

Независимое приобретение резистентности к хинолонам у клонально-родственных нозокомиальных штаммов *Salmonella Typhimurium* вследствие гипермутабельности

В.К. Козырева¹, М.В. Эйдельштейн¹, Д.В. Тапальский², И.С. Азизов³, Р.С. Козлов¹

¹ НИИ антимикробной химиотерапии, ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ, Смоленск, Россия

² Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

³ Карагандинский государственный медицинский университет, Караганда, Казахстан

У выделенных на территории России, Беларуси и Казахстана нозокомиальных штаммов *Salmonella Typhimurium*, продуцирующих β -лактамазу расширенного спектра СТХ-М-5 и принадлежащих к одной генетической группе, выявлена высокая частота устойчивости к хинолонам (43,1%). Резистентность во всех случаях была связана с наличием единичных точечных мутаций в QRDR области субъединицы А ДНК гиразы (GyrA), однако у разных штаммов были обнаружены различные аминокислотные

замены в позициях 83 или 87 GyrA, что свидетельствует об их независимом приобретении. Высокая частота резистентности к хинолонам и разнообразие замен в QRDR объясняются повышенной частотой мутирования (гипермутабельностью), которая была выявлена у всех изолятов описанной клональной группы.

Ключевые слова: *Salmonella Typhimurium*, нозокомиальные инфекции, антибиотикорезистентность, хинолоны, гипермутабельность.

Independent Acquisition of Quinolone Resistance in Clonally Related Nosocomial Strains of *Salmonella Typhimurium* Due to Hypermutability

V.K. Kozyreva¹, M.V. Edelstein¹, D.V. Tapalski², I.S. Azizov³, R.S. Kozlov¹

¹ Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

² Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

³ Karaganda State Medical University, Karaganda, Kazakhstan

Here we report on a high incidence of quinolone resistance (43,1%) among nosocomial CTX-M-5 ESBL-producing *S. Typhimurium* isolates belonging to a single clonal group isolated in Russia, Belarus, and Kazakhstan. The resistance mechanism in all cases was a single point mutation in quinolone resistance-determining region (QRDR) of DNA-gyrase subunit A (GyrA), however the discovered amino acid substitutions at GyrA positions 83 or

87 were different. The high incidence of quinolone resistance and the apparent diversity of GyrA mutations are likely explained by increased mutation rate (hypermutability) observed in all isolates of the described clonal group.

Key words: *Salmonella Typhimurium*, nosocomial infections, antimicrobial resistance, quinolones, hypermutability.

Контактный адрес:

Варвара Константиновна Козырева

Эл. почта: barbara.kozyreva@gmail.com

Введение

В настоящее время приобретенная резистентность к антибиотикам, давно используемым в клинической практике – аминопеницилинам, триметоприму, сульфаниламидам, хлорамфениколу, тетрациклину, стрептомицину и спектиномицину, является широко распространенной среди штаммов сальмонелл, выделяемых у человека и животных. Для многих штаммов *Salmonella enterica* характерно наличие геномного островка SGI1 и плазмид резистентности, несущих гены устойчивости к большинству или ко всем перечисленным антибиотикам в виде интегронных кассет [1–4]. Особую проблему представляет распространение у сальмонелл кодируемых плазмидами детерминант резистентности к цефалоспорином III поколения – β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и цефалоспориноаз класса C (AmpC) [5–7].

Несмотря на широкое клиническое использование фторхинолонов, резистентность к ним у сальмонелл встречается реже, чем к другим антибиотикам [8–10]. Это позволяет рассматривать фторхинолоны как препараты выбора для лечения инвазивных сальмонеллезов у взрослых [11]. Тем не менее, тенденция роста устойчивости характерна и для данной группы препаратов [12–15], особенно среди штаммов *Salmonella Typhimurium*, вызывающих нозокомиальные инфекции [1, 16, 17].

Устойчивость к хинолонам, как правило, связана с мутациями хромосомных генов ДНК-гиразы и/или топоизомеразы IV. Чаще всего резистентность к налидиксовой кислоте и пониженная чувствительность к фторхинолонам являются результатом появления единичных аминокислотных замен в первичной мишени хинолонов – QRDR области A-субъединицы ДНК-гиразы (GyrA). Мутации в B-субъединице ДНК-гиразы (GyrB) или же в субъединицах C и E топоизомеразы IV (ParC и ParE), приводящие к снижению чувствительности к хинолонам, встречаются у сальмонелл гораздо реже [18]. Аминокислотные замены в GyrA, обеспечивающие резистентность к фторхинолонам, обычно происходят в позициях 83 и 87: остаток Ser83 может быть замещен на Phe, Tyr или Ala, а Asp87 – на Gly, Asn или Tyr [19]. Наличие единичных мутаций в QRDR GyrA приводит к значительному увеличению МПК налидиксовой кислоты и менее заметному (как правило, на 1–2 разведения) увеличению МПК ципрофлоксацина [20]. Однако такие изменения могут являться причиной неэффективности стандартных курсов терапии с использованием фторхинолонов [21]. При наличии нескольких мутаций в QRDR GyrA или парных мутаций в GyrA и

GyrB возникает резистентность высокого уровня к ципрофлоксацину [20].

У сальмонелл встречаются и другие механизмы, обеспечивающие снижение чувствительности к хинолонам. Во-первых, это активное выведение антибиотика из клетки: в геноме *S. Typhimurium* найдено 5 эффлюксных систем, повышенная экспрессия которых способствует эффективному выведению фторхинолонов [22]. Снижение проницаемости наружной мембраны, связанное с вариациями экспрессии OmpF поринов внешней мембраны или липополисахаридов, рассматривается скорее как дополнительный механизм резистентности сальмонелл к фторхинолонам и едва ли может само по себе обеспечивать заметное снижение чувствительности [19]. Все более распространенной в последние годы становится плазмидоопосредованная резистентность к хинолонам [23]. Лучше всего описаны плазмидные Qng белки, которые непосредственно взаимодействуют с комплексом ДНК и ДНК-гиразы или ДНК и топоизомеразы IV, препятствуя их связыванию с фторхинолонами [24, 25]. Другой ген, встречающийся на плазмидах – *aac(6')-Ib-cr*, кодирует вариант фермента аминокликозид-ацетилтрансферазы, который способен инактивировать ципрофлоксацин посредством его ацетилирования [26]. Кроме того, описанные ранее как хромосомные гены систем эффлюкса OqxAB и QerA также были найдены на плазмидах [23]. Перечисленные выше механизмы обеспечивают небольшое повышение МПК хинолонов, но могут дополнять мутации гена-мишени, что позволяет достичь высокого уровня резистентности [23, 27].

Таким образом, распространение устойчивости к фторхинолонам у сальмонелл может быть связано как с горизонтальным переносом кодируемых плазмидами детерминант резистентности между разными штаммами [28], так и, в случае классических мутаций хромосомных генов, с клональной экспансией штаммов [29]. Существует также возможность независимого приобретения одинаковых мутаций резистентности в QRDR GyrA неродственными штаммами вследствие положительного селективного давления, создаваемого при широком применении хинолонов в медицине и ветеринарии [30].

Согласно данным исследования антибиотикорезистентности сальмонелл в отдельных регионах России, циркулирующие во внебольничной среде штаммы *S. enterica* отличаются хорошей чувствительностью к цефалоспорином III поколения и фторхинолонам [31, 32]. Гораздо большую проблему представляет высокий уровень антибиотикорезистентности у нозокомиальных штаммов сальмонелл, среди которых преобладают полирези-

стентные штаммы серовара Typhimurium [33, 34]. В одном из последних исследований нами была описана длительная (с 1996 г. по 2009 г.) циркуляция в стационарах на территории России, Беларуси и Казахстана штаммов *S. Typhimurium*, принадлежащих к одной клональной группе и проявляющих устойчивость к цефалоспорином за счет продукции БЛРС СТХ-М-5. Помимо устойчивости к цефалоспорином, у многих изолятов данной генетической группы была выявлена резистентность также к налидиксовой кислоте и пониженная чувствительность к фторхинолонам [35].

В настоящей работе нами были изучены механизмы резистентности к хинолонам и биологические особенности описанных изолятов *S. Typhimurium*, способствующие приобретению данного типа устойчивости.

Материалы и методы

Клинические штаммы *Salmonella Typhimurium*.

Всего исследовано 88 цефотаксиморезистентных изолятов *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар Typhimurium, выделенных у госпитализированных пациентов в 15 населенных пунктах 10 регионов России, Беларуси и Казахстана в 1996–2009 гг. Все изоляты были неповторяющимися (по одному от каждого пациента), пятнадцать из них были выделены у детей в возрасте до 3 лет. Первичная видовая и серологическая идентификация проводилась в локальных микробиологических лабораториях в соответствии с принятыми стандартами. Повторно все штаммы были идентифицированы в НИИ антимикробной химиотерапии СГМА с помощью биохимических идентификационных систем API20E (bioMérieux, Франция) и наборов сывороток к О- и Н-антигенам *Salmonella* (BioRad, Франция).

Определение чувствительности к антибиотикам. Значения минимальной подавляющей концентрации налидиксовой кислоты и ципрофлоксацина были определены с помощью метода последовательных разведений в агаре Мюллера–Хинтон [36]. Для контроля качества определения чувствительности были использованы штаммы *E. coli* ATCC®25922 и *E. coli* ATCC®35218. Интерпретация результатов определения чувствительности к ципрофлоксацину проводилась с использованием критериев Европейского комитета по оценке антибиотикочувствительности (EUCAST) 2012 г. [37]. Для оценки чувствительности к налидиксовой кислоте использовались критерии Института клинических лабораторных стандартов (CLSI) 2011 г. [36].

Определение мутаций в QRDR области гена *gyrA*. Для предварительного выявления мутаций в QRDR области гена *gyrA* был использован метод

ПЦР в режиме реального времени с последующим анализом кривых плавления флуоресцентного зонда. Короткий фрагмент гена *gyrA*, включающий QRDR область, амплифицировали с помощью пары праймеров (таблица) из которых обратный праймер (Sty_gyrA_Rpm) содержал внутренний гаситель флуоресценции и использовался в большей концентрации (0,8 мкМ), чем прямой праймер (Sty_gyrA_Fpm; 0,2 мкМ), с целью обеспечения более эффективной амплификации одной из цепей ДНК, комплементарной зонду (асимметричной ПЦР). В реакции был также использован 3'-флуоресцентно-меченный зонд (Sty_gyrA_Pb) в концентрации 0,2 мкМ, нуклеотидная последовательность которого была полностью комплементарна участку QRDR дикого типа (WT), соответствующему аминокислотным остаткам 82–88 GyrA (*S. Typhimurium* GenBank Acc. № U21957). Расчет температур плавления (Tm) дуплексов зонда с WT и мутированными последовательностями целевого гена был произведен с помощью программного обеспечения MeltCalc (E. Schütz и N. von Ahsen, 1999). В состав ПЦР смесей общим объемом 25 мкл входили: 2,5 ед. TaqF ДНК-полимеразы с коммерческим буфером (Интерлабсервис, Россия), 2 мМ MgSO₄ и 3 мкл бактериальной ДНК, выделенной с помощью наборов InstaGene Matrix (Bio-Rad, США). Амплификацию проводили с помощью системы RotorGene 2000 (Corbett Research, Австралия) согласно следующему протоколу: начальная денатурация при температуре 95 °С – 15 мин, затем 45 циклов: 95 °С – 15 с и 55 °С – 20 с, финальная инкубация при 37 °С – 3 мин. После завершения амплификации проводили анализ температуры плавления зонда путем регистрации его флуоресценции при увеличении температуры на 1 °С каждые 10 с в диапазоне от 37 °С до 75 °С. О наличии мутаций в QRDR области судили по снижению Tm зонда по сравнению с WT контролем.

Для всех изолятов характер выявленных мутаций в QRDR *gyrA* был установлен путем амплификации и прямого секвенирования внутреннего фрагмента гена *gyrA* с помощью праймеров STGYRA1 и STGYRA12-GT (см. таблицу), как описано ранее [38]. Секвенирование проводили с использованием наборов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США).

Тест на мутабельность. Фенотип гипермутателности клинических изолятов *S. Typhimurium* определяли с помощью скринирующего теста с диском налидиксовой кислоты (30 мкг) согласно методике, предложенной J.C. Galán и соавт. [39]. С этой целью суспензии тестируемых микроорга-

Использованные олигонуклеотиды

№ п/п	Наименование	Последовательность (5'-3')	Назначение	Ссылка
1	Sty_gyA_Fpm	AAATACCATCCCCACGGC	Первичный скрининг мутаций в QRDR GyxA	Данная работа
2	Sty_gyA_Rpm	TGCGCCATACGAACGA(T-RTQ1)G		
3	Sty_gyA_Pb	CGATTCCGCAGTGTATGACA-FAM		
4	STGYRA1	TGTCCGAGATGGCCTGAAGC	ПЦР и секвенирование QRDR GyxA	[38]
5	STGYRA12-GT	CGTTGATGACTTCCGTCAGGT		

низмов в физиологическом растворе плотностью 2 по McFarland наносили с помощью тампонов на поверхность агара Мюллера–Хинтон и через 24 ч инкубирования при 35 °C оценивали наличие отдельных колоний мутантов внутри зоны подавления роста налидиксовой кислотой. Возникновение спонтанных мутантов, резистентных к налидиксовой кислоте, у исходно чувствительных изолятов определяли с помощью стандартного метода: суточные культуры микроорганизмов в разведении от 10⁻¹ до 10⁻¹² рассеивали на агар с налидиксовой кислотой (32 мг/л) и без антибиотика; частоту спонтанных мутантов рассчитывали как отношение количества колоний, выросших на чашках с налидиксовой кислотой, к количеству колоний, выросших на чашках без антибиотика. В качестве положительного и отрицательного контрольных штаммов использовали соответственно мутатор *E. coli* GM2995 (*mutD5*) [40] и *E. coli* ATCC®25922.

Типирование изолятов с помощью мультилокусного анализа тандемных повторов (MLVA). MLVA-типирование проводили по пяти VNTR локусам (STTR3, STTR5, STTR6, STTR9, STTR10) как описано ранее [35, 41]. Кластерный анализ MLVA-профилей выполнен с использованием программного пакета BioNumerics Software v. 6.1 (Applied Maths, Бельгия) с применением алгоритма минимального остовного дерева (minimum spanning tree – MST) для категориальных значений VNTR локусов.

Результаты

Чувствительность к хинолонам. Согласно представленным ранее данным [35], все исследованные изоляты *S. Typhimurium* (n=88) проявляли устойчивость ко всем цефалоспорином в сочетании с резистентностью как минимум к одному не-β-лактамному антибиотику. В соответствии с критериями CLSI устойчивость к налидиксовой кислоте была выявлена у 38 (43,1%) изолятов. Значения МПК ципрофлоксацина для чувствительных к налидиксовой кислоте изолятов не пре-

вышали 0,06 мг/л, тогда как для резистентных они варьировали в диапазоне от 0,06 мг/л (у одного штамма) до 0,5 мг/л. Несмотря на то что указанные значения МПК ципрофлоксацина были ниже пограничных значений CLSI (>1 мг/л) и EUCAST (>0,5 мг/л) для нечувствительных штаммов семейства *Enterobacteriaceae*, 37 (42%) изолятов были отнесены к категории нечувствительных к фторхинолонам на основании рекомендаций EUCAST, предписывающих использование более строгих критериев (МПК ципрофлоксацина >0,06 мг/л) для предсказания возможной терапевтической неэффективности любых фторхинолонов в отношении инфекций, вызванных *Salmonella* spp. [37, 42].

Молекулярная характеристика детерминант резистентности. С помощью метода ПЦР в режиме реального времени у всех устойчивых к налидиксовой кислоте изолятов были выявлены мутации в QRDR GyxA. У 30 изолятов (34,1%) значения Tm зонда были характерны для замен в аминокислотной позиции 87, а у 8 (9,1%) – в позиции 83 (рис. 1).

Секвенирование показало, что выявленные точечные мутации соответствуют различным аминокислотным заменам: Asn-87, Gly-87, Tyr-87 и Phe-83 (рис. 2). Во всех случаях точечные мутации в QRDR GyxA были единичными. Данные, пред-

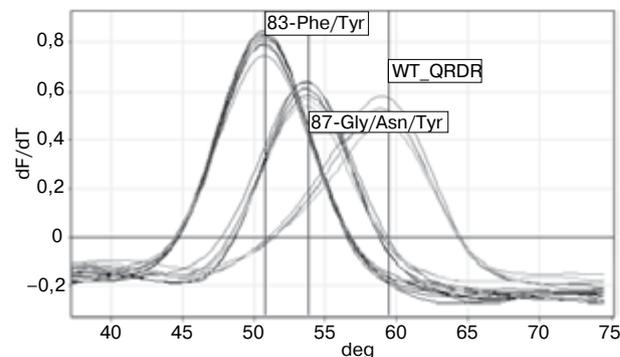
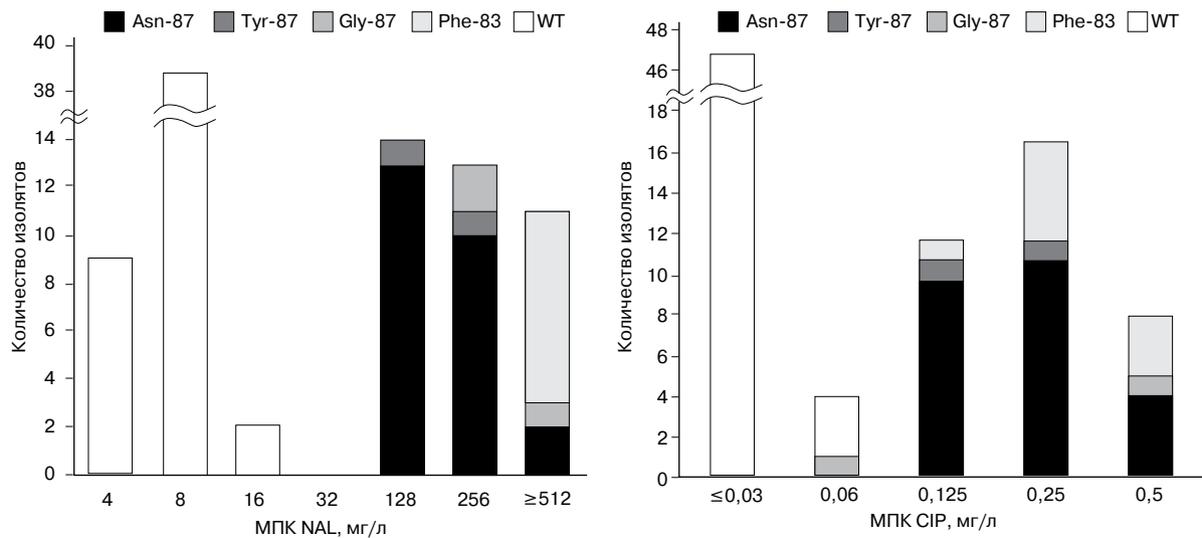


Рис. 1. Пример детекции мутаций в QRDR GyxA с помощью ПЦР в режиме реального времени и анализа кривых плавления зонда



Мутация	Количество изолятов	Диапазон МПК, мг/л	
		NAL	CIP
Нет (WT)	50 (56,8%)	4–16	≤0,03–0,06
Asn-87	25 (28,4)	128–≥512	0,125–0,5
Gly-87	3 (3,4%)	256– ≥512	0,06–0,5
Tyr-87	2 (2,3%)	128–256	0,125–0,25
Phe-83	8 (9,1%)	≥512	0,25–0,5

Рис. 2. Распределение исследованных изолятов *S. Typhimurium* по МПК налидиксовой кислоты (NAL) и ципрофлоксацина (CIP) в зависимости от характера мутаций в QRDR GyrA

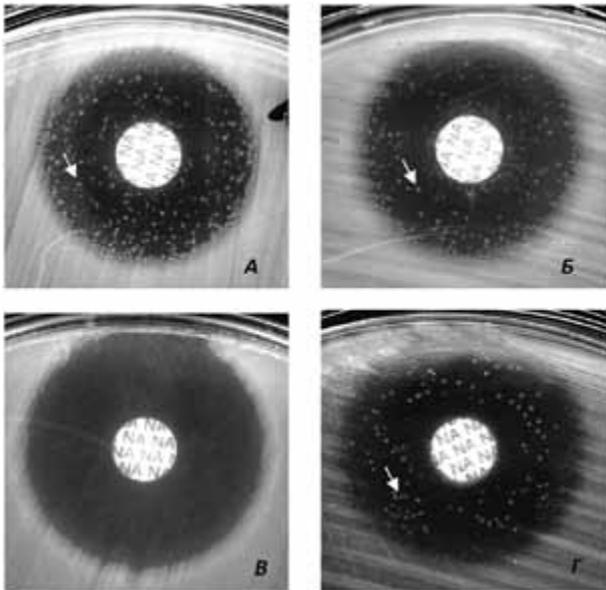


Рис. 3. Примеры выявления фенотипа гипермутабельности с помощью быстрого теста с диском налидиксовой кислоты
 а, б – клинические изоляты *S. Typhimurium*; в – отрицательный контроль – *E. coli* ATCC®25922; з – положительный контроль – *E. coli* GM2995. Стрелкой отмечены мутантные колонии внутри зон подавления роста.

ставленные на рис. 2, показывают соответствие между характером выявленных мутаций и значениями МПК хинолонов.

Тест на мутабельность. При постановке скринирующего теста с диском налидиксовой кислоты у всех хинолоночувствительных штаммов *S. Typhimurium*, так же как и у контрольного штамма-мутатора *E. coli* GM2995 (*mutD5*), наблюдался рост многочисленных мутантных колоний внутри зоны подавления роста. Подобного роста у нормомутабельного контрольного штамма *E. coli* ATCC®25922 отмечено не было (рис. 3).

Частота мутаций у исследованных изолятов превышала таковую у обычных штаммов *S. Typhimurium* [43, 44] на 4 порядка и составила приблизительно 1×10^{-5} . Следовательно, все штаммы изучаемой группы были расценены как сильные мутаторы.

Следует также отметить, что у произвольно выбранных мутантов, полученных *in vitro*, методом секвенирования было установлено наличие мутаций в QRDR GyrA, идентичных выявленным у хинолонорезистентных клинических изолятов.

Обсуждение

Известно, что наличие у штаммов *Salmonella* единичных мутации в QRDR *GyrA* является причиной устойчивости низкого уровня к ципрофлоксацину и, кроме того, увеличивает риск селекции дополнительных (кооперативных) мутаций и формирования резистентности высокого уровня [45]. Согласно современным рекомендациям CLSI, определение чувствительности сальмонелл к налидиксовой кислоте является обязательным для выявления резистентности низкого уровня к фторхинолонам и предсказания их возможной клинической неэффективности при терапии инвазивного сальмонеллеза [36]. Вместе с тем, EUCAST рекомендует непосредственное тестирование сальмонелл к ципрофлоксацину и использование низкой пограничной концентрации для оценки чувствительности к данному препарату (МПК ≤0,06 мг/л). Критерии EUCAST для налидиксовой кислоты в настоящее время отсутствуют.

У исследованных нами изолятов *S. Typhimurium* резистентность к хинолонам во всех случаях была вызвана мутациями *gyrA*, при этом у чувствительных к налидиксовой кислоте изолятов соответствующие мутации не были обнаружены. Таким образом, фенотип чувствительности к налидиксовой кислоте строго коррелировал с генотипом *gyrA*. Большинство штаммов с характерными мутациями в QRDR *GyrA* также проявляли устойчивость низкого уровня к ципрофлоксацину, однако один изолят (SE079/Ка-5120) с заменой Gly-87 формально сохранял чувствительность к ципрофлоксацину (МПК 0,06 мг/л). Данное наблюдение свидетельствует, на наш взгляд, о том, что налидиксовая кислота является более чувствительным маркером для выявления хромосомоопосредованной резистентности к хинолонам.

Выявленные в ходе данного исследования мутации в 83 и 87 позициях *GyrA* являются типичными для хинолонорезистентных клинических штаммов и встречаются у различных видов семейства *Enterobacteriaceae* [46]. Эффект данных мутаций, в частности наиболее часто встречающихся у исследованных нами изолятов замен Asn-87 (28,4%) и Phe-83

(9,1%), хорошо изучен для штаммов сальмонелл [47]. Последняя из перечисленных мутаций была предсказуемо связана с более высокими значениями МПК как налидиксовой кислоты, так и ципрофлоксацина.

Принадлежность всех исследованных нозокомальных изолятов *S. Typhimurium*, выделенных на территории трех государств, к одной генетической группе и общность выявленных у них механизмов резистентности к цефалоспорином (продукции БЛРС СТХ-М-5) были продемонстрированы нами ранее [35]. В этой связи, факт обнаружения различных мутаций в *gyrA* среди клонально-родственных изолятов является, с нашей точки зрения, наиболее интересным и важным, хотя и неожиданным. Данные кластерного анализа штаммов, выполненного по результатам MLVA-типирования (рис. 4), свидетельствуют о том, что распространение резистентности к хинолонам в изучаемой генетической линии *S. Typhimurium* лишь отчасти носит клональный характер и в значительной мере связано с независимым приобретением мутаций в *gyrA* исходно чувствительным штаммом.

Известно, что одним из важнейших факторов, способствующих быстрому формированию хромосомоопосредованной резистентности к хинолонам, является повышенная частота мутирования [48].

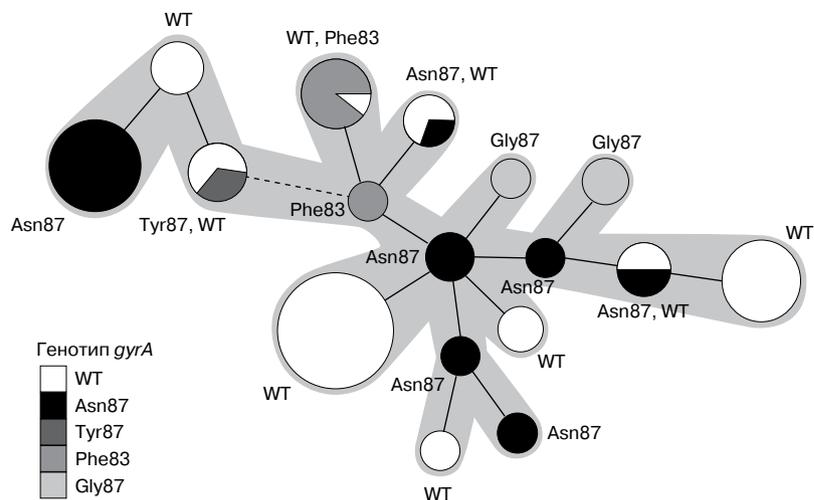


Рис. 4. Кластеризация MLVA-профилей на основании алгоритма минимального остовного дерева

Примечание: Каждому MLVA-типу соответствует круг, размер которого отражает количество изолятов, имеющих соответствующий MLVA-профиль. Длина и тип соединительных отрезков отражает генетическое расстояние (число отличающихся VNTR локусов) между двумя ближайшими типами: короткая непрерывная линия соединяет два MLVA-типа, отличающихся друг от друга единственным VNTR локусом, длинная пунктирная линия соединяет двухлокусные варианты. MLVA-типы, отличающиеся не более чем на 2 локуса, объединены в одну клональную группу (выделена серым фоновым цветом). Заливка круга отражает доли изолятов с разными мутациями в QRDR *GyrA*, принадлежащих данному MLVA-типу.

Гипермутабельность широко распространена среди нозокомиальных штаммов многих видов бактерий, включая *Salmonella enterica* [49]. Ранее было показано, что у штаммов *S. Typhimurium* с нарушенной системой репарации повреждений ДНК (*mutS*⁻) частота мутаций резистентности к налидиксовой кислоте возрастает на 3 порядка: с $3,3 \times 10^{-9}$ до $3,4 \times 10^{-6}$ [43].

У исследованных нами изолятов частота спонтанных мутаций устойчивости к налидиксовой кислоте составила приблизительно 1×10^{-5} , что позволило считать их гипермутабельными. Увеличение частоты мутаций на 4 порядка (по сравнению с обычными штаммами [43]) наблюдалось у всех исходно чувствительных к налидиксовой кислоте изолятов, относящихся к разным MLVA-субтипам внутри одной клональной группы. Таким образом, гипермутабельность является важной характеристикой всех штаммов описанной генетической

линии *S. Typhimurium*, способствующей их адаптации в нозокомиальной среде.

Полученные нами данные о высокой частоте устойчивости к хинолонам и наличии гипермутабельности у изученных штаммов *S. Typhimurium* ставят под сомнение возможность эффективно-го использования ципрофлоксацина для терапии инфекций, вызванных данными штаммами, даже при выявлении *in vitro* чувствительности у отдельных изолятов. В случае штаммов, обладающих единичными мутациями в QRDR *gyrA*, применение фторхинолонов может быть сопряжено с риском аккумуляции дополнительных мутаций и формирования резистентности высокого уровня. Сочетание механизмов устойчивости к хинолонам и цефалоспорином крайне затрудняет выбор антибиотиков, активных в отношении описанных штаммов *S. Typhimurium*.

Литература

1. Yu F., Chen Q., Yu X., et al. High prevalence of extended-spectrum beta-lactamases among *Salmonella enterica* Typhimurium isolates from pediatric patients with diarrhea in China. PLoS One 2011; 6(3):e16801.
2. Dionisi A.M., Graziani C., Lucarelli C., et al. Molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and monophasic variant (S. 4,[5],12:i:-) isolated from human infections in Italy. Foodborne Pathog Dis 2009; 6(6):711-7.
3. Targant H., Ponsin C., Brunet C., et al. Characterization of resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolated from diseased cattle in France (2002 to 2007). Foodborne Pathog Dis 2010; 7(4):419-25.
4. dos Reis E.M., Rodrigues Ddos P., de Freitas-Almeida A.C., Hofer E. Prevalence of R-type ACSSuT in strains of *Salmonella* serovar Typhimurium DT193 isolated from human infections in Brazil. Rev Panam Salud Publica 2011; 29(6):387-92.
5. Rodriguez I., Barownick W., Helmuth R., et al. Extended-spectrum {beta}-lactamases and AmpC {beta}-lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07. J Antimicrob Chemother 2009; 64(2):301-9.
6. Dierikx C., van Essen-Zandbergen A., Veldman K., Smith H., Mevius D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. Vet Microbiol 2010; 145(3-4):273-8.
7. Biedenbach D.J., Toleman M., Walsh T.R., Jones R.N. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 54(1):13-21.
8. Bouchrif B., Paglietti B., Murgia M., et al. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from food in Morocco. J Infect Dev Ctries 2009; 3(1):35-40.
9. Herikstad H., Hayes P., Mokhtar M., Fracaro M.L., Threlfall E.J., Angulo F.J. Emerging quinolone-resistant *Salmonella* in the United States. Emerg Infect Dis 1997; 3(3):371-2.
10. Medalla F., Sjolund-Karlsson M., Shin S., et al. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhi, United States, 1999-2008. Emerg Infect Dis 2011; 17(6):1095-8.
11. Arlet G., Barrett T.J., Butaye P., Cloeckeaert A., Mulvey M.R., White D.G. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. Microbes Infect 2006; 8(7):1945-54.
12. Chiu C.H., Wu T.L., Su L.H., et al. The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype choleraesuis. N Engl J Med 2002; 346(6):413-9.
13. Majtan J., Majtanova L., Majtan V. Increasing trend of resistance to nalidixic acid and emerging ceftriaxone and ciprofloxacin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Slovakia, 2005 to 2009. Diagn Microbiol Infect Dis 2010; 68(1):86-8.
14. Crump J.A., Medalla F.M., Joyce K.W., et al. Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(3):1148-54.
15. Marimon J.M., Gomariz M., Zigorraga C., Cilla G., Perez-Trallero E. Increasing prevalence of quinolone resistance in human nontyphoid *Salmonella enterica* isolates obtained in Spain from 1981 to 2003. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(10):3789-93.

16. Keddy K.H., Dwarika S., Crowther P., et al. Genotypic and demographic characterization of invasive isolates of *Salmonella* Typhimurium in HIV co-infected patients in South Africa. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3(8):585-92.
17. Robins-Browne R.M., Rowe B., Ramsaroop R., et al. A hospital outbreak of multiresistant *Salmonella typhimurium* belonging to phage type 193. *J Infect Dis* 1983; 147(2):210-6.
18. Tamang M.D., Nam H.M., Kim A., et al. Prevalence and mechanisms of quinolone resistance among selected nontyphoid *Salmonella* isolated from food animals and humans in Korea. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8(11):1199-206.
19. Cloeckaert A., Chaslus-Dancla E. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella*. *Vet Res* 2001; 32(3-4):291-300.
20. Heisig P. High-level fluoroquinolone resistance in a *Salmonella typhimurium* isolate due to alterations in both *GyrA* and *gyrB* genes. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32(3):367-77.
21. Aarestrup F.M., Wiuff C., Molbak K., Threlfall E.J. Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella* spp.? *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(2):827-9.
22. Nishino K., Latifi T., Groisman E.A. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 2006; 59(1):126-41.
23. Strahilevitz J., Jacoby G.A., Hooper D.C., Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(4):664-89.
24. Martinez-Martinez L., Eliecer Cano M., Manuel Rodriguez-Martinez J., Calvo J., Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008; 6(5):685-711.
25. Martinez-Martinez L., Pascual A., Jacoby G.A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351(9105):797-9.
26. Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G.A., et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; 12(1):83-8.
27. Baucheron S., Tyler S., Boyd D., Mulvey M.R., Chaslus-Dancla E., Cloeckaert A. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(10):3729-35.
28. Gunell M., Webber M.A., Kotilainen P., et al. Mechanisms of resistance in nontyphoidal *Salmonella enterica* strains exhibiting a nonclassical quinolone resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(9):3832-6.
29. Butaye P., Michael G.B., Schwarz S., Barrett T.J., Brisabois A., White D.G. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. *Microbes Infect* 2006; 8(7):1891-7.
30. Randall L.P., Eaves D.J., Cooles S.W., et al. Fluoroquinolone treatment of experimental *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 infections in chickens selects for both *GyrA* mutations and changes in efflux pump gene expression. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(2):297-306.
31. Ахметова Л.И., Розанова С.М. Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов шигелл и сальмонелл, выделенных в Екатеринбурге. *КМАХ* 2000; 2(3):58-62.
32. Egorova S., Kaftyreva L., Grimont P.A., Weill F.X. Prevalence and characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistant nontyphoidal *Salmonella* isolates in adults in Saint Petersburg, Russia (2002-2005). *Microb Drug Resist* 2007; 13(2):102-7.
33. Акимкин В.Г., Покровский В.И. Нозокомиальный сальмонеллез взрослых. Издательство РАМН 2002:35-72.
34. Edelstein M., Pimkin M., Dmitrachenko T., et al. Multiple outbreaks of nosocomial salmonellosis in Russia and Belarus caused by a single clone of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium producing an extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(8):2808-15.
35. Козырева В.К., Эйдельштейн М.В., Тапальский Д.В., Азизов И.С., Романов А.В., Козлов Р.С. Клональное распространение СТХ-М-5-продуцирующих нозокомиальных штаммов *Salmonella* Typhimurium в России, Беларуси и Казахстане. *КМАХ* 2012; 14(1):38-50.
36. CLSI Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st informational supplement. 2011; (31):165.
37. EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0. 2012:1-73.
38. Nakaya H., Yasuhara A., Yoshimura K., Oshihori Y., Izumiya H., Watanabe H. Life-threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium with mutations in both *GyrA* and *parC*. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(2):255-7.
39. Galan J.C., Tato M., Baquero M.R., Turrientes C., Baquero F., Martinez J.L. Fosfomicin and rifampin disk diffusion tests for detection of *Escherichia coli* mutator strains. *J Clin Microbiol* 2004; 42(9):4310-2.
40. Stepanova M.N., Pimkin M., Nikulin A.A., Kozyreva V.K., Agapova E.D., Edelstein M.V. Convergent *in vivo* and *in vitro* selection of ceftazidime resistance mutations at position 167 of CTX-M-3 beta-lactamase in hypermutable *Escherichia coli* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(4):1297-301.
41. Lindstedt B.A., Vardund T., Aas L., Kapperud G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *J Microbiol Methods* 2004; 59(2):163-72.
42. Leclercq R., Canton R., Brown D.F., et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2011.
43. Levy D.D., Sharma B., Cebula T.A. Single-nucleotide polymorphism mutation spectra and resistance to quinolones in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with

- a mutator phenotype. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(7):2355-63.
44. Koskiniemi S., Hughes D., Andersson D.I. Effect of translesion DNA polymerases, endonucleases and RpoS on mutation rates in *Salmonella Typhimurium*. Genetics 2010; 185(3):783-95.
45. Velge P., Cloeckaert A., Barrow P. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. Vet Res 2005; 36(3):267-88.
46. Weigel L.M., Steward C.D., Tenover F.C. *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42(10):2661-7.
47. Turner A.K., Nair S., Wain J. The acquisition of full fluoroquinolone resistance in *Salmonella Typhi* by accumulation of point mutations in the topoisomerase targets. J Antimicrob Chemother 2006; 58(4):733-40.
48. Blazquez J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. Clin Infect Dis 2003; 37(9):1201-9.
49. Chopra I., O'Neill A.J., Miller K. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. Drug Resist Updat 2003; 6(3):137-45.