

Егорова Светлана Александровна

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

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание
ученой степени доктора медицинских наук

Санкт-Петербург – 2020

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера)

Научный консультант:

Доктор медицинских наук

Кафтырева Лидия Алексеевна

Официальные оппоненты:

Суворов Александр Николаевич – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», отдел молекулярной микробиологии, заведующий

Припутневич Татьяна Валерьевна – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, институт микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии, директор

Багирова Наталия Сергеевна – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, микробиологическая лаборатория, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «__» _____ 2021 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Ольга Юрьевна Борисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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% вспышек были вызваны бактериями рода *Salmonella* (The EU summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017; The EU One Health 2018 Zoonoses Report). В последние годы во многих странах отмечен рост доли резистентных к антимикробным препаратам штаммов *Salmonella*, выделенных от людей, животных и из пищевых продуктов. Штаммы *Salmonella*, устойчивые к фторхинолонам, препаратам выбора при лечении сальмонеллезов, включены в список «приоритетных патогенов» ВОЗ, антибиотикорезистентность которых представляет угрозу для здоровья человека (URL: <http://www.who.int/ru/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>). В разных странах доля таких штаммов для некоторых сероваров достигает 90,0% (URL: <https://www.cdc.gov/narmsnow>; The EU summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017). Глобальная популяция возбудителя брюшного тифа, включая штаммы *S. Typhi*, завозимые на территорию РФ, в основном представлена устойчивыми к хинолонам штаммами (Kuijpers L.M.F. et al., 2017; Rahman S.I.A. et al., 2019). 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 (The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms v. 2.0). Широкое использование антибиотиков в сельском хозяйстве способствует эволюции общих для человека и животных возбудителей путем приобретения детерминант резистентности (Williams-Nguyen J. et al., 2016). Международный туризм и торговля, перемещения животных и птиц, особенности технологии сельского хозяйства и производства пищевых продуктов приводят к глобальному распространению устойчивых штаммов и возникновению эпидемиологически связанных заболеваний в различных регионах мира (Fonteneau L. et al., 2017; Baker S. et al., 2018). Антимикробные препараты, попадающие в окружающую среду, способствуют формированию резистентных штаммов и обмену генетической информацией между представителями различных родов и видов бактерий (Williams-Nguyen J. et al., 2016). Таким образом, проблема устойчивости микроорганизмов к антибиотикам включает не только медицинский, но и ветеринарный, сельскохозяйственный и экологический аспекты.

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 г. до 24,22 в 2019 г.), сальмонеллезы занимают третье место (после рота- и норовирусной инфекций) в структуре очагов групповой заболеваемости с фекально-оральным механизмом передачи. В 2019 г. Правительством РФ принята Стратегия предупреждения распространения антибиотикорезистентности (URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW321959/). 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 доли штаммов с «критически важной» для медицины устойчивостью (к фторхинолонам, цефалоспорином расширенного спектра и с множественной устойчивостью к трем и более классам антибиотиков) достигают 13,0, 8,0 и 30,0% соответственно (URL: <https://www.cdc.gov/narmsnow/>; The EU summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017; CIPARS Annual Report, 2013). Российский референс-центр по мониторингу за сальмонеллезами (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) ежегодно проводит анализ сероваровой принадлежности штаммов *Salmonella*, выделенных в РФ, и изучает чувствительность к антимикробным препаратам штаммов, вызывающих групповые заболевания (Рожнова С.Ш. и др., 2013, 2015, 2017). Объективная оценка динамики устойчивости штаммов *Salmonella* в РФ, по данным опубликованных исследований, осложняется многочисленными изменениями нормативно-методических документов, касающихся определения чувствительности к антибиотикам, произошедших в последние годы (Кафтырева Л.А. 1999 г.; Ахметова Л.И. и др., 2000; Елиусизова А.Б. и др., 2010; Шитова О.И. и др., 2011; Милютин Л.Н., Гурьева О.В., 2011; Виткова О.Н. и др., 2015; Гончар Н.В. и др., 2015; Решетнева И.Т. и др., 2015; Жаркова Л.П. и др., 2017; Куземцева С.В., Михайлова О.А., 2017; Соловьева А.С. и др., 2017; Кузнецова Н.А. и др., 2018; Евмененкова И.Г. и др., 2018). В зарубежной литературе представлены данные о механизмах резистентности: у *Salmonella* описаны бета-лактамазы различных генетических семейств и хромосомные мутации, обуславливающие устойчивость к хинолонам (Madec J.Y. et al., 2017; Ranjbar R. et al., 2018; Kuang D. et al., 2018; Castellanos L.R. et al., 2018; Fernández J. et al., 2018; Jeon H.Y. et al., 2019). В РФ этой теме посвящены единичные исследования, касающиеся в основном штаммов серовара *S. Typhimurium* (Edelstein M. et al., 2004; Козырева В.К. и др., 2012; Kozyreva V.K. et al., 2014). Во многих странах выявлена циркуляция штаммов *Salmonella* международных клонов высокого риска, данные о выделении которых в РФ отсутствуют (Petrovska L. et al., 2016; Hoszowski K.L. et al., 2016; Hindermann D. et al., 2017; Gyomoese P., et al., 2017; Hawkey J. Et al., 2019). В последние годы выполнены масштабные исследования генома *S. Typhi*, предложены стандартные схемы генотипирования, созданы базы данных, содержащие информацию о штаммах возбудителя брюшного тифа, выделенных в различных регионах мира (Roumagnac P. et al., 2006; Wong V.K. et al., 2015, 2016).

Учитывая вышесказанное, представлялось актуальным оценить состояние проблемы антибиотикорезистентности штаммов *Salmonella*, выделенных в РФ, используя стандартизованные международные подходы. Для обеспечения достоверности результатов мониторинга чувствительности *Salmonella* к антибиотикам необходима разработка и внедрение оптимальных алгоритмов детекции клинически значимых молекулярных механизмов резистентности. Актуальными остаются вопросы характеристики возбудителя брюшного тифа, штаммы которого завозят на территорию РФ: оценка уровней чувствительности к клинически значимым антимикробным препаратам и филогенетического положения «российских» штаммов *S. Typhi* 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* «нетифоидных» 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-лактамам. 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) субклады 4.3.1/гаплотипа H58, устойчивого к хинолонам, 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 плазмидопосредованных 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 сальмонеллезом, 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– В9058). 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 сальмонеллезов (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), клинико-диагностической лаборатории СПб ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 5 им. Н. Ф. Филатова» (акт внедрения от 10.06.2020), бактериологического отдела клинико-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 шесть штаммов *Salmonella*, устойчивых к цефалоспорином расширенного спектра (ЦРС), выделенных в 2008-2013 гг., из проб испражнений лиц в возрасте от 18 до 80 лет (больные ОКИ, 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.

Бактериологические методы

Идентификация штаммов *Salmonella* проводилась с использованием анализатора Vitek 2 Compact (BioMérieux, Франция), а также методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) с использованием системы Microflex LRF (Bruker Daltonics, Германия). Определение антигенной структуры штаммов проводили в реакции агглютинации с сыворотками диагностическими сальмонеллезными адсорбированными к О- и Н-антигенам сальмонелл ПЕТСАЛ производства СПбНИИВС (РФ). Наименования сероваров *Salmonella enterica* spp. *enterica* писали с заглавной буквы прямым печатным шрифтом согласно укороченной номенклатуре, предложенной Коллаборативным Центром ВОЗ по сальмонеллам (Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars; www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf).

Чувствительность штаммов к антимикробным препаратам (АМП) определяли согласно Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (далее по тексту – КР) методами диско-диффузионным (ДДМ), градиентной диффузии и последовательных разведений в жидкой среде с использованием агара Мюллера-Хинтон и дисков с антибиотиками производства Oxoid (Великобритания), Е-тестов (BioMerieux, Франция), МІСЕ-тестов (Oxoid, Великобритания), тест-систем MIKROLATEST® SensiLaTest MIC GI и GII (Erba Mannheim) и Sensititre (Thermo Scientific). Категорию чувствительности оценивали согласно рекомендациям EUCAST, версия 9.0: «S» – чувствительный при стандартном режиме дозирования; «I» – чувствительный при увеличенной экспозиции; «R» – резистентный.

Молекулярно-генетические методы

Детекция генов, кодирующих механизмы резистентности (гены *bla* и *qnr*). Бактериальную ДНК выделяли набором InstaGen Matrix (BioRad). Поиск генов, кодирующих различные механизмы резистентности, проводили методом ПЦР с электрофоретической (амплификатор C1000, BioRad, США) и флуоресцентной (амплификатор CFX96, BioRad, США) детекцией продуктов амплификации, используя опубликованные праймеры и протоколы (Dallenne C. et al., 2010; Weill F.X. et al., 2005; Мудрак Д.Е., дис. ...канд. биол. наук, 2010; Robicsek A. et al., 2006; Cavaco L.M. et al., 2009; Park C.H. et al., 2006), а также используя биоинформатическую платформу Center of Genomic Epidemiology (CGE) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>), вводя данные полногеномного секвенирования штаммов в FASTA формате.

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 платформу CGE. У 39 штаммов *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров и 36 штаммов *S. Typhi* характер мутаций был установлен путем амплификации и прямого секвенирования фрагмента генов согласно протоколу Nakaya H. et al., 2003 с использованием генетического анализатора Applied Biosystem 3500 (Applied Biosystems, США). Нуклеотидные последовательности сравнивали в программе 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).

Изучение плазмидного профиля. Плазмидную ДНК штамма *S. Newport* выделяли методом щелочного лизиса (Takahashi S., Nagano Y., 1984). Рестрикционный профиль плазмиды (рестриктаза PstI) сравнивали с профилями плазмид штаммов *S. Newport* MDR AmpC/CMY-2 из коллекции Коллаборативного Центра ВОЗ по сальмонеллам (Институт Пастера, Париж) путем электрофореза в 1,0% агарозном геле при 30 V в течение 16 часов. У 9 штаммов *S. Typhi* с множественной антибиотикоустойчивостью идентифицировали плазмиды, используя платформу CGE; сиквенс-тип плазмид pHCM1 у 8 штаммов определяли, анализируя аллельное разнообразие шести локусов плазмиды (Holt K. et al,

2011): нуклеотидные последовательности, полученные в рамках полногеномного секвенирования, сравнивали с последовательностями GenBank (FJ183728 - FJ183741).

Трансформация плазмидной ДНК. Плазмидная ДНК штамма *S. Newport* путем электропорации (MicroPulser™, Bio-Rad) была трансформирована в электрокомпетентные клетки *E. coli* DH10B: 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, содержащий цефотаксим (4,0 мг/л). После инкубации при 37°C в течение 24 часов изучали колонии штамма-трансформанта.

Полногеномное секвенирование выполнено для 92 штаммов *S. Typhi* на приборе MiSeq с набором реагентов MiSeq Reagent Kit v3 600 cycles (Illumina, США). Для выделения геномной ДНК использовали DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, США), приготовления ДНК-библиотек – набор реагентов MiSeq Nextera XT Library Preparation Kit (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 программного обеспечения CLC Genomics Workbench 8.0 (QIAGEN, США).

Филогенетический анализ методом PFGE (pulse field gel electrophoresis). Изучение профилей рестрикции 107 штаммов *S. Typhi* проводили согласно протоколу PulseNet (URL: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/mlva.html>) с рестриктазой XbaI на оборудовании CHEF Mapper (BioRad, США). Результаты визуализировали в гель-документирующей системе Gel Doc XR System (BioRad, США) и анализировали в программе BioNumerix 6.0 («Applied Maths», Бельгия). Кластерный анализ выполнен 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.

Мультилокусное сиквенс-типирование (MLST, Multi-Locus Sequence Typing). Оценивали полиморфизм семи генов «домашнего хозяйства» (house keeping genes) у 92 штаммов *S. Typhi*. Отнесение штаммов к сиквенс-типу проводили согласно схеме MLST-типирования *Salmonella enterica*, доступной на биоинформатических платформах Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk>) и CGE (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>).

Филогенетический анализ методом SNP-типирования (single nucleotide polymorphism). Для реконструкции глобального филогенетического древа изучили выборку геномов 1683 штаммов *S. Typhi*, из них 92 штамма, выделенные в РФ. Полногеномные данные российских штаммов получены в ходе нашего исследования; штаммов, выделенных в других странах – взяты из архива European Nucleotide Archive (accession ERP001718) (Wong V.K. et al., 2015). Выборка характеризовалась широким временным промежутком (с 1905 по 2013 гг.) и географией выделения штаммов (63 страны). Поиск SNP в геноме штаммов проводили с использованием ранее разработанного алгоритма анализа данных (Kuleshov K.V. et al., 2016). В качестве референс-генома

использовали нуклеотидную последовательность штамма *S. Typhi* CT18 (AL513382). Полученная матрица SNP была использована для филогенетической реконструкции методом максимального правдоподобия (англ., maximum likelihood), реализованного в программе RAxML, в качестве модели нуклеотидных замен использовали модель GTR+I. Бутстрап анализ проведен с числом повторов 1000. Визуализацию филогенетического дерева проводили в программе Figtree v1.3.1. Для обозначения крупных генетических кластеров использовали понятие «гаплотип», предложенное Roumagnac P. et al., 2002 г. Дополнительная филогенетическая классификация геномов проведена с использованием программы Genotyphi (<https://github.com/katholt/genotyphi>) по алгоритму, предложенному Wong V. et al., 2016.

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 дерева 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].

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.

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* Typhi 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 сальмонеллезами (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 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.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 45 печатных работ, из них 14 статей в рецензируемых изданиях, 12 тезисов в рецензируемых изданиях, 12 статей в других изданиях, 7 публикаций в материалах конференций. Получено 2 патента на изобретение, 3 свидетельства о регистрации базы данных. Материалы диссертации учтены при разработке трех методических и клинических рекомендаций, вошли в два аналитических обзора.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 292 страницах, написана по традиционному плану, содержит введение (включающее методологию и методы исследования), обзор литературы, семь глав собственных исследований, обсуждение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список литературы и приложения. Работа иллюстрирована 26 таблицами и 33 рисунками. Список литературы содержит 348 источников, в том числе – 71 отечественный и 277 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

Серологическая структура 746 изученных штаммов *Salmonella* была представлена 41 сероваром. Доминирующее положение занимали штаммы серовара *S. Enteritidis* - 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. Другие серовары (9,8%, 95% ДИ 7,9-12,1) были представлены единичными штаммами.

Чувствительность штаммов *Salmonella* к антимикробным препаратам

Чувствительность ко всем тестируемым АМП отмечена у 34,5% штаммов, устойчивость к 1 и более классу – у 65,5% (включая 10,1% штаммов с множественной устойчивостью к 3 и более классам): *S. Enteritidis* – 30,1 и 69,9% соответственно; *S. Typhimurium* – 39,2 и 60,8%; *S. Infantis* – 10,7 и 89,3% (Таблица 1). Доля устойчивых штаммов других сероваров была значительно ниже (24,7%), чем у ведущих сероваров, и чувствительность ко всем исследованным антибиотикам сохраняли 75,3% штаммов. При анализе устойчивости *Salmonella* к отдельным классам АМП обращает на себя внимание высокая частота устойчивости к хинолонам – 60,9%, наиболее выраженная у штаммов *S. Enteritidis* (68,7%) и *S. Infantis* (89,3%), у штаммов *S. Typhimurium* она составляла 13,7%, у других сероваров – 19,2%.

Таблица 1 – Чувствительность к антимикробным препаратам 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 ¹	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	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	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
тигециклин (n = 71)	18	25,4	16,7-36,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Примечание: ДИ – доверительный интервал, MDR-multidrug resistance, АМП – антимикробный препарат, ЦРС – цефалоспорины расширенного спектра; ¹штаммы, чувствительные к ЦРС

Показатели устойчивости к другим классам АМП имели выраженные различия в зависимости от серовара: суммарно устойчивость к аминопеницилинам 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/сульфаметоксазол – 6,0% (*S. Infantis* – 64,3%), хлорамфениколу – 4,3%, аминогликозидам – 0,9%. Не выявлены штаммы *Salmonella*, устойчивые к карбапенемам.

Множественная устойчивость к антибиотикам (multidrug resistance, MDR) отмечена у 10,1% штаммов, при этом высокая доля 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%. Выявлены серовароспецифические различия в чувствительности/резистентности к АМП (Рисунок 1).

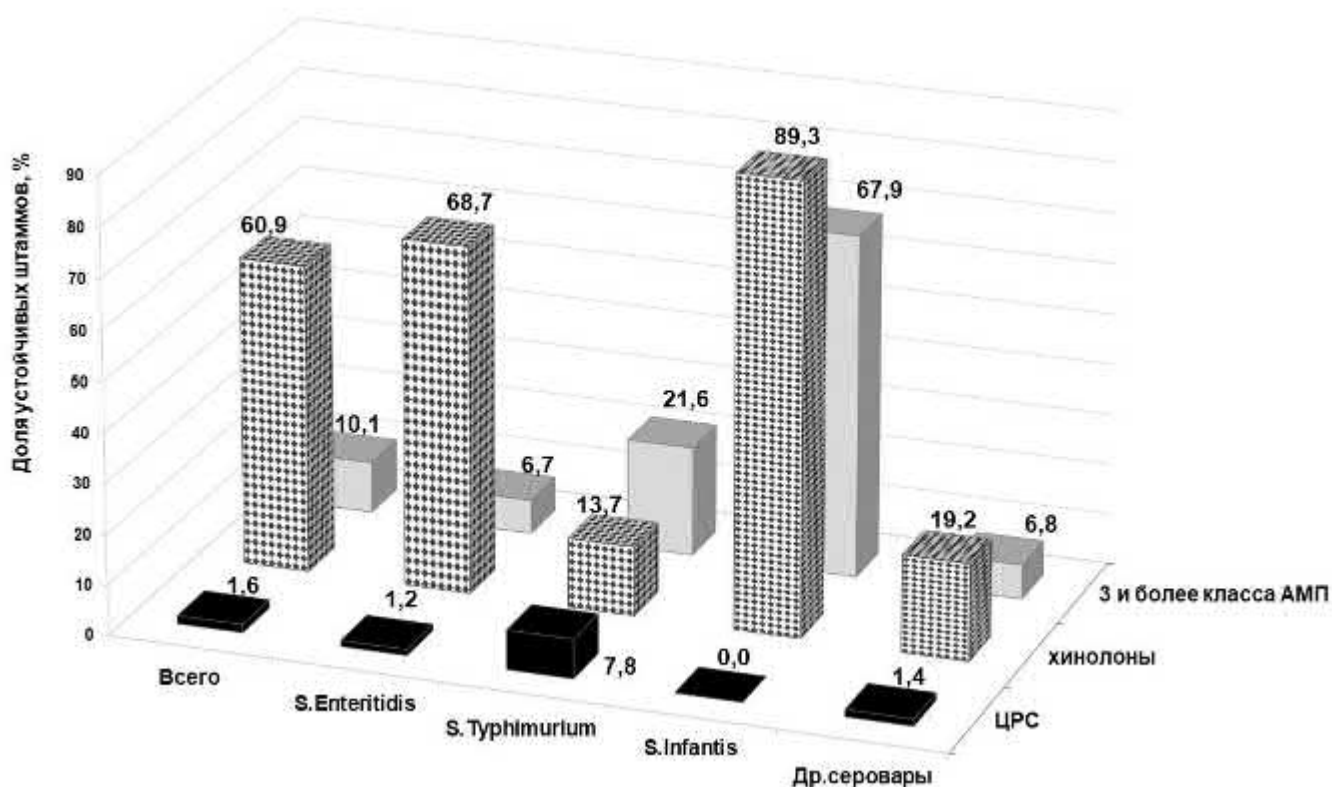


Рисунок 1 – Клинически значимая устойчивость к антимикробным препаратам штаммов *Salmonella* различных сероваров, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-19 гг.

Примечание: ЦПС – цефалоспорины расширенного спектра, АМП – антимикробный препарат

Для штаммов серовара *S. Enteritidis*, доминирующего в этиологической структуре сальмонеллезов как в Санкт-Петербурге, так и в РФ, характерна устойчивость к хинолонам (68,7% штаммов); ведущий фенотип резистентности (около 90% устойчивых штаммов) включал устойчивость к одному классу антибиотиков – хинолонам; доля MDR-штаммов не превышала 7,0%.

У серовара *S. Typhimurium* отмечена максимальная среди сероваров частота выделения штаммов, устойчивых к бета-лактамам: ампициллин (43,1% штаммов) и ЦПС (7,8%). Доля MDR-штаммов *S. Typhimurium* в 3 раза превышала

этот показатель у серовара *S. Enteritidis* – 21,6%, при этом 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% штаммов), тетрациклам (82,1%), триметоприм/сульфаметоксазолу (64,3%) и множественной устойчивости (67,9%).

Анализ профилей множественной устойчивости к антибиотикам показал, что более половины MDR-штаммов *S. Enteritidis* (60,0%) и *S. Infantis* (84,2%) имели характерные 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 резистентных генетических линий этих сероваров в Санкт-Петербурге.

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

Была проведена оценка чувствительности штаммов *Salmonella* к азитромицину, нитрофуранам, колистину, тигециклину, тестирование которых в рутинной работе бактериологической лаборатории затруднено в связи с необходимостью использования методов определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) или отсутствием критериев интерпретации.

Азитромицин применяют при лечении сальмонеллезной инфекции, в тоже время в нормативных документах отсутствуют критерии интерпретации: рекомендации EUCAST и российские КР предлагают считать чувствительными к азитромицину штаммы, относящиеся к «дикому» типу (МПК \leq 16,0 мг/л). Тестирование штаммов *Salmonella* методом градиентной диффузии показало высокую активность азитромицина: к «дикому» типу отнесены 98,4% штаммов, 1,6% расценены как устойчивые, что коррелировало с данными зарубежных и российских исследований (Жаркова Л.П. и др., 2017; CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 2019; The EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria in 2017, 2019; <https://mic.eucast.org/Eucast2/regShow.jsp?Id=35158>).

Оценка чувствительности энтеробактерий к нитрофуранам, которые широко используют в РФ для лечения ОКИ, возможна только в отношении штаммов *E. coli*, выделенных при инфекциях мочевых путей ($S \leq 64$ мг/л; $R > 64,0$). Мы ориентировочно оценили чувствительность штаммов *Salmonella* к нитрофурантоину методом градиентной диффузии. Учитывая возможность вариабельности результатов тестирования, штаммы с пограничным значением МПК 64,0 мг/л отнесли в группу устойчивых, которая составила 37,9%. Наши данные согласуются с зарубежными, отметившими низкую чувствительность штаммов *Salmonella* к нитрофуранам (Antunes P. et al., 2006; Capalonga R. et al., 2014), что не позволяет рассматривать нитрофураны как препараты выбора для эмпирической терапии сальмонеллезного гастроэнтерита.

В ходе работы оценили уровень чувствительности штаммов *Salmonella* к колистину и тигециклину, как препаратам резерва в отношении штаммов с множественной

устойчивостью. В Санкт-Петербурге выявлено 40,7% резистентных штаммов с МПК колистина 4,0-16,0 мг/л, которые в основном относились к *S. Enteritidis*, что коррелирует с данными EUCAST (<https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=834&Specium=-1>).

Устойчивыми к тигециклину оказались 25,4% штаммов, что превышало показатели EUCAST (12,2%) (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Rationaledocuments/Tigecyclinerationale1.0.pdf). Наши данные согласуются с высказанным в научной литературе предположением о сниженной природной чувствительности к колистину штаммов *Salmonella* серогруппы O9, которая может быть связана с особенностями строения липополисахарида клеточной стенки (Agerso Y. et al, 2012).

Мониторинг чувствительности к АМП штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге, выявил рост показателей резистентности в 2014 - 2019 гг. по сравнению с 2002 - 2005 гг.: 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). Если в период 2002 - 2005 гг. при исследовании около 600 штаммов были обнаружены только два штамма, устойчивых к ЦРС (0,4%, 95% ДИ 0,1-1,3), не принадлежавшие к доминирующему серовару *S. Enteritidis*, то в 2014 - 2019 гг. выделено 12 устойчивых штаммов (1,6%, 95% ДИ 0,9-2,8), причем семь штаммов *S. Enteritidis*.

Характеристика механизмов резистентности штаммов *Salmonella* к бета-лактамам антимикробным препаратам

В ходе исследования выявлены штаммы, устойчивые к бета-лактамам: 41 штамм, устойчивый к аминопенициллинам (сохраняющие чувствительность к ЦРС) и 18 штаммов, устойчивых к аминопенициллинам и цефалоспорином (включая 6 штаммов, выделенных в Санкт-Петербурге в 2008 - 2013 гг.) Все изученные штаммы были чувствительны к карбапенемам: МПК меропенема составляла для штаммов, чувствительных к бета-лактамам, а также устойчивых только к ампициллину $\leq 0,015$ мг/л, для штаммов, устойчивых к ампициллину и ЦРС – от 0,015 до 0,06 мг/л.

Из 41 штамма, устойчивого к аминопенициллинам, 22 штамма принадлежали к серовару *S. Typhimurium* (43,1% штаммов данного серовара), 13 штаммов - серовару *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). У 38 из 41 изученного штамма (92,7%) выявлен ген бета-лактамазы широкого спектра *bla*_{TEM-1}; гены, кодирующие продукцию бета-лактамаз генетических семейств SHV, OXA и PSE, не выявлены.

Штаммы, устойчивые к ЦРС, 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 фенотипической дифференциации продуцируемых бета-лактамаз нами был модифицирован алгоритм, предложенный

EUCAST (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCASTdetection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf) (Рисунок 2).

По результатам исследования с использованием данного алгоритма штаммы продуцировали «классические» бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) молекулярного класса А генетического семейства СТХ-М (16 из 18 штаммов) и цефалоспориноазу молекулярного класса С (AmpC) генетической группы CMY-2 (2 штамма).



Рисунок 2 – Алгоритм фенотипической детекции БЛРС и AmpC у штаммов *Salmonella*

Примечание: МПК – минимальная подавляющая концентрация, d – диаметр зоны, «+» – наличие синергизма, «-» – отсутствие синергизма

Среди штаммов, продуцирующих БЛРС семейства СТХ-М, десять штаммов продуцировали БЛРС генетической группы СТХ-М1, три штамма – СТХ-М9, два штамма – СТХ-М2, один штамм – одновременно СТХ-М1 и -2 (Таблица 2).

Фенотипическая характеристика штаммов соответствовала молекулярному механизму резистентности и была обусловлена спектром ферментативной активности бета-лактамаз. Штаммы, продуцирующие БЛРС семейства СТХ-М, характеризовались устойчивостью высокого уровня к цефотаксиму (МПК > 32,0 мг/л), различного уровня к цефтазидиму (МПК от 2,0 до более 256,0 мг/л) и цефепиму (МПК от 6,0 до 256,0 мг/л), чувствительностью к цефотаксидину (МПК < 8,0 мг/л) и клавулановой кислоте. Два штамма (*S. Newport* и *S. Enteritidis*), продуцирующие AmpC-цефалоспориноазу CMY-2, характеризовались устойчивостью высокого уровня к цефотаксиму (МПК >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 цефотаксидину (МПК 64,0 и более 256,0 мг/л) и клавулановой кислоте, чувствительностью к клоксациллину.

Полученные данные подтвердили диагностическую ценность предложенного алгоритма фенотипической детекции БЛРС и AmpC у штаммов *Salmonella*. Адекватный

выбор индикаторных препаратов (цефтазида и цефотаксима), использование цефепима и цефокситина (как дополнительного маркера при детекции AmpC-цефалоспориноз), а также подтверждающие фенотипические тесты с ингибиторами позволили с высокой вероятностью предположить молекулярный класс (А или С) продуцируемой бета-лактамазы.

Таблица 2 – Гены бета-лактамаз различных молекулярных классов, выявленные у штаммов *Salmonella*, устойчивых к бета-лактамамным антимикробным препаратам

Генетическое семейство бета-лактамаз	n	% от числа устойчивых	Серовары (число штаммов)
Штаммы, устойчивые к аминопенициллинам			
Всего штаммов	41	100	
TEM	38	92,7	S. Enteritidis (12) S. Typhimurium (21) S. Kentucky (2), S. Bredeney (1) S. Infantis (1), S. London (1)
SHV, OXA, PSE	0	0	-
Бета-лактамаза не идентифицирована	3	7,3	S. Enteritidis, S. Typhimurium, S. Infantis
Штаммы, устойчивые к аминопенициллинам и ЦРС			
Всего штаммов	18	100	
AmpC, генетическая группа CMY-2	2	11,1	S. Newport, S. Enteritidis
БЛРС: TEM, SHV	0	0	-
БЛРС: CTX-M	16	88,9	
генетические группы: - CTX-M1	10	55,6	S. Typhimurium (4) S. Enteritidis (3), S. Abony (1), S. Virchow (1), S. Coeln (1)
- CTX-M2	2	11,1	S. Typhimurium (2)
- CTX-M9	3	16,7	S. Enteritidis (3)
- CTX-M1+ CTX-M2	1	5,5	S. Typhimurium (1)

Примечание: ЦРС – цефалоспорины расширенного спектра

Практически все штаммы *Salmonella*, продуцирующие БЛРС или AmpC (17 штаммов из 18), характеризовались устойчивостью к 1-7 не-лактамамным классам антибиотиков, наиболее часто – к хинолонам (16 из 18 штаммов). Высокой активностью в отношении таких штаммов обладали из бета-лактамамных препаратов цефтазидим/авибактам и карбапенемы, из не-лактамамных препаратов – колистин и тигециклин, к которым сохраняли чувствительность все штаммы.

Выделенный в ходе нашего исследования штамм *S. Newport*, продуцирующий AmpC-цефалоспоринозу CMY-2, по фенотипу множественной резистентности, продуцируемой бета-лактамазе и характеристике плазмиды соответствовал штаммам международного клона высокого риска *S. Newport* MDR-AmpC/CMY-2, вызвавшим спорадические случаи и небольшие вспышки сальмонеллеза в США и Франции в 2000-2005 гг. (Batchelor M. et al., 2005; Espié E. et al., 2005; Navarro F. et al., 2001). Это позволило предположить факт завоза с пищевыми продуктами штаммов этого клона на территорию РФ из стран Евросоюза или США. В РФ серовар *S. Newport* занимает пятое

место в «рейтинге» сероваров *Salmonella*: ежегодно от людей выделяют от 100 до 200 штаммов, данные о выявлении штаммов международного клона отсутствуют (Информационные бюллетени референс-центра по мониторингу за сальмонеллезами: <http://www.epid-oki.ru/otchety.html>). Штамм депонирован в «ГКПМ-Оболенск» под номером В-9044.

Таким образом, наше исследование показало, что устойчивость к бета-лактамам у штаммов *Salmonella* обусловлена механизмом резистентности, характерным для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*: продукцией бета-лактамаз различных молекулярных классов и генетических семейств, отличающихся спектром ферментативной активности.

Характеристика механизмов резистентности штаммов *Salmonella* к хинолонам

Фторхинолоны являются препаратами выбора при лечении осложненных и тяжелых форм сальмонеллезной инфекции, в тоже время оценка чувствительности к этому классу АМП штаммов *Salmonella*, в отличие от других бактерий порядка *Enterobacteriales*, имеет методические и интерпретационные особенности.

Методические особенности определения чувствительности штаммов *Salmonella* к хинолонам

Наиболее достоверным показателем для прогнозирования эффективности терапии сальмонеллезной инфекции фторхинолонами является значение МПК ципрофлоксацина. Для штаммов, вызывающих так называемые «инвазивные» инфекции (прежде всего *S. Typhi*), используются критерии интерпретации ($S \leq 0,06$ мг/л; $R > 0,06$ мг/л), отличающиеся от критериев, принятых для других энтеробактерий. Штаммы *Salmonella* с МПК ципрофлоксацина выше 0,06 мг/л расценивают как устойчивые ко всем фторхинолонам. При определении чувствительности диско-диффузионным методом в качестве предиктора чувствительности к фторхинолонам рекомендован диск с пefлоксацином ($S \geq 24$ мм, $R < 24$ мм).

Мы оценили достоверность различных фенотипических методов (МПК ципрофлоксацина, ДДМ с пefлоксацином и налидиксовой кислотой) при детекции устойчивости штаммов *Salmonella* к хинолонам. Установлено, что ни один тест, используемый в одиночку, не позволяет достоверно выявить штаммы с устойчивостью низкого уровня (МПК ципрофлоксацина 0,12-0,25 мг/л). Несмотря на высокую конкордантность МПК ципрофлоксацина и результатов скрининга ДДМ с пefлоксацином (совпадение категории чувствительности для 96,5% из 310 исследованных штаммов) и налидиксовой кислотой (совпадение для 98,1% из 420 штаммов), в 19 случаях сравнения результаты противоречили друг другу, что создало вероятность ошибочной категоризации штамма при тестировании одним методом. В трех случаях расхождения были обусловлены объективной причиной – плазмидопосредованным механизмом резистентности (ген *qnrS*). Остальные расхождения возникли в том случае, если полученные значения были пограничными: МПК ципрофлоксацина 0,06 мг/л, диаметр зоны ингибиции роста пefлоксацина 24 мм. Многократное тестирование таких штаммов выявило колебания

значений вокруг пограничного: МПК 0,06 – 0,12 мг/л, диаметр зоны ингибиции роста 23-25 мм. Наше исследование свидетельствует, что при тестировании штаммов *Salmonella* значения МПК цiproфлорксацина 0,06 мг/л и диаметр зоны ингибиции роста пefлорксацина 24 мм следует рассматривать как «зону технической неопределенности». При попадании результатов в эту зону следует повторить тестирование (для ДДМ) или подтвердить результат альтернативным методом (для МПК цiproфлорксацина).

Нами предложен комплексный подход для тестирования штаммов *Salmonella* в бактериологических лабораториях: алгоритм диско-диффузионного метода, включающий два индикаторных диска (пefлорксацин и налидиксовую кислоту), который в сомнительных случаях может быть дополнен определением МПК цiproфлорксацина (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Алгоритм скрининга штаммов *Salmonella*, устойчивых к хинолонам, диско-диффузионным методом

Примечание: d – диаметр зоны подавления роста

Устойчивость к хинолонам выявлена у 69,1% штаммов, 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 3).

Таблица 3 – 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 ¹	698	66,8	63,9-69,6	452	60,6	57,2-64,2	246	82,3	77,5-86,2
- высокого уровня ²	24	2,3	1,5-3,4	2 ³	0,3	0,1-1,0	22	7,3	4,9-10,9

Примечание: ФХ – фторхинолоны; ¹МПК цiproфлорксацина 0,12-0,5 мг/л; ²МПК цiproфлорксацина от 4,0 до 32 мг/л; ³*S. Kentucky*

Устойчивость к фторхинолонам у большинства штаммов (66,8%) характеризовалась низким уровнем (МПК цiproфлорксацина 0,12-0,5 мг/л). В отличие от других энтеробактерий устойчивость низкого уровня (МПК цiproфлорксацина 0,12-0,25

мг/л) расценивается как клинически значимая для штаммов *Salmonella*, выделенных при генерализованных инфекциях. В отношении штаммов, выделенных при локализованной гастроэнтероколитической форме, выявление уровня устойчивости необходимо как для оценки возможности использования фторхинолонов, так и для выбора режима дозирования.

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 МПК ципрофлоксацина выше 32,0 мг/л.

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 штаммов), что позволило предположить хромосомный механизм устойчивости. У трех штаммов (0,4%) выявлен «парадоксальный» фенотип – устойчивость к ципрофлоксацину и пефлоксацину, но чувствительность к налидиксовой кислоте, что позволило заподозрить у этих штаммов плазмидоопосредованные механизмы устойчивости.

Молекулярные механизмы резистентности к хинолонам

Уровень устойчивости штаммов *Salmonella* к хинолонам зависит от молекулярного механизма приобретенной резистентности. Устойчивость низкого уровня обусловлена модификацией ДНК-гиразы (одного из двух ферментов, участвующих в репликации ДНК) вследствие одной мутации (однонуклеотидной замены) в QRDR-регионе (quinolone resistance determining region) хромосомных генов *gyrA* или *gyrB*, значительно реже – плазмидоопосредованными механизмами. Устойчивость высокого уровня возникает, как правило, в результате модификации обоих ферментов, участвующих в репликации ДНК – ДНК-гиразы и топоизомеразы IV (гены *parC* и *parE*) вследствие многочисленных однонуклеотидных замен в перечисленных генах. Мы провели поиск хромосомных мутаций устойчивых штаммов *S. Typhi* (105 штаммов) и других сероваров (39 штаммов) путем анализа нуклеотидных последовательностей генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* с использованием сервиса ResFinder биоинформационной платформы CGE (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), а также в программе BLAST с референсными последовательностями чувствительных к хинолонам штаммов (*S. Typhimurium* LT2, GenBank CP014051.2 и *S. Typhi* Ty2, GenBank AE014613).

У штаммов с устойчивостью низкого уровня выявлено по одной однонуклеотидной замене в 83 и 87 кодонах гена *gyrA*. Всего обнаружено пять вариантов однонуклеотидных замен (соответствующих аминокислотным замен), частота обнаружения которых варьировала (Рисунок 4). У штаммов *Salmonella* «не-тифоидных» сероваров выявлены все пять вариантов 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 штаммов *S. Typhi* обнаружены три варианта замен: Asp87Asn (71,4% устойчивых штаммов *S. Typhi*), Ser83Tyr (6,7%), Ser83Phe (0,95%).

Обращает на себя внимание серовароспецифичность некоторых вариантов мутаций: так, замена Asp87Gly выявлена только у штаммов *S. Enteritidis*, Asp87Tyr – у штаммов *S. Infantis* (доминирующая мутация у этого серовара).

У 24 штаммов с устойчивостью высокого уровня выявлены множественные мутации в генах *gyrA* и *parC*. Двадцать три штамма (91,7%; *S. Typhi* и *S. Kentucky*) имели идентичный профиль из трех замен – *gyrA* Ser83Phe, *gyrA* Asp87Asn и *parC* G239T (Ser80Ile), один штамм *S. Typhi* – их двух замен: *gyrA* Ser83Phe и *parC* A251G (Glu84Gly).

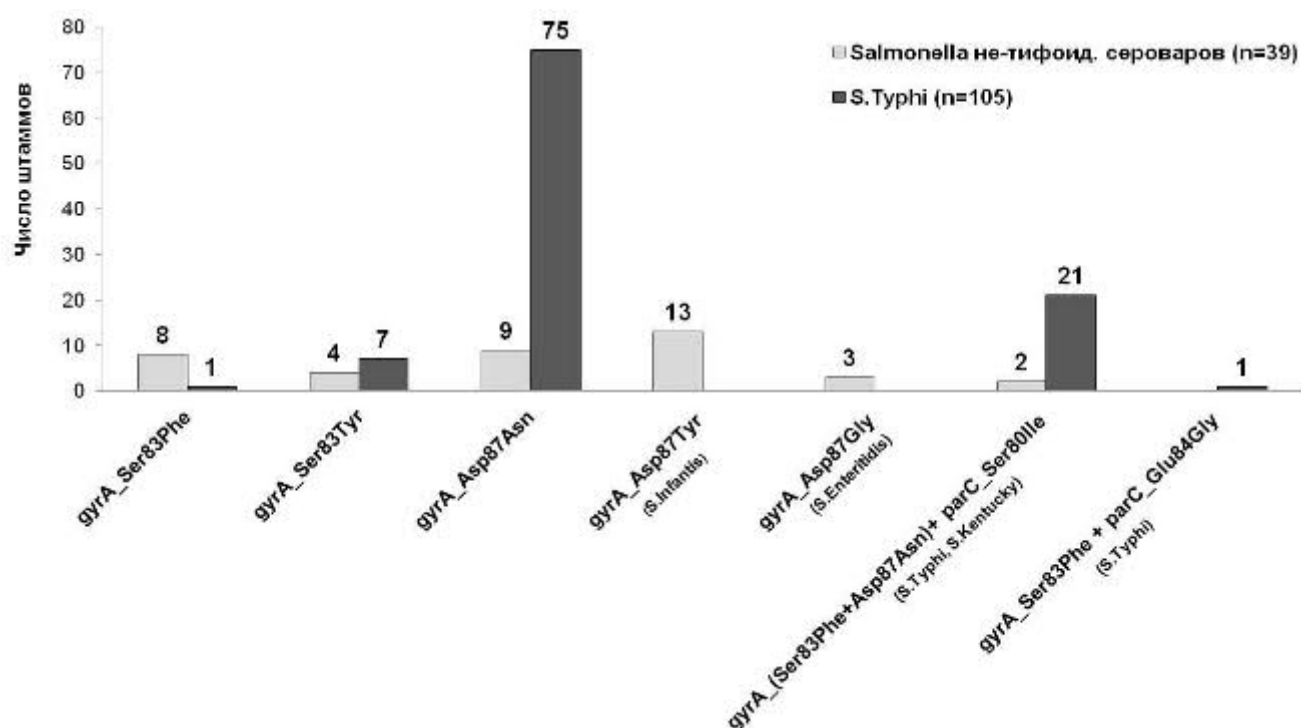


Рисунок 4 – Однонуклеотидные замены в QRDR-регионе хромосомных генов *gyrA* и *parC*, выявленные у штаммов *Salmonella*, устойчивых к хинолонам

Два штамма *S. Kentucky* с устойчивостью высокого уровня к фторхинолонам с профилем мутаций *gyrA* Ser83Phe, *gyrA* Asp87Asn и *parC* Ser80Ile имели MDR-фенотип и, кроме хинолонов, характеризовались устойчивостью к ампициллину (*bla*_{TEM-1}), хлорамфениколу, тетрациклину и гентамицину. Такой фенотип устойчивости и профиль множественных мутаций характерен для международного клона высокого риска *S. Kentucky* ST198, штаммы которого в настоящее время циркулируют в странах Европы, Азии и Африки (Hawkey J. et al, 2019; Mahindroo J. et al., 2019). В РФ ежегодно выделяют единичные штаммы *S. Kentucky*, данные о выделении штаммов клона ST198 отсутствуют. Один из российских штаммов *S. Kentucky* ST198 депонирован в «ГКПМ-Оболенск» под номером В-9045.

Детекция плазмидопосредованной устойчивости низкого уровня у 1045 штаммов выявила продукцию белка QnrS (ген *qnrS*) у трех штаммов (*S. Typhi*, *S. Corvallis*, *S. Typhimurium*).

При использовании комплексного подхода к определению чувствительности (ДДМ с пefфлоксацином и налидиксовой кислотой + МПК ципрофлоксацина) фенотипическая характеристика устойчивых к хинолонам штаммов полностью соответствовала молекулярному механизму резистентности. Так, для штаммов с хромосомным механизмом была характерна высокая устойчивость к налидиксовой кислоте и устойчивость к ципрофлоксацину, уровень которой зависел от количества однонуклеотидных замен в хромосомных генах *gyrA* и *parC*: штаммы с единичной мутацией имели устойчивость низкого уровня, с множественными мутациями – высокого уровня. Штаммы, у которых были выявлены только плазмидоопосредованные механизмы устойчивости (ген *qnrS*) характеризовались «парадоксальным» фенотипом: чувствительностью к налидиксовой кислоте и устойчивостью низкого уровня к ципрофлоксацину. Использование дополнительного индикаторного хинолона (налидиксовой кислоты) позволило получить достоверный результат даже в случае сомнительных результатов тестирования препаратов, рекомендованных нормативными документами (пefфлоксацин и ципрофлоксацин).

Характеристика штаммов *S. Typhi*, выделенных в РФ в 2005-2019 гг.

РФ не принадлежит к странам с высоким уровнем заболеваемости брюшным тифом: по данным официальной регистрации в последние десятилетия этот показатель 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 граждан 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 учебных заведениях РФ. В ходе нашего исследования изучены 299 штаммов *S. Typhi* из рабочей коллекции референс-центра по мониторингу возбудителя брюшного тифа, выделенные в РФ как при спорадических, так и при групповых случаях заболевания.

Чувствительность, фенотипы и механизмы резистентности к антимикробным препаратам штаммов *S. Typhi*

Популяция возбудителя брюшного тифа была представлена чувствительными (9,4%) и устойчивыми к АМП штаммами (90,6%): выявлена резистентность к фторхинолонам (89,6% штаммов), триметоприм/сульфаметоксазолу (2,7%), ампициллину (2,7%), хлорамфениколу (2,3%) и тетрациклину (3,0%) (Таблица 4). Отмечена высокая активность в отношении штаммов *S. Typhi* аминопенициллинов (МПК₉₀ ампициллина 1,0 мг/л), цефалоспоринов расширенного спектра (МПК₉₀ цефотаксима 0,25 мг/л), азитромицина (МПК₉₀ 8,0 мг/л), хлорамфеникола (МПК₉₀ 4,0 мг/л) и триметоприм/сульфаметоксазола (МПК₉₀ 0,12 мг/л), не выявлены штаммы, устойчивые к цефалоспорином расширенного спектра, карбапенемам и азитромицину. Обращает на себя внимание низкая активность фторхинолонов, которые являются препаратами выбора и входят в протоколы лечения брюшного тифа: чувствительны оказались только 9,4% штаммов *S. Typhi*, МПК₉₀ ципрофлоксацина составила 0,25 мг/л.

Таблица 4 – Чувствительность к антимикробным препаратам 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 ₅₀ – 4,0 мг/л, МПК ₉₀ – 8,0 мг/л	285 ¹	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; ¹определили МПК азитромицина для 285 штаммов *S. Typhi*

В популяции возбудителя преобладали штаммы (82,3%) с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам (МПК ципрофлоксацина 0,12-0,5 мг/л), что отражает тенденции развития устойчивости в эндемичных странах Юго-Восточной Азии, откуда в большинстве случаев происходит «завоз» возбудителя в РФ (Chau T.T. et al, 2007; Kuijpers L.M. et al, 2017; Parry C.M. et al, 2015) (Таблица 3).

По фенотипу резистентности к антибиотикам штаммы распределились на три группы: чувствительные ко всем тестируемым классам АМП – 9,4% (95% ДИ 6,6-13,2); устойчивые только к хинолонам – 87,6% (95% ДИ 83,4-90,9); характеризующиеся MDR-фенотипом (хинолоны, ампициллин, хлорамфеникол, триметоприм/ сульфаметоксазол, тетрациклин) – 3,0% (95% ДИ 1,6-5,6).

Выявленная у большинства штаммов *S. Typhi* устойчивость к фторхинолонам низкого уровня была обусловлена хромосомным механизмом – единичными мутациями в гене *gyrA*. У большинства штаммов *S. Typhi* (71,4% исследованных) обнаружена 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 в 2012 г. из Индии, где этот вид мутаций описан у 60,0-90,0% штаммов *S. Typhi* (Chau T. et al., 2007; Matono T. et al., 2017; Rahman S. Et al., 2020; Song Y. et al., 2010).

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* Ser80Phe, у одного штамма *gyrA* Ser83Phe + *parC* Glu84Gly. Такие штаммы выделяли в 2005-2019 гг. в Санкт-Петербурге, Калининградской, Смоленской, Воронежской, Кировской, Архангельской областях, Ханты-Мансийском АО и Удмуртии. Штаммы с высоким уровнем устойчивости и такими генотипами выделяли во многих странах Азии (Chau T. et al., 2007, Matono T. et al., 2017).

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 оценка филогенетической близости штаммов показала, что однонуклеотидные замены в хромосомных генах могут служить эпидемиологической меткой возбудителя.

Выявлено девять штаммов (3,0%) с MDR-фенотипом, включающим препараты «первой линии» для лечения брюшного тифа (ампициллин, хлорамфеникол, триметоприм/сульфаметоксазол, тетрациклин) и современные АМП (фторхинолоны). Такие штаммы в 2000-х гг. в странах Юго-Восточной Азии составляли до 90,0% популяции возбудителя (Weill F.X. et al., 2005). В связи с изменением схемы лечения брюшного тифа в настоящее время доля MDR-штаммов в странах Азии снизилась до 20-30,0% (Chau T. et al., 2007; Kuijpers L. et al., 2017; Matono T. et al., 2017; Parry C. et al., 2015), но остается достаточно высокой (до 60,0%) в странах Западной Африки, где

продолжают использовать дешевые антибиотики для лечения брюшного тифа (Baltazar M. et al., 2015; Wong V. et al., 2016). В РФ такие штаммы выделяли при спорадических случаях на четырех территориях (Санкт-Петербурге, Архангельске, Иркутске и Ленинградской области) и не каждый год. Эпидемиологическое расследование показало, что появление MDR-штаммов в РФ связано с их «завозом» трудовыми мигрантами из Таджикистана и Узбекистана, а также туристами из Индии. Практически все MDR-штаммы имели устойчивость к хинолонам, обусловленную однонуклеотидными заменами в гене *gyrA* Asp87Asn и Ser83Tyr. Кроме того, все штаммы имели плазмиды, содержащие гены резистентности к препаратам первой линии (*bla*_{TEM-1b}, *catA1*, *tet(B)*, *dfrA7*, *sul1*, *sul2*, *aph(3'')*-Ib, *aph(6)*-Id): восемь штаммов плазмиду рHMC1 (R27) группы несовместимости IncHI1 сиквенс-типа PST6, один штамм – плазмиду группы IncN.

Поскольку современная популяция *S. Typhi* в РФ почти на 90,0% представлена штаммами, устойчивыми к фторхинолонам, в нашей стране эти препараты не могут быть рекомендованы для стартовой эмпирической терапии брюшного тифа. Учитывая тот факт, что за период нашего наблюдения (2005-2019 гг.) в РФ не выявлено штаммов, устойчивых к цефалоспорином расширенного спектра и азитромицину, эти препараты могут быть рекомендованы для стартовой эмпирической терапии брюшного тифа.

Филогенетическая характеристика популяции S. Typhi в РФ в 2005-2019 гг.

S. Typhi – относительно «молодой» возбудитель, характеризующийся высокой консервативностью генома и выраженной клональностью популяции (Achtman M. et al., 2012; Holt K. et al., 2008; Kidgell C. et al., 2002). Согласно международной базе данных Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk>) более 95,0% штаммов *S. Typhi*, изученных в мире классическим методом MLST, относятся к двум генетически близким сиквенс-типам ST1 и ST2. Проведенный нами анализ данных полногеномного секвенирования 92 «российских» штаммов показал, что 83,7% относились к ST1 и 16,3% – к ST2, штаммы других сиквенс-типов не выявлены. 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.

Дальнейшее исследование методом SNP-типирования с использованием двух алгоритмов анализа полногеномных данных (анализ полного спектра SNP и упрощенный анализ филогенетически значимых SNP, предложенный Wong et al., 2016 г.) позволило выявить выраженное генетическое разнообразие «русской» популяции возбудителя.

По результатам анализа полного спектра SNP в геномах 1683 штаммов *S. Typhi* построено глобальное филогенетическое древо возбудителя брюшного тифа (Рисунок 5). Полногеномные данные для 92 российских штаммов получены в ходе нашего исследования, данные для штаммов, выделенных в других странах, взяты из архива European Nucleotide Archive (accession ERP001718). Для обозначения крупных генетических кластеров использовано понятие «гаплотип», предложенное Roumagnac et al., 2002 г.

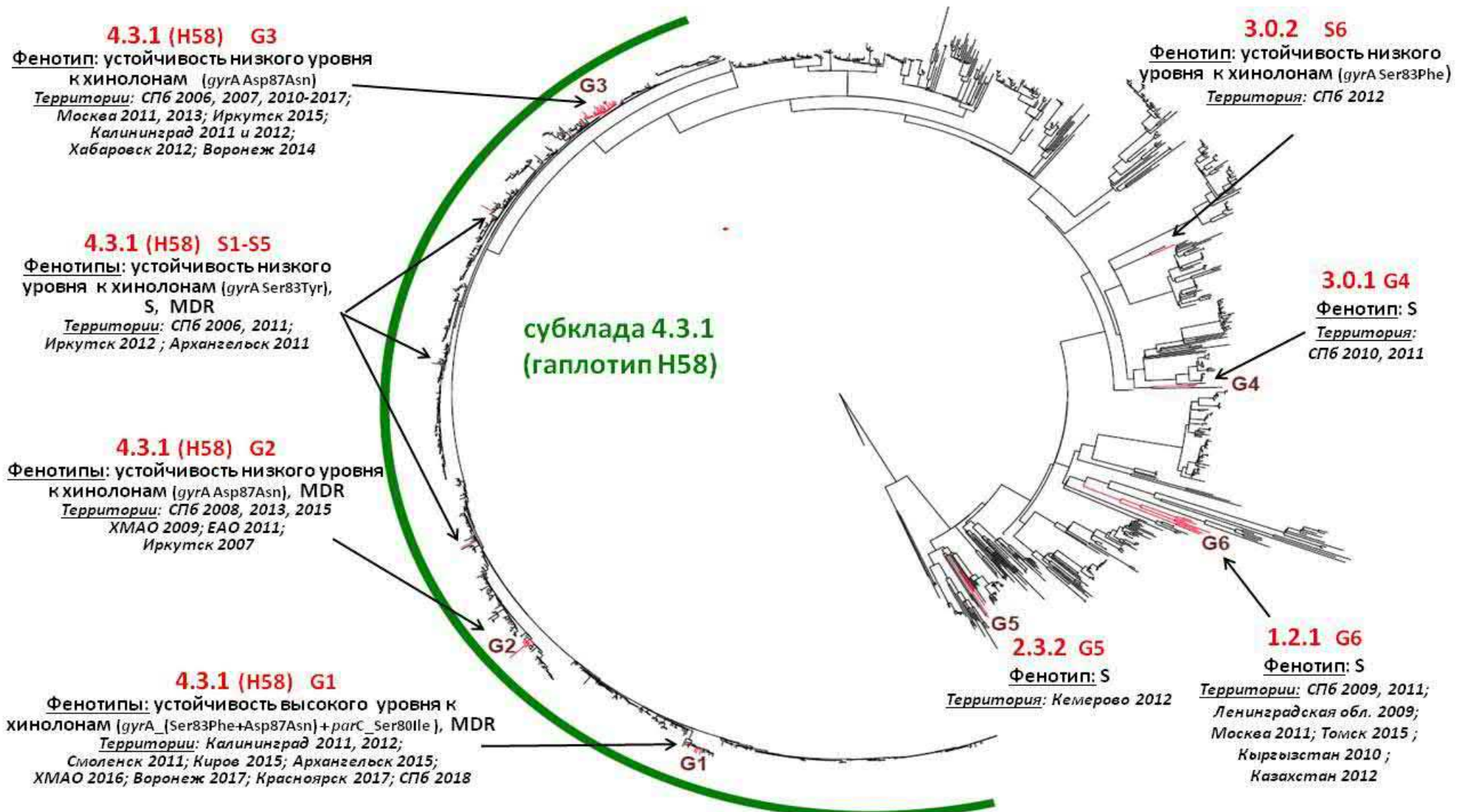


Рисунок 5 – Глобальное филогенетическое древо, построенное на основе полного спектра ортологических SNP 1683 геномов *S. Typhi* (метод максимального правдоподобия). Зеленым цветом выделена филогенетическая линия гаплотипа H58, красным цветом – «русские» штаммы *S. Typhi*. Кластеризующиеся штаммы обозначены как филогруппы G, некластеризующиеся – как индивидуальные генотипы S1- S6. Примечание: MDR – штаммы с множественной устойчивостью к АМП; S – чувствительные штаммы

Установлено, что большинство «российских» штаммов (76 штаммов, 82,6%) принадлежали к доминирующему гаплотипу H58, международному клону высокого риска, так называемому «азиатскому» клону. Филогенетическая линия гаплотипа H58 была неоднородна: исследуемые штаммы кластеризовались в три филогенетические группы (G1, G2 и G3), а также имели индивидуальные генотипы (S1-S6).

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

К филогенетической группе G1 принадлежали 10 штаммов с устойчивостью высокого уровня к фторхинолонам, обусловленной тремя однонуклеотидными заменами: *gyrA* (Ser83Phe + Asp87Asn) и *parC* Ser80Ile. У одного штамма наряду с устойчивостью к хинолонам выявлен MDR-фенотип, ассоциированный с плазмидой рНСМ1(R27) (группа несовместимости IncHI1) сиквенс-типа PST6. В РФ такие штаммы немногочисленны, 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. На филогенетическом древе глобальной популяции возбудителя брюшного тифа «российские» штаммы группы G1 расположены вместе со штаммами, выделенными в Индии. Эпидемиологическое расследование показало, что в большинстве случаев инфицирование заболевших происходило в этой стране.

Семь штаммов филогенетической группы G2 характеризовались одинаковым фенотипом и механизмом устойчивости к фторхинолонам (устойчивость низкого уровня, обусловленная мутацией *gyrA* Asp87Asn), два штамма обладали MDR-фенотипом, ассоциированным с плазмидой рНСМ1(R27) сиквенс-типа PST6.

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

Таким образом, к гаплотипу H58 (так называемому «азиатскому» клону) принадлежали штаммы *S. Typhi*, выделенные на территориях РФ в различные годы. Штаммы гаплотипа H58, выделенные при расследовании случаев групповой заболеваемости (Санкт-Петербург 2006 г., Калининград 2012 г., Московская область 2013 г.), входили в одну

филогенетическую группу и характеризовались идентичными фенотипами резистентности и хромосомными мутациями (однонуклеотидными заменами в генах *gyrA* и *parC*).

Шестнадцать штаммов *S. Typhi* (17,4%) не принадлежали к филогенетической линии гаплотипа H58 (так называемые «не-H58») и, в отличие от штаммов H58, принадлежали к сиквенс-типу ST2. Практически для всех штаммов «не-H58» была характерна чувствительность ко всем антибиотикам, только два штамма имели устойчивость низкого уровня к фторхинолонам, обусловленную редкой однонуклеотидной заменой *gyrA* Ser83Phe. Восемь чувствительных штаммов кластеризовались в группу G6, были выделены от жителей Кыргызстана и Казахстана и контактных с ними граждан РФ. По два чувствительных штамма кластеризовались в группы G4 и G5 (случай группового заболевания в г. Кемерово), 4 штамма имели индивидуальные генотипы.

На втором этапе исследования мы провели филогенетическую классификацию геномов штаммов по упрощенному алгоритму анализа, предложенному Wong V. et al., 2016 г. (Таблица 5). Исследование показало, что «русская» популяция возбудителя представлена штаммами, относящимися ко всем четырем первичным генетическим кластерам (1, 2, 3 и 4), при доминировании кластера 4.

Внутри кластера 4 практически все штаммы относились к субкладе 4.3.1 (82,6% исследованных штаммов). При сравнении результатов с данными глобального филогенетического древа установлено, что все штаммы субклады 4.3.1 относились к гаплотипу H58. 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). По данным глобальной филогении сюда относились штаммы гаплотипа H58 филогенетических групп G3, 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 глобальной филогении), и штаммами с устойчивостью высокого уровня, обусловленной тремя однонуклеотидными заменами *gyrA* (Ser83Phe, Asp87Asn) и *parC* Ser80Ple (штаммы H58 группы G1 глобальной филогении). Согласно Wong V. et al., 2016 г. штаммы субклады 4.3.1. в основном происходят из стран Юго-Восточной и Южной Азии.

Штаммы с MDR-фенотипом, содержащие плазмиды рНМС1 (R27) группы несовместимости IncHI1 и IncN, также принадлежали субкладе 4.3.1 (гаплотипу H58), что полностью совпадало с зарубежными данными. 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 V. et al., 2016 г. все изученные штаммы *S. Typhi* этой субклады имели африканское происхождение.

Таблица 5 – Характеристика популяции *S. Typhi*, выделенных в РФ в 2005-2018 гг., по филогенетической структуре, механизмам резистентности к антимикробным препаратам и географическому региону происхождения (n = 92)

Генотип по методу:			Механизмы резистентности	Фенотип резистентности	n	Территории и годы выделения штаммов	Вероятное происхождение штамма* (microreact.org/project/styphi)
MLST	Wong et al.	Глобальная филогения (гаплотипы Roumagnac)					
ST2	1.2.1	nc-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	nc-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	nc-H58_G5	WT	S	2	Кемеровская область, 2012	Западная Африка 33% (Нигерия, Мали) Южная Америка 27% (Аргентина) Юго-Восточная Азия 20% (Вьетнам, Тайланд) Сев. Америка 13% (Мексика) Западная Азия 7% (Турция)
		nc-H58_S7	WT	S	1	Ульяновская область, 2010	
ST2	3.0.1	nc-H58_G4	WT	S	2	С-Петербург, 2010 и 2011	Сев. Африка 50% (Марокко) Южная Азия 50% (Пакистан)
ST2	3.0.2	nc-H58_S6	<i>gyrA</i> Ser83Phe	FQ-LLR	1	С-Петербург, 2012	Южная Азия 100% (Индия)
ST1	4.1.1	nc-H58_S9	WT	S	1	Воронежская область, 2015	Южная Африка 78% (Малави) ЮАР 11% Западная Африка 6% (Мавритания) Центральная Африка 6% (Камерун)

Продолжение таблицы 5

Генотип по методу:		Глобальная филогения (гаплотипы Roumagnac)	Механизмы резистентности	Фенотип резистентности	n	Территории и годы выделения штаммов	Вероятное происхождение штамма* (microreact.org/project/styphi)
MLST	Wong et al.						
ST1	4.3.1.1.	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) Восточная Африка 10% (Танзания, Кения) Южная Африка 9% (Малави)
		H58_G2	<i>gyrA</i> Asp87Asn + pHCM1/ R27 (группа IncHI1)	FQ-LLR;	5	С-Петербург, 2008; ХМАО ⁶ , 2009; ЕАО ⁷ , 2011; Иркутская область, 2017	
		H58_S2	WT	S	1	С-Петербург 2013 и 2015	
		H58_S4	WT	S	1	Иркутская область, 2012 С-Петербург, 2011	
ST1	4.3.1.2	H58_G1	<i>gyrA</i> (Ser83Phe+Asp87Asn) + <i>parC</i> _Ser80Ile	FQ-HLR;	9	Калининград. область, 2011 и 2012; Смоленская область, 2011; Кировская область, 2015; ХМАО, 2016; Воронежская область, 2017; Красноярский край, 2017; С-Петербург, 2018	
		H58_S1	<i>gyrA</i> (Ser83Phe+Asp87Asn) + <i>parC</i> _Ser80Ile + pHCM1/ R27 (группа IncHI1)	FQ-HLR+MDR	1	Архангельская область, 2015	
		H58_S5	<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	

Примечания: 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;

*указан вероятный регион и страна происхождения штаммов и доля штаммов глобальной популяции, относящихся к данному региону (Wong V. et al., 2016 г.)

К кластеру 1, субкладе 1.2.1, относились 8 чувствительных к антибиотикам штаммов *S. Typhi*, которые согласно глобальной филогении принадлежали к филогенетической группе G6 гаплотипов «не-H58» и были завезены из Кыргызстана и Казахстана. По данным Wong V. et al., 2016 г. все изученные штаммы *S. Typhi* субклады 1.2.1 происходят из стран Юго-Восточной Азии.

Кластеры 2 и 3 были представлены единичными штаммами, не относящимися к гаплотипу H58, 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. Штаммы кластеризовались в филогенетические группы G4 и G5, а также имели индивидуальные генотипы.

Филогенетический анализ «русской» субпопуляции возбудителя брюшного тифа при сравнении с глобальной коллекцией штаммов *S. Typhi* (1683 штамма, выделенных на протяжении длительного времени в 63 странах мира) выявил выраженное генетическое разнообразие штаммов, вызывавших заболевания брюшным тифом в РФ в 2005-2019 гг. Российская популяция возбудителя брюшного тифа представлена штаммами, относящимися ко всем четырем глобальным первичным генетическим кластерам, описанным в мире. В то же время, более 80,0% изученных штаммов относились к одному кластеру, кладе и субкладе 4.3.1 (гаплотипу H58 согласно Roumagnac et al. 2006), успешному «азиатскому» клону и происходили из стран Юго-Восточной и Южной Азии. В РФ эта доминирующая генетическая группа была преимущественно представлена штаммами (более 60,0%), идентичными по фенотипу и механизму резистентности к антимикробным препаратам: устойчивость низкого уровня к фторхинолонам, обусловленная однонуклеотидной заменой в гене *gyrA* Asp87Asn. Штаммы этой субклады вызывали как спорадические, так и групповые заболевания брюшным тифом в разные годы на всех территориях РФ.

У «русских» MDR-штаммов *S. Typhi* гаплотипа H58 фенотип резистентности сформировался в результате сочетания нескольких механизмов устойчивости: хромосомных (однонуклеотидные замены *gyrA* Asp87Asn и Ser83Phe; *parC* Ser80Phe, обуславливающие устойчивость к хинолонам) и опосредованных плазмидами (гены резистентности на плазмидах рHCM1 PST 6 и IncN). Наши данные коррелируют с зарубежными и свидетельствуют, что у штаммов *S. Typhi* гаплотипа H58 (субклады 4.3.1) из-за потери плазмиды произошла смена фенотипа резистентности: большинство штаммов устойчивы только к хинолонам, причем в отличие от мировых данных эта устойчивость обусловлена преимущественно мутацией *gyrA* Asp87Asn (Wong V. et al, 2015). Таким образом, штаммы одной филогенетической группы, имеющие одинаковую хромосомную мутацию, способны в условиях селективного давления антибиотиков приобрести дополнительные плазмидные детерминанты резистентности и «расширить» фенотип резистентности, а также потерять плазмиду, когда селективное давление прекращается.

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 7 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*). 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, полученные методом PFGE, в целом 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 достигал 78. Субклада 1.2.1, представленная штаммами, завезенными из Казахстана и Кыргызстана, была представлена штаммами трех неродственных PFGE-кластеров с коэффициентом подобия менее 60. Наше исследование подтвердило ограниченные возможности метода PFGE для субтипирования серотипов с высоко консервативным геномом, включая *S. Typhi*, генетически отдаленные штаммы которых могут иметь идентичные PFGE-профили. Метод подходит для установления идентичности штаммов в рамках расследования вспышек. Данные PFGE-типирования отражают генетическое пространственно-временное разнообразие циркулирующих изолятов, но не их филогенетические связи.

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, циркулирующих в различных странах, включая РФ, свидетельствует, что глобальное распространение получили штаммы одной генетической линии (субклады 4.3.1/гаплотипа H58), устойчивые к хинолонам, что является прогностическим признаком клинической неэффективности эмпирической терапии брюшного тифа фторхинолонами в нашей стране. Оптимальная схема субтипирования штаммов, включающая комбинацию методов фенотипической и молекулярной характеристики (выбор которых зависит от конкретных эпидемиологических задач), обладает высокой информативностью и эпидемиологической конкордантностью, позволяет выявить клональный характер возбудителя, вызвавшего спорадические или групповые случаи заболевания.

Таким образом, высокие показатели устойчивости к антибиотикам, выявленные в ходе исследования, свидетельствуют о необходимости постоянного мониторинга биологических свойств (включая сероваровую характеристику, чувствительность и

механизмы клинически значимой резистентности к антимикробным препаратам, филогенетическую характеристику), штаммов *Salmonella*, включая возбудитель 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 штаммов), цефалоспориноз 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* (Ser80Ple 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-цефалоспориноаз 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 цефалоспориноам 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 сальмонеллезными.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кафтырева, Л.А. Резистентность к дезинфектантам энтеробактерий - возбудителей зооантропонозных инфекций / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова // Дезинфекционное дело. – 2008. – № 3. – С. 12-14.
2. Кафтырева, Л.А. Характеристика биологических свойств возбудителя брюшного тифа, зарегистрированного на ряде территорий Российской Федерации в 2005-2007 гг. / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова, З.Н. Матвеева, А.А. Яковлев, Т.И. Шестакова, Л.Ю. Петрова, В.Н. Алексеенко, С.И. Котлярова, Т.А. Гречанинова, Е.В. Кича, Л.А. Липатова, Т.М. Кузьмина, Н.С. Казановская, Е.Ю. Яровикова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – № 1. – С. 35-37.
3. Логинова, М.А. Исследование молекулярно-генетических и фенотипических характеристик клинических изолятов возбудителя брюшного тифа, выделенных в Санкт-Петербурге и Ленинградской области в 2005-2006 гг. / М.А. Логинова, Я.А. Кибирев, И.В. Парамонов, Н.Т. Васильев, В.П. Бондарев, И.В. Борисевич,

- И.В. Дармов, С.Н. Янов, И.В. Маракулин, В.И. Хмелевской, А.А. Суслопаров, А.Б. Жебрун, Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, Л.Ю. Петрова, Т.И. Шестакова, Л.А. Липатова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – № 6. – С. 33-38.
4. Кафтырева, Л.А. Резистентность энтеробактерий к антимикробным препаратам выбора при лечении острых кишечных инфекций / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, Е.А. Кожухова, М.А. Макарова, Н.С. Козлова, З.Н. Матвеева, Т.И. Шестакова, Л.Ю. Петрова, Е.В. Кича // Казанский медицинский журнал. – 2009. – Т. XC, № 5. – С. 699-704.
5. Егорова, С.А. Характеристика чувствительности энтеробактерий к препаратам выбора при терапии острых кишечных инфекций и методы выявления бета-лактамаз расширенного спектра / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева, М.А. Макарова, З.Н. Матвеева // Лабораторная диагностика России. 2010/2011: ежегодный справочник. – Санкт-Петербург: Человек, 2010. – С. 116-118.
6. Кафтырева, Л.А. Особенности чувствительности к антимикробным препаратам возбудителей брюшного тифа, зарегистрированного в Российской Федерации / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова, З.Н. Матвеева, Л.Ю. Петрова, Е.В. Кича // Лабораторная диагностика России. 2010/2011: ежегодный справочник. – Санкт-Петербург: Человек, 2010. – С. 119-120.
7. Кафтырева, Л.А. Распространенность и характеристика БЛРС-продуцирующих энтеробактерий – возбудителей различных инфекционных заболеваний / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова, Е.Н. Колосовская, М.Г. Дарьина // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2010. – № 17. – С. 124-129.
8. Кафтырева, Л.А. Состояние резистентности к антимикробным препаратам возбудителей бактериальных острых кишечных инфекций / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова, Л.В. Сужаева, А.В. Забровская // Мат. первого конгр. Евро-Азиат. общества по инф. бол., Санкт-Петербург, 1-3 декабря 2010 г. – Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2, № 4. – С. 72-73.
9. Кафтырева, Л.А. Многообразие механизмов антибиотикорезистентности сальмонелл / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова, А.В. Забровская, З.Н. Матвеева, Л.В. Сужаева, Е.В. Войтенкова // Инфекция и иммунитет. – 2011. – Т. 1, № 4. – С. 303-310.
10. Забровская, А.В. Устойчивость к антимикробным препаратам сальмонелл, выделенных от животных и из продуктов в Ленинградской области в 2004-2010 гг. / А.В. Забровская, Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, Л.В. Селиванова, Л.Ю. Малышева, Н.А. Антипова, А.Н. Борисенкова, О.Б. Новикова // Международный вестник ветеринарии. – 2011. – № 3. – С. 15-18.
11. Кафтырева, Л.А. Особенности серологической диагностики брюшного тифа / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова // Лаборатория. – 2012. – № 1. – С. 14-15.
12. Кафтырева, Л.А. Особенности брюшного тифа в Российской Федерации / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова, В.К. Козырева, Е.В. Войтенкова, З.Н. Матвеева, А.В. Забровская, Л.В. Сужаева, А.В. Семенов, Ю.В. Останкова // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2012. – № 21. – С.101-108.
13. Егорова, С.А. Устойчивость сальмонелл, выделенных из различных источников, к хинолонам / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева, В.К. Козырева, А.В. Забровская // Мат. XIV

Международ. конгр. МАКМАХ по антимикроб. терапии, Москва, 23-25 мая 2012 г. – Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т.14, № 2. – Прил. 1. – С. 25.

14. Кафтырева, Л.А. Молекулярная эпидемиология брюшного тифа в Санкт-Петербурге в 2005-2011 гг. / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, В.К. Козырева, А.В. Семенов, Ю.В. Останкова // XV Кашкинские чтения: Мат. науч.практ. конф. по мед. микробиологии и микологии, Санкт-Петербург, 27-28 июня 2012 г. – Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14, № 2. – С. 94.

15. Кафтырева, Л.А. Особенности лабораторной диагностики патогенных энтеробактерий / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова // Лаборатория. – 2013. – № 2. – С. 10-11.

16. Кафтырева, Л.А. Брюшной тиф в Российской Федерации / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, Е.В. Войтенкова, М.А. Макарова, Ю.В. Останкова, З.Н. Матвеева // Мат. V Ежегод. всерос. конгр. по инф.бол., Москва, 25-27 марта 2013 г. – Инфекционные болезни. – 2013. – Т. 11. – С. 189.

17. Кафтырева, Л.А. Молекулярно-генетическая характеристика возбудителя брюшного тифа в Санкт-Петербурге / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова, Ю.В. Останкова, А.В. Семенов // Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций: Мат. международ. конф., Санкт-Петербург, 5-7 июня 2013 г. – Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. 3, № 2. – С. 136-137.

18. **Кафтырева, Л.А. Аналитические возможности лабораторий стационаров в детекции механизмов резистентности к антибактериальным препаратам штаммов энтеробактерий / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова, Л.В. Сужаева, А.В. Забровская, Ю.С. Светличная // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – № 1 (74). – С. 23-27.**

19. **Егорова, С.А.** Особенности определения чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам / С.А. Егорова, М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева, З.Н. Матвеева, Е.В. Войтенкова, Л.В. Сужаева // Мат. XVI международ. конгр. по антимикроб. терапии, Москва, 21-23 мая 2014 г. – Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т. 16, № 2. – Прил. 1. – С. 18.

20. Кафтырева, Л.А. Диагностика внекишечных сальмонеллезов и особенности определения чувствительности сальмонелл к антибиотикам / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова, В.Н. Краева, Г.С. Пахомова // Справочник заведующего КДЛ. – 2016. – № 12. – С. 70-79.

21. **Егорова, С.А.** Результаты мониторинга чувствительности к антибиотикам штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2015 гг. / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева, Е.В. Войтенкова, Н.В. Толузакова, С.А. Черткова, С.Г. Довгаль, Е.Г. Матвеева, Л.Ю. Жирнова, Н.П. Уткина, Л.Ю. Сихандо, Т.Ф. Пеленко // Мат. VIII Ежегод. всерос. конгр. по инф. бол. с международ. уч., Москва, 28-30 марта 2016 г. – Инфекционные болезни. – 2016. – Т.14. – Прил. 1. – С. 93-94.

22. **Егорова, С.А.** Механизмы резистентности к фторхинолонам и цефалоспорином штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2016 гг. / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева, Е.В. Войтенкова, Е.В. Смирнова, Н.В. Толузакова, С.А. Черткова //

- Мат. II Нац. конгр. бактериологов, Санкт-Петербург, 20-22 сентября 2016 г. – Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т. 6, № 3. – С. 248-249.
23. Кафтырева Л.А. Методические особенности определения чувствительности возбудителя брюшного тифа к антимикробным препаратам / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, Е.В. Войтенкова // II Национальный конгресс бактериологов. Материалы конгресса, Санкт-Петербург, 20-22 сентября 2016 г. – Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т. 6, № 3. – С. 257-258.
24. Кафтырева, Л.А. Глобальные эпидемиологические и микробиологические тенденции брюшного тифа / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова // Инфекция, иммунитет и фармакология. – 2017. – Ч. 2. – С. 89-95.
- 25. Кафтырева, Л.А. Особенности резистентности к антимикробным препаратам возбудителя брюшного тифа, зарегистрированного на территории Российской Федерации в 2005-2016 гг. / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова, С.В. Тюленев, Г.Ф. Трифонова, О.В. Калинина // Профилактическая и клиническая медицина. – 2017. – № 2 (63). – С. 14-19.**
26. Егорова, С.А. Мутации, обуславливающие устойчивость к хинолонам у штаммов *Salmonella* Typhі, выделенных в Российской Федерации / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева, Ю.В. Останкова, О.В. Калинина, С.В. Тюленев // IX Всерос. науч.-практ. конф. с международ. уч. «Молекулярная диагностика 2017», Москва, 18-20 апреля 2017 г.: сб. трудов. – 2017. – Т. 2. – С. 266-267.
27. Кафтырева Л.А. Превалирующие клоны штаммов *S. Typhі* на территории России / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова // IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2017», Москва, 18-20 апреля 2017 г.: сб. трудов. – 2017. – Т. 2. – С. 266-267.
28. Кафтырева, Л.А. Биологические свойства штаммов возбудителя брюшного тифа *Salmonella* Typhі, выделенных в Российской Федерации в 2005-2017 гг. / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова // Бактериология. – 2017. – Т. 2, № 2. – С. 7-13.
29. Егорова, С.А. Характеристика штаммов *Salmonella*, выделенных от людей и животных в Санкт-Петербурге в 2014-2016 гг. / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева, Е.В. Войтенкова, А.В. Забровская, Н.В. Толузакова, С.А. Черткова, Е.В. Смирнова, Л.Ю. Жирнова, Н.П. Уткина, Л.Ю. Сихандо, Т.Ф. Пеленко // Мат. III Нац. конгр. бактериологов, Москва, 16-17 ноября 2017 г. – Бактериология. – 2017. – Т. 2, № 3. – С. 62.
30. Егорова, С.А. Этиологическая структура сальмонеллезов и характеристика чувствительности к антимикробным препаратам возбудителей, выделенных от пациентов, получавших амбулаторную медицинскую помощь / С.А. Егорова, Н.В. Сатосова, А.В. Любимова, Р.В. Кицбабашвили, Л.С. Борухович, Е.В. Потапова, О.А. Хмелева, Е.В. Войтенкова, Л.В. Сужаева, А.В. Забровская, Л.А. Кафтырева // МедиАль. – 2018. – № 2 (22). – С. 43-47.
31. Кафтырева, Л.А. Эпидемиологические тенденции брюшного тифа, зарегистрированного в Российской Федерации в 2006-2018 гг. / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова // Вестник российской военно-медицинской академии. – 2018. – Прил. 1. – № 4 (64). – С. 81-84.
32. Егорова, С.А. Детекция механизмов резистентности штаммов *Salmonella* к бета-лактамам / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева // Мат. V конг. Евро-Азиат. общества по

- инф. бол., Новосибирск, 6-18 мая 2018 г. – Журнал инфектологии. – 2018. – Т. 10, № 2. – Прил. 1. – С. 41-42.
33. **Егорова, С.А.** Особенности чувствительности к антибиотикам штаммов *Salmonella* различных сероваров / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева // Мат. V конгр. Евро-Азиат. общества по инф. бол., Новосибирск, 6-18 мая 2018 г. – Журнал инфектологии. – 2018. – Т. 10, № 2. – Прил. 1. – С. 42-43.
34. **Егорова, С.А.** Использование молекулярных методов при изучении возбудителей брюшного тифа и паратифа В / С.А. Егорова, К.В. Кулешов, Л.А. Кафтырева // Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2018», Минск, 27-28 сентября 2018 г.: сб. трудов. – 2018. – С. 303-304.
35. **Егорова, С.А.** Методические особенности определения чувствительности штаммов *Salmonella* к антимикробным препаратам / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 64, № 6. – С. 368-375.
36. **Егорова, С.А.** Филогенетическая характеристика возбудителя брюшного тифа, выделенного в Российской Федерации в 2005-2018 гг. / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева, К.В. Кулешов // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: сб. трудов XI Ежегод. Всерос. Конгр. по инф. болезням с междун. уч., Москва, 1-3 апреля 2019 года / под ред. академика РАН В.И. Покровского. – М: «Медицинское Маркетинговое Агентство». – 2019. – 260 с. – С. 56.
37. **Егорова, С.А.** Устойчивость к антимикробным препаратам и клинически значимые механизмы резистентности штаммов *Salmonella*, выделенных в 2014-2018 гг. в Санкт-Петербурге, Россия / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева, Л.В. Сужаева, А.В. Забровская, Е.В. Войтенкова, З.Н. Матвеева, Ю.В. Останкова, И.В. Лихачев, Н.В. Сатосова, Р.В. Кицбабашвили, Е.В. Смирнова, Л.И. Семченкова, Т.Е. Быстрая, С.Е. Сокольник, Н.П. Уткина, Л.Ю. Сихандо // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 64, № 10. – С. 620-626.
38. **Егорова, С.А.** Генетическое разнообразие механизмов резистентности к антибиотикам штаммов *Salmonella* / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева, Ю.В. Останкова // Всерос. науч.-практ. конф. с международ. уч. «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: актуальные проблемы и решения»: сб. трудов / под ред. Е.И. Ефимова. – Нижний Новгород: Ремедиум Приволжье. – 2019. – С. 216-219.
39. Кафтырева, Л.А. Гетерогенность популяции и филогенетическая структура возбудителя брюшного тифа, зарегистрированного в Российской Федерации / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, К.В. Кулешов, З.Н. Матвеева // Всерос. науч.-практ. конф. с международ. уч. «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: актуальные проблемы и решения»: сб. трудов / под ред. Е.И. Ефимова. – Нижний Новгород: Ремедиум Приволжье. – 2019. – С. 219-222.
40. **Егорова, С.А.** Современные методы субтипирования сальмонелл при расследовании вспышек сальмонеллезов / С.А. Егорова, К.В. Кулешов, Л.А. Кафтырева // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2019. – № 3. – С. 36-42.

41. Егорова, С.А. Современные тенденции развития устойчивости бактерий рода *Salmonella* к клинически значимым антимикробным препаратам (обзор литературы) / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева, В.В. Помазанов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, № 5. – С. 308-315.
42. Кафтырева, Л.А. Детекция международных клонов высокого риска *Salmonella* и *Escherichia coli*, возбудителей заболеваний, передающихся с пищевыми продуктами, в Российской Федерации / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова // Инфекция и иммунитет. – 2020. – Т.10, № 3. – С. 565-569.
43. Egorova, S. Ceftriaxone-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Newport, France / S. Egorova, M. Timinouni, M. Demartin, S.A. Granier, J.M. Whichard, V. Sangal, L. Fabre, A. Delaune, M. Pardos, Y. Millemann, E. Espie, M. Achtman, P.A.D. Grimont, F-X. Weill / *Emerging infectious diseases*. – 2008. – V. 14, № 6. – P. 954-957.
44. Egorova, S.A. Serovar specific antimicrobial susceptibility of *Salmonella*. / S.A. Egorova // *Molecular bases of epidemiology, diagnostics, prevention and treatment of infectious diseases: Abstracts of Int. conf., Saint-Petersburg, 4-6 December 2018*. – Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8, № 4. – С. 602.
45. Egorova, S.A. The antimicrobial susceptibility, resistance mechanisms and phylogenetic structure of *S. Typhi* isolated in 2005-2018 in the Russian Federation / S.A. Egorova, K.V. Kuleshov, L.A. Kaftyreva, Z.N. Matveeva // *Инфекция и иммунитет*. – 2020. – Т.10, № 1. – С.99 -110.

Патенты

1. Патент 2707548 Российская Федерация. Штамм бактерий *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi В-8453 с устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам, используемый в качестве контрольного штамма для фенотипических и молекулярных исследований при диагностике брюшного тифа / **Егорова С.А.**, Кафтырева Л.А.; заявитель и правообладатель: ФБУН НИИЭМ имени Пастера (RU). – № 2019101942; заявл. 24.01.2019; опубл. 27.11.2019, Бюл. № 33. – 5 с.
2. Патент 2707925 Российская Федерация. Штамм бактерий *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi в качестве контрольного штамма для фенотипических и молекулярных исследований при диагностике брюшного тифа / **Егорова С.А.**, Кафтырева Л.А.; заявитель и правообладатель: ФБУН НИИЭМ имени Пастера (RU). – № 2019101943; заявл. 24.01.2019; опубл. 02.12.2019, Бюл. № 34. – 4 с.
3. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ 2019611524 Российская Федерация. Сборно-аналитическая система Энтерус / Круглов Е.Е., Кафтырева Л.А., Макарова М.А., **Егорова С.А.**, Лямин А.В., Жестков А.В., Мякишева Ю.В., Хужаметова Ю.А.; правообладатель: Круглов Егор Евгеньевич (RU) – № 2019610358; заявл. 15.01.2019; опубл. 29.01.2019, Бюл. № 2. – 1 с.
4. 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. – 1 с.

5. 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; опубл. 03.03.2020.– 1 с.
6. 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.– 1 с.

Методические и клинические рекомендации

1. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Методические рекомендации. Версия 2014-01 / Р.С. Козлов, М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Н.В. Иванчик, Е.Ю. Склеенова, А.В. Тимохова, А.В. Дехнич, С.В. Сидоренко, И.В. Партина, В.В. Гостев, В.А. Агеевец, Л.А. Кафтырева, **С.А. Егорова**, М.А. Макарова, Н.В. Васильева, Н.Н. Климко, Т.С. Богомолова, Е.Р. Рауш, И.В. Выборнова, И.С. Тартаковский [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2014.pdf>
2. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Клинические рекомендации. Версия 2015-02 / Р.С. Козлов, М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Н.В. Иванчик, Е.Ю. Склеенова, А.В. Тимохова, А.В. Дехнич, С.В. Сидоренко, И.В. Партина, В.В. Гостев, В.А. Агеевец, Л.А. Кафтырева, **С.А. Егорова**, М.А. Макарова, Н.В. Васильева, Н.Н. Климко, Т.С. Богомолова, Е.Р. Рауш, И.В. Выборнова, И.С. Тартаковский [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2015.pdf>
3. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Клинические рекомендации. Версия 2018-03 / Р.С. Козлов, М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Н.В. Иванчик, Е.Ю. Склеенова, А.В. А.В. Романов, А.В. Дехнич, С.В. Сидоренко, И.В. Партина, В.В. Гостев, В.А. Агеевец, Л.А. Кафтырева, **С.А. Егорова**, М.А. Макарова, Н.В. Васильева, Н.Н. Климко, Т.С. Богомолова, Е.Р. Рауш, И.В. Выборнова, И.А. Рябинин, Ю.В. Борзова, И.С. Тартаковский [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf>

Аналитические обзоры

1. Брюшной тиф в Российской Федерации: аналитический обзор / Е.В. Войтенкова, **С.А. Егорова**, А.В. Забровская, Л.А. Кафтырева, М.А. Макарова, З.Н. Матвеева, Л.В. Сужаева, Г.Ф. Трифонова; под. ред. А.Б. Жебруна. – СПб: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2013.– 44 с.
2. Брюшной тиф в Российской Федерации: аналитический обзор / Л.А. Кафтырева, **С.А. Егорова**, М.А. Макарова, З.Н. Матвеева, А.А. Порин, Л.В. Сужаева, Е.В. Войтенкова, Г.Ф. Трифонова. – СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2018. – 72 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМП	– Антимикробный препарат
БЛРС	– Бета-лактамазы расширенного спектра
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ДИ	– Доверительный интервал
ДДМ	– Дisko-диффузионный метод
КР	– Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам»
МПК	– Минимальная подавляющая концентрация
ОКИ	– Острые кишечные инфекции
РФ	– Российская Федерация
ФБУЗ	– Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения
ФБУН	– Федеральное бюджетное учреждение науки
ЦРС	– Цефалоспорины расширенного спектра
AmpC	– Цефалоспорины молекулярного класса C
CGE	– Center for Genomic Epidemiology
EUCAST	– The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; Европейский комитет по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам
I	– Susceptible, increased exposure; чувствительный при увеличенной экспозиции
MDR	– Multidrug resistance; множественная устойчивость к антимикробным препаратам
MLST	– Multi-locus Sequence Typing; мультилокусное сиквенс-типирование
PFGE	– Pulse field gele electrophoresis; гель-электрофорез в пульсирующем электрическом поле
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, однонуклеотидные вариации
ST	– Sequence type; сиквенс-тип