878	Salmonella typhi R27 plasmid complete sequence	trfR trfA trfC trfD	regulatory function transport regulatory function hypothetical protein	tetracycline repressor protein tetracycline sequestrate protein tetracycline transcriptional regulator hypothetical protein
IncS	AY036276	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium plasmid R46, complete sequence	ana2 sulI trfR trfA ant1	hydrolysis of beta lactam antibiotics, confers resistance to beta lactam antibiotics confers resistance to sulphonamides tetracycline repressor protein tetracycline resistance protein acyclation of streptomycin and spectinomycin, confers streptomycin and spectinomycin	OXA-2 beta-lactamase precursor sulI dihydropteroate synthase tetracycline repressor protein tetracycline resistance protein aminoglycoside (1')-adenyl-transferase
IncX1	EU70813	Escherichia coli plasmid pOLA52, complete sequence	bla ompB ompA	component of RND-type antibiotic efflux pump that confers resistance to chloramphenicol component of RND-type antibiotic efflux pump that confers resistance to chloramphenicol	Beta-lactamase TEM protease OmpB integral membrane protein OmpA membrane fusion protein
IncX2	Q326034	Escherichia coli plasmid pNGX2-QuS1, complete sequence			TEM-1
IncQ1	MG8829.1	Escherichia coli plasmid RSF1010, complete sequence			correction GenBank to reflect accurate name reassignment set
IncY	K02380	Enterobacteria phage P1 RepA (repA), RepA (repA), and PoriB (poriB) genes			correction GenBank - no RepAa, TRK, name reassignment set

Рисунок 18 – Раздел «Плазмиды-GenBank»



№	Хромосомные штаммы					Приобретенные гены резистентности						Плазмиды					
	Имя штамма	Участок генома	Дата	Место	Тип	Ген	Локация	Функция	Ссылка	Имя плазмиды	Размер	Дата	Место	Тип	Ссылка		
1	MDR-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
2	MDR-2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
3	MDR-3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
4	MDR-4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
5	MDR-5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
6	MDR-6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
7	MDR-7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
8	MDR-8	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
9	MDR-9	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
10	MDR-10	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
11	MDR-11	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
12	MDR-12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
13	MDR-13	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
14	MDR-14	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
15	MDR-15	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
16	MDR-16	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
17	MDR-17	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
18	MDR-18	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
19	MDR-19	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
20	MDR-20	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		

Рисунок 19 – Раздел «MDR-штаммы»

Управление базой данных осуществляется через систему фильтров Microsoft Excel, позволяющую выбрать характеристики, присущие для конкретного штамма, а систему гиперссылок на научные статьи как источник дополнительной информации.

#### Пример использования базы данных

Для получения научной информации о плазмиде, обнаруженной у штамма, выполнить следующие действия:

1. Открыть базу данных, перейти на вкладку «Плазмиды».
2. Выбрать интересующую строчку и перейти по гиперссылке (Рисунок 20).

Плазмиды							
№ штамма	Plasmid	Identity	Query / Template length	Count	Position in config	Note	Accession number
35				not found			
37				not found			
67	IncH11A IncH11B(R27)	99.76 100	420 / 420 540 / 540	NODE_263_length_5159_cov_14.779996 NODE_18_length_20231_cov_15.626464	2900_3319 16216_16737	S. typhi R27 plasmid S. typhi R27 plasmid	AF250878 AF250878
70	IncQ1 IncY	100 99.74	529 / 796 765 / 765	NODE_190_length_1505_cov_16.314285 NODE_1916_length_1054_cov_13.773245	983_1511 191_985	E. coli plasmid RSF1010 Enterobacteria phage P1	
73				not found			
85				not found			
86	IncH11A IncH11B(R27)	99.76 100	420 / 420 540 / 540	NODE_160_length_18295_cov_13.002241 NODE_101_length_5563_cov_13.461442	11480_11899 1519_2058	S. typhi R27 plasmid S. typhi R27 plasmid	AF250878 AF250878
	IncY	99.74	765 / 765	NODE_1141_length_964_cov_12.375000	43_807	Enterobacteria phage P1	K02380
	IncH11A	99.76	420 / 420	NODE_26_length_14744_cov_96.545784	11462_11881		AF250878
	IncH11B(R27)	100	540 / 540	NODE_54_length_20815_cov_107.300947	12163_12703	R27	AF250878
	IncQ1	100	529 / 796	NODE_71_length_4415_cov_50.450287	25_553		M21829.1
	IncY	99.74	765 / 765	NODE_41_length_60156_cov_149.461838	42498_43262		K02380
	IncH11A	99.76	420 / 420	NODE_227_length_16657_cov_83.789940	4450_5269		AF250878
	IncH11B(R27)	100	540 / 540	NODE_147_length_17754_cov_94.135971	9029_9568	R27	AF250878
	IncQ1	100	529 / 796	NODE_112_length_4415_cov_147.381195	25_553		M21829.1
	IncY	99.74	765 / 765	NODE_94_length_71163_cov_125.692169	8290_9054		K02380
95				not found			
98				not found			

Рисунок 20 – Поиск информации

3. В раскрывающемся окне появится необходимая информация из GenBank (Рисунок 21).

Salmonella typhi R27 plasmid complete sequence - Nucleotide - NCBI

Salmonella typhi R27 plasmid complete sequence

Accession: AF250878.1

Length: 5400 bp

Map: [Map]

Annotations:

- LOCUS AF250878 Salmonella typhi R27 plasmid complete sequence
- DEFINITION Salmonella typhi R27 plasmid complete sequence.
- ACCESSION AF250878
- VERSION AF250878.1
- KEYWORDS plasmid
- SOURCE Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhi (Salmonella typhi)
- ORGANISM Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhi
- REFERENCES 1. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 2. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 3. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 4. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 5. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 6. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 7. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 8. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 9. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 10. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 11. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 12. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 13. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 14. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 15. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 16. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 17. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 18. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 19. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 20. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 21. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 22. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 23. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 24. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 25. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 26. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 27. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 28. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 29. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 30. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 31. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 32. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 33. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 34. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 35. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 36. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 37. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 38. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 39. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 40. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 41. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 42. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 43. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 44. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 45. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 46. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 47. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 48. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 49. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 50. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 51. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 52. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 53. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 54. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 55. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 56. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 57. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 58. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 59. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 60. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 61. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 62. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 63. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 64. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 65. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 66. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 67. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 68. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 69. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 70. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 71. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 72. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 73. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 74. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 75. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 76. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 77. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 78. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 79. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 80. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 81. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 82. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 83. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 84. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 85. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 86. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 87. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 88. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 89. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 90. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 91. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 92. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 93. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 94. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 95. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 96. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 97. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 98. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 99. (Banc 1 to 39943) [Book]
- 100. (Banc 1 to 39943) [Book]

Рисунок 21 – Веб-страница GenBank

## Приложение 4

Распределение значений диаметра зоны подавления роста для диска пefлоксацина и МПК ципрофлоксацина штаммов *Salmonella* (абсолютное число штаммов)

МПК ЦИП мг/л	Диаметр зоны подавления роста для диска пefлоксацина (5 мкг), мм																								Всего штаммов			
	6	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33		36	40	
> 32,0	8																											8
8,0	5																											5
4,0	3																											3
0,5		1		1			1		4	2	2																	11
0,25			1		3	5	4	7	11	23	17	6	4	1	3 <sup>1</sup>													85
0,12						1	4	3	15	25	37	20	11	6	3 <sup>1</sup>													125
0,06									1 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>		1 <sup>2</sup>		1	1	1		1	1								10
0,032																	3			4			1	1				9
0,016																2	6	3	1	6	7	3				1		29
0,008																1	3	1	6	2	3	1	3					20
0,004																1				1	1	1					1	5
Всего штаммов	16	1	1	1	3	6	9	10	31	52	57	26	16	7	7	5	13	4	8	14	11	5	4	1	1	1	310	

Примечание: ЦИП – ципрофлоксацин; <sup>1</sup> при многократном повторном тестировании штаммов, значения диаметра зоны подавления роста колебались от 22 до 24 мм; <sup>2</sup> при повторном тестировании методом микроразведений в бульоне МПК составила 0,12 мг/л;

Пограничные значения (согласно EUCAST и КР 2018): МПК ципрофлоксацина:  $S \leq 0,06$  мг/л,  $R > 0,06$  мг/л; диаметр зоны подавления роста пefлоксацина (скрининг):  $S \geq 24$  мм,  $R < 24$  мм;

■ – диапазоны значений, относящиеся к категории R, ■ – к категории S; ■ штаммы, для которых двумя методами получены противоречивые результаты

## Приложение 5

Распределение значений диаметра зоны подавления роста для диска налидиксовой кислоты и МПК ципрофлоксацина штаммов *Salmonella* (абсолютное число штаммов)

МПК ЦИП, мг/л	Диаметр зоны подавления роста для диска налидиксовой кислоты (30 мкг), мм																								Всего штаммов		
	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	30	31	32		35	38
> 32,0	11			1																							12
16,0	1																										1
8,0	6		1																								7
4,0	1																										1
1,0	1																										1
0,5	11																										11
0,25	71	4	3	2	8	3	3	3	2		1 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>													102	
0,12	155	2	5	7	7	5	11	3	11																		206
0,06	5 <sup>2</sup>									1						1		1	1								9
0,032														2		1	1	1	1	2							8
0,016													1	1	2	5	2	4	7	2	1	4			1		30
0,008														3	2	3		2		4	2	4	1	5		1	27
0,004															1		1		1	1		1					5
Всего штаммов	262	6	9	10	15	8	14	6	13	1	1	2	2	5	10	6	2	7	10	9	5	9	1	5	1	1	420

Примечание: ЦИП – ципрофлоксацин; <sup>1</sup> штаммы *Salmonella*, у которых в ходе дальнейших исследований выявлена плазмидоопосредованная резистентность к хинолонам (*qnrS*); <sup>2</sup> при повторном тестировании методом микроразведений в бульоне МПК составила 0,12 мг/л;

Пограничные значения (согласно EUCAST и КР 2018): МПК ципрофлоксацина: S ≤ 0,06 мг/л, R > 0,06 мг/л, диаметр зоны подавления роста налидиксовой кислоты (скрининг): WT ≥ 16 мм, не-WT < 16 мм;

■ – диапазоны значений, относящиеся к категории R, ■ – к категории S; ■ – штаммы, для которых двумя методами получены противоречивые результаты

## Приложение 6

Распределение значений диаметра зоны подавления роста для диска ципрофлоксацина и МПК ципрофлоксацина штаммов *Salmonella* (абсолютное число штаммов)

МПК ЦИП, мг/л	Диаметр зоны подавления роста для диска ципрофлоксацина (5 мкг), мм																								Всего штаммов				
	6	9	11	12	13	14	15	16	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		37	38	39	40
> 32,0	5	1	1	1	1	1	1	1																					12
8	2	1	1	1	1	1																							7
4						2																							2
1					1		1																						2
0,5										5		3		4	5	9	2	9	3	9	1	1		1					52
0,25								2	1	2	4	5	3	4	10	8	5	9	1	4	2	2	1	1		1			65
0,12											1	1	3	9	18	27	22	16	8	16	1	8	3	8	1	2		2	146
0,06																			1	1	1								3
0,03																				1		1				1			3
0,016																1			1		1	2	3	5		4		17	
0,008																	1			1				3		2	1	4	12
0,004																						1		2			1	1	5
Всего штаммов	7	2	2	2	3	4	1	4	1	7	5	9	6	17	33	45	29	35	14	32	6	15	7	20	1	10	2	7	326

Примечание: ЦИП – ципрофлоксацин; Пограничные значения (согласно CLSI 2018): МПК ципрофлоксацина:  $S \leq 0,06$  мг/л,  $I = 0,12-0,5$  мг/л,  $R \geq 1,0$  мг/л; диаметр зоны подавления роста ципрофлоксацина:  $S \geq 31$  мм,  $I = 21-30$ ,  $R \leq 20$  мм

■ – диапазоны значений, относящиеся к категории R, ■ – к категории S, ■ – к категории I; ■ – штаммы, для которых двумя методами получены противоречивые результаты

Частота выделения штаммов *Salmonella*, устойчивых к индикаторным хинолонам

Хинолон	Метод тестирования	Всего n= 1045			<i>Salmonella</i> «не-тифоидных» сероваров n=746			<i>S. Typhi</i> n=299		
		абс.	на 100 иссл.	95% ДИ	абс.	на 100 иссл.	95% ДИ	абс.	на 100 иссл.	95% ДИ
Налидиксовая кислота	ДДМ, МПК	737	70,5	67,7-73,2	470	63,0	59,5-66,4	267	89,3	85,3-92,3
Пефлоксацин	ДДМ	740	70,8	68,0-73,5	472	63,3	59,8-66,7	268	89,6	85,7-92,6
Ципрофлоксацин	МПК	740	70,8	68,0-73,5	472	63,3	59,8-66,7	268	89,6	85,7-92,6

Примечание: ДДМ – диско-диффузионный метод, МПК – методы градиентных концентраций и последовательных микроразведений в бульоне

Молекулярная характеристика штаммов *S. Typhi*, выделенных в РФ в 2005-2019 гг., по наличию мутаций в генах *gyrA*, *gyrB* и *parC*

№ п/п	№ штамма	Год выделения	Территория	Фенотип рез-ти к ФХ	Нуклеотидная замена/ Аминокислотная замена		
					<i>gyr A</i>	<i>gyr B</i>	<i>parC</i>
1.	37	2005	Иркутская область	S	WT	WT	WT
2.	85	2006	Санкт-Петербург	S	WT	WT	WT
3.	119	2007	Санкт-Петербург	S	WT	WT	WT
4.	120	2007	Санкт-Петербург	S	WT	WT	WT
5.	147	2008	Санкт-Петербург	S	WT	WT	WT
6.	151	2009	Орловская область	S	WT	WT	WT
7.	154	2009	Ленинградская область	S	WT	WT	WT
8.	236	2011	Санкт-Петербург	S	WT	WT	WT
9.	248	2012	Санкт-Петербург	S	WT	WT	WT
10.	257	2012	Иркутская область	S	WT	WT	WT
11.	299	2014	Ленинградская область	S	WT	WT	WT
12.	118	2006	Санкт-Петербург	S	A1612G/Asn538Asp <sup>1</sup>	WT	WT
13.	185	2010	Ульяновская область	S	A1612G/Asn538Asp <sup>1</sup>	WT	WT
14.	212	2010	Санкт-Петербург	S	A1612G/Asn538Asp <sup>1</sup>	WT	WT
15.	216	2011	Санкт-Петербург	S	A1612G/Asn538Asp <sup>1</sup>	WT	WT
16.	219	2011	Санкт-Петербург	S	A1612G/Asn538Asp <sup>1</sup>	WT	WT
17.	250	2012	Кемеровская область	S	A1612G/Asn538Asp <sup>1</sup>	WT	WT
18.	251	2012	Кемеровская область	S	A1612G/Asn538Asp <sup>1</sup>	WT	WT
19.	258	2012	Санкт-Петербург	S	A1612G/Asn538Asp <sup>1</sup>	WT	WT
20.	203	2010	Санкт-Петербург	S	WT	C627T <sup>2</sup> +T818A/ синон. + Ile273Asn <sup>1</sup>	WT
21.	159	2009	Санкт-Петербург	S	A1612G/Asn538Asp <sup>1</sup>	C627T <sup>2</sup> +T818A/ синон. + Ile273Asn <sup>1</sup>	WT
22.	224	2011	Московская область	S	A1612G/Asn538Asp <sup>1</sup>	C627T <sup>2</sup> +T818A/ синон. + Ile273Asn <sup>1</sup>	WT

## Продолжение приложения 8

№ п/п	№ штамма	Год выделения	Территория	Фенотип рез-ти к ФХ	Нуклеотидная замена/ Аминокислотная замена		
					<i>gyr A</i>	<i>gyr B</i>	<i>parC</i>
23.	190	2010	Санкт-Петербург	S	A1612G/Asn538Asp <sup>1</sup>	C627T <sup>2</sup> +T818A/ синон. + Pe273Asn <sup>1</sup>	WT
24.	2	2005	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
25.	6	2005	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
26.	10	2005	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
27.	34	2005	Иркутская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
28.	35	2005	Иркутская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
29.	44	2006	Ленинградская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
30.	46	2006	Ленинградская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
31.	62	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
32.	70	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
33.	73	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
34.	83	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
35.	86	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
36.	95	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
37.	96	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
38.	97	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
39.	98	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
40.	99	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
41.	100	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
42.	101	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
43.	102	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
44.	103	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
45.	104	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
46.	105	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
47.	106	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
48.	107	2006	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
49.	121	2007	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT



## Продолжение приложения 8

№ п/п	№ штамма	Год выделения	Территория	Фенотип рез-ти к ФХ	Нуклеотидная замена/ Аминокислотная замена		
					<i>gyr A</i>	<i>gyr B</i>	<i>parC</i>
50.	122	2007	Новгородская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
51.	124	2007	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
52.	131	2007	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
53.	133	2007	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
54.	134	2007	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
55.	137	2008	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
56.	138	2008	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
57.	150	2009	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
58.	157	2009	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
59.	162	2009	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
60.	164	2009	Ханты-Мансийский АО	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
61.	178	2010	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
62.	181	2010	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
63.	183	2010	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
64.	188	2010	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
65.	213	2011	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
66.	214	2011	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
67.	215	2011	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
68.	218	2011	Еврейская АО	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
69.	221	2011	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
70.	223	2011	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
71.	240	2012	Новгородская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
72.	247	2012	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
73.	252	2012	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
74.	253	2012	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
75.	254	2012	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
76.	256	2012	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT

## Продолжение приложения 8

№ п/п	№ штамма	Год выделения	Территория	Фенотип рез-ти к ФХ	Нуклеотидная замена/ Аминокислотная замена		
					<i>gyr A</i>	<i>gyr B</i>	<i>parC</i>
77.	261	2012	Хабаровский край	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
78.	267	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
79.	268	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
80.	269	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
81.	270	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
82.	271	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
83.	272	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
84.	273	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
85.	274	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
86.	275	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
87.	276	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
88.	277	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
89.	278	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
90.	279	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
91.	280	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
92.	281	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
93.	282	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
94.	283	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
95.	287	2013	Московская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
96.	293	2013	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
97.	295	2014	Воронежская область	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
98.	300	2014	Санкт-Петербург	R-LL	G259A/Asp87Asn	WT	WT
99.	40	2005	Иркутская область	R-LL	C248A/ Ser83Tyr	WT	WT
100.	67	2006	Санкт-Петербург	R-LL	C248A/ Ser83Tyr	WT	WT
101.	110	2006	Санкт-Петербург	R-LL	C248A/ Ser83Tyr	WT	WT
102.	217	2011	Иркутская область	R-LL	C248A/ Ser83Tyr	WT	WT
103.	229	2011	Архангельская область	R-LL	C248A/ Ser83Tyr	WT	WT
104.	231	2011	Тульская область	R-LL	C248A/ Ser83Tyr	WT	WT
105.	235	2011	Санкт-Петербург	R-LL	C248A/ Ser83Tyr	WT	WT

## Продолжение приложения 8

№ п/п	№ штамма	Год выделения	Территория	Фенотип рез-ти к ФХ	Нуклеотидная замена/ Аминокислотная замена		
					<i>gyr A</i>	<i>gyr B</i>	<i>parC</i>
106.	255	2012	Санкт-Петербург	R-LL	C248T + A1612G <sup>1</sup> / Ser83Phe + Asn538Asp <sup>1</sup>	WT	WT
107.	130	2007	Санкт-Петербург	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
108.	225	2011	Калининградская область	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
109.	226	2011	Калининградская область	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
110.	227	2011	Калининградская область	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
111.	230	2011	Смоленская область	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
112.	241	2012	Калининградская область	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
113.	242	2012	Калининградская область	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
114.	243	2011	Калининградская область	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
115.	259	2012	Калининградская область	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
116.	262	2013	Санкт-Петербург	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
117.	263	2013	Санкт-Петербург	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
118.	298	2014	Воронежская область	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
119.	301	2015	Кировская область	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
120.	315	2015	Архангельская область	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
121.	317	2016	ХМОА	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
122.	318	2016	ХМАО	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile
123.	319	2017	Воронежская область	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ile

## Продолжение приложения 8

№ п/п	№ штамма	Год выделения	Территория	Фенотип рез-ти к ФХ	Нуклеотидная замена/ Аминокислотная замена		
					<i>gyr A</i>	<i>gyr B</i>	<i>parC</i>
124.	321	2017	Санкт-Петербург	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ple
125.	323	2017	Красноярский край	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ple
126.	331	2018	Санкт-Петербург	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ple
127.	332	2019	Удмуртия	R-HL	C248T + G259A/ Ser83Phe + Asp87Asn	WT	G239T/Ser80Ple
128.	335	2019	Смоленская область	R-HL	C248T/ Ser83Phe	WT	A251G/Glu84Gly

Примечание: ФХ – фторхинолоны; R-LL – resistance low-level, устойчивость низкого уровня (МПК ципрофлоксацина 0,094 - 0,5 мг/л)

R-HL – resistance high-level, устойчивость высокого уровня (МПК ципрофлоксацина 4,0 -32,0 мг/л и более)

ХМАО – Ханты-Мансийский автономный округ; <sup>1</sup> мутация за пределами QRDR-региона; <sup>2</sup> синонимичная нуклеотидная замена Asn209Asn.