

Клональное распространение CTX-M-5-продуцирующих нозокомиальных штаммов *Salmonella* Typhimurium в России, Беларуси и Казахстане

В.К. Козырева¹, М.В. Эйдельштейн¹, Д.В. Тапальский², И.С. Азизов³,
А.В. Романов¹, Р.С. Козлов¹

¹ НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск, Россия

² Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

³ Карагандинский государственный медицинский университет, Караганда, Казахстан

В настоящей работе представлены данные, свидетельствующие о широком географическом распространении штаммов *Salmonella enterica* серовар Typhimurium, принадлежащих к одной генетической линии и проявляющих резистентность к оксиминоцефалоспоридам вследствие продукции β -лактамазы расширенного спектра действия CTX-M-5. Родственность штаммов, которые выделялись в ходе многочисленных вспышек нозокомиального сальмонеллеза на территории России, Беларуси и Казахстана, была установлена с помощью методов электрофореза в пульсирующем поле (PFGE) и мультилокусного анализа тандемных повторов (MLVA). Циркуляция клона была впервые зафиксирована в 1994 году и, согласно представленным нами

данным, продолжается в настоящее время. Изученные штаммы характеризуются полирезистентностью, в том числе к ингибиторозащищенным пенициллинам и не- β -лактамам антибиотикам, детерминанты резистентности к которым располагаются на больших конъюгативных плазидах, в то время как ген *bla*_{CTX-M-5} находится в сцеплении с мобильным элементом ISEcp1 на небольшой неконоъюгативной плазмиде. Часть штаммов проявляет резистентность к налидиксовой кислоте, которая связана с мутациями в QRDR области гена *gyrA*.

Ключевые слова: *Salmonella* Typhimurium, нозокомиальные инфекции, клональное распространение, антибиотикорезистентность.

Clonal dissemination of CTX-M-5-producing nosocomial strains of *Salmonella* Typhimurium in Russia, Belarus, and Kazakhstan

V.K. Kozyreva, M.V. Edelstein, D.V. Tapalski, I.S. Azizov, A.V. Romanov, R.S. Kozlov

¹ Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

² Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

³ Karaganda State Medical University, Karaganda, Kazakhstan

In this paper, the evidence of broad geographic dissemination of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains belonging to a single genetic lineage is presented.

The isolates described possess resistance to oximiinocephalosporines due to production of CTX-M-5 extended-spectrum β -lactamase. The genetic relatedness of the strains isolated during multiple outbreaks of nosocomial salmonellosis in various parts of Russia, Belarus and Kazakhstan was established by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multi-locus tandem repeat analysis (MLVA). Circulation of the clone was first noticed in 1994

Контактный адрес:

Варвара Константиновна Козырева
Эл. почта: barbara.kozyreva@gmail.com

and is currently ongoing according to the data presented. The resistance to multiple antibiotics including penicillin-inhibitor combinations and various non- β -lactam drugs is mediated by large conjugative plasmids, while bla_{CTX-M-5} gene is associated with ISEcp1 element and carried by

small non-conjugative plasmid. Some isolates express resistance to nalidixic acid owing to mutations in QRDR of gyrA gene.

Key words: *Salmonella* Typhimurium, nosocomial infection, clonal dissemination, antimicrobial resistance.

Введение

Сальмонеллы нетифоидной группы, относящиеся к различным сероварам *Salmonella enterica*, прежде всего Enteritidis и Typhimurium (*S. Typhimurium*), являются одними из главных возбудителей острого гастроэнтерита [1]. Серовар Typhimurium в течение многих лет являлся наиболее часто выделяемым, по сравнению с другими сероварами сальмонелл. Значительный вклад в увеличение частоты встречаемости *S. Typhimurium* внесло быстрое всемирное распространение полирезистентных штаммов фаготипа DT104, которое было признано угрозой мировому здравоохранению [2].

В 2001 г. приблизительно 22,1% случаев сальмонеллеза, зафиксированных в США, были вызваны серотипом Typhimurium [3, 4]. Доминирование данного серотипа было еще более явно выраженным во Франции, где >32% случаев были вызваны *S. Typhimurium* [3]. Несмотря на то что в странах Евросоюза и других странах, в том числе и России [5], в последние годы штаммы серовара Enteritidis выделялись с большей частотой [2], клиническое значение серовара Typhimurium по-прежнему велико.

Чаще всего сальмонеллез у людей связан с употреблением в пищу зараженных продуктов, таких как мясо, птица, яйца, молоко, морепродукты и овощи. Другим источником инфицирования может являться прямой контакт с зараженным животным [4]. Помимо пищевых инфекций существует проблема сальмонеллеза как нозокомиальной инфекции. В отличие от пищевых инфекций, вызванных *S. enterica*, источником которых являются продукты питания, основным способом распространения нозокомиального сальмонеллеза является контактный путь, который связан с прямой передачей возбудителя от человека к человеку. Высокая частота носительства отдельных штаммов *S. Typhimurium* у пациентов стационаров и медицинских работников является важным фактором, способствующим клональному распространению данных штаммов в нозокомиальной среде [5].

Несмотря на то что в большинстве случаев инфекция, вызванная *S. Typhimurium*, протекает как гастроэнтерит средней и легкой тяжести, в неко-

торых случаях бактерии могут вызвать тяжелые инвазивные формы заболевания с сепсисом и даже летальным исходом. Большая доля таких осложнений приходится на нозокомиальные инфекции. Штаммы сальмонелл, распространяющиеся в госпитальной среде, как правило, отличаются от внебольничных изолятов множественной лекарственной устойчивостью (полирезистентностью) [5, 6].

В ряде отечественных [5, 7, 8] и зарубежных публикаций [9–11] отмечается увеличение частоты нозокомиальных сальмонеллезов, вызванных *S. Typhimurium*, с преобладанием инвазивной формы инфекции, при которой назначение антимикробных препаратов является необходимым.

Для выбора адекватной антимикробной химиотерапии рекомендуется определять чувствительность сальмонелл при неинвазивной инфекции к следующим препаратам: ампициллину, фторхинолонам, ко-тримоксазолу; а в случае инвазивного сальмонеллеза – к хлорамфениколу и цефалоспорином III поколения [12]. Вместе с тем, глобальное распространение в последние годы получили полирезистентные штаммы *S. Typhimurium*, устойчивые к ампициллину, ко-тримоксазолу, хлорамфениколу, тетрациклину, стрептомицину, сульфаниламидам и ряду других антимикробных препаратов [11, 13–15]. Данные молекулярного типирования свидетельствуют о преимущественно клональном распространении таких штаммов [16]. Наибольшую опасность в настоящее время представляет появление и распространение штаммов *S. Typhimurium*, устойчивых к цефалоспорином III поколения (цефотаксиму, цефтриаксону) и фторхинолонам – препаратам выбора для лечения инвазивных сальмонеллезов [16, 17].

Резистентность к цефалоспорином III поколения у сальмонелл может быть обусловлена продукцией кодируемых плазмидами β -лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС) молекулярного класса А или цефалоспориноаз (AmpC) класса С. Экспрессия БЛРС, относящихся к группам TEM, SHV и особенно часто CTX-M, является наиболее распространенным механизмом устойчивости к современным цефалоспорином у сальмонелл [18].

Устойчивость к хинолонам, как правило, связана с мутациями хромосомных генов ДНК-гиразы

и/или топоизомеразы IV. У сальмонелл, как и у большинства других грамотрицательных бактерий, резистентность к налидиксовой кислоте и пониженная чувствительность к фторхинолонам формируется в результате появления единичных аминокислотных замен в основном сайте связывания хинолонов – QRDR области А-субъединицы ДНК-гиразы (GyrA), обычно в позициях 83 и 87. Наличие нескольких мутаций в QRDR области обеспечивает высокий уровень устойчивости к ципрофлоксацину [19]. Известно, что даже резистентность низкого уровня к ципрофлоксацину, обусловленная единичными мутациями в QRDR GyrA, зачастую приводит к клинической неэффективности фторхинолонов или же требует продления курса терапии ципрофлоксацином [20]. Устойчивость низкого уровня к хинолонам у сальмонелл может быть связана также с иными механизмами: снижением проницаемости наружной мембраны, активным выведением антибиотика из клетки (эффлюксом) [21], продукцией плазмидокодируемых протективных Qng-белков [22, 23] или ципрофлоксацин-модифицирующего фермента, кодируемого геном *aac(6')* *Ib-cr* [24].

В свете вышесказанного становится очевидно, что распространение антибиотикорезистентности у сальмонелл должно находиться под тщательным эпидемиологическим контролем. Немаловажным при этом является использование современных молекулярно-генетических методов субтипирования сальмонелл, позволяющих адекватно оценить степень родственности, источники появления и распространения полирезистентных штаммов [25]. Ранее использовавшийся с этой целью метод фаготипирования, согласно современным данным, далеко не всегда позволяет оценить родственность штаммов сальмонелл, вследствие возможности изменения фаготипа в результате потери или приобретения мобильного элемента – профага [2]. То же самое касается метода плазмидного типирования, который как дополнительный метод по-прежнему является ценным для описания свойств штаммов и понимания природы распространения антибиотикорезистентности, но, тем не менее, не может использоваться в качестве самостоятельного подхода для оценки родственности изолятов ввиду высокой вариабельности плазмид, их способности к горизонтальному переносу и возможности спонтанной элиминации [26].

Метод электрофореза в пульсирующем поле (PFGE), позволяющий проводить сравнение макрорестрикционных профилей ДНК микроорганизмов, на протяжении ряда лет считался «золотым стандартом» типирования изолятов рода

Salmonella [27]. Однако основными недостатками данного подхода являются высокая трудоемкость и сложность интерпретации данных для оценки филогенетических связей между штаммами.

Метод мультилокусного анализа тандемных повторов (MLVA), который основан на амплификации участков ДНК с переменным числом тандемных повторов (VNTR локусов), по данным многих работ, превосходит по своей дискриминирующей способности метод пульс-электрофореза. Поэтому метод MLVA был предложен как альтернатива для генетического типирования микроорганизмов, обладающих преимущественно клональной популяционной структурой, в частности *S. enterica* [25, 27–29]. Другим преимуществом MLVA является высокая стандартизация анализа, которая позволяет сравнивать результаты, полученные разными лабораториями [30].

Эпидемиология, популяционная структура и механизмы антибиотикорезистентности штаммов *S. Typhimurium*, циркулирующих в госпиталях на территории Российской Федерации и сопредельных государств, остаются недостаточно изученными. В связи с этим целью нашего исследования явилось определение механизмов резистентности к β -лактамам и хинолонам, а также оценка генетической родственности нозокомиальных цефотаксиморезистентных штаммов *S. Typhimurium*, выделенных в различных регионах России, Беларуси и Казахстана.

Материал 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 1994–2009 гг. (табл. 1). Все изоляты были неповторяющимися (по одному от каждого пациента), пятнадцать из них были выделены у детей в возрасте до 3 лет. Дополнительно в исследование были включены два чувствительных эпидемиологически неродственных изолята SE054/Sm-1878 и SE086/Mz-1910 из тех же стационаров, откуда были получены резистентные штаммы *S. Typhimurium*, и цефотаксиморезистентный штамм CAS5 из Аргентины, продуцирующий БЛРС СТХ-М-2 [31], которые были использованы в качестве контролей при оценке клональности изолятов. Первичная видовая и серологическая идентификация проводилась в локальных микробиологических лабораториях в соответствии с принятыми стандартами. Повторно все штаммы были иденти-

Таблица 1. Источники выделения цефотаксиморезистентных изолятов *S. Typhimurium*

Регион	Количество изолятов	Годы выделения
Смоленск, Россия	26	1994–2009
С.-Петербург, Россия	6	1996–1997
Гомель, Беларусь	22	1997–2007
Москва, Россия	1	1998
Витебск, Беларусь	13	1999–2000
Иркутск, Россия	1	2003
Воронеж, Россия	5	2004
Ярославль, Россия	2	2004
Караганда, Казахстан	9	2006–2007
Томск, Россия	3	2007–2008

фицированы в НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии 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 (МПК) антибиотиков были определены с помощью метода последовательных разведений в агаре Мюллера–Хинтон [12] для следующих препаратов: ампициллин, амоксициллин/клавулановая кислота (2:1), азтреонам, цефотаксим, цефотаксим/клавулановая кислота (4 мг/л), цефтазидим, цефтазидим/клавулановая кислота (4 мг/л), цефепим, цефоперазон, цефоперазон/сульбактам (1:1), пиперациллин, пиперациллин/тазобактам (4 мг/л), гентамицин, левофлоксацин, ко-тримоксазол, имипенем, меропенем, эртапенем, налидиксовая кислота, ципрофлоксацин. Чувствительность к тетрациклину и хлорамфениколу была определена с помощью диско-диффузионного метода [12]. Для контроля качества определения чувствительности были использованы штаммы *E. coli* ATCC25922 и *E. coli* ATCC35218. Интерпретация результатов определения чувствительности проводилась с использованием критериев Европейского комитета по оценке антибиотикочувствительности (EUCAST) 2012 г. [32]. Для оценки чувствительности к амоксициллину/клавулановой кислоте и налидиксовой кислоте использовались критерии Института клинических лабораторных стандартов (CLSI) 2011 г. [12].

Продукция БЛРС оценивалась с помощью метода двойных дисков [12], а также по снижению не менее чем в 8 раз МПК цефотаксима или цефтазида в присутствии клавулановой кислоты (4 мг/л).

Детекция генов β-лактамаз и их генетического окружения. Гены β-лактамаз, принадлежащих

к группам OXA-1, TEM, SHV и CTX-M, определяли с помощью ПЦР с праймерами, перечисленными в табл. 2, как описано ранее [7, 33, 34]. Для выявления ассоциации генов *bla*_{CTX-M} с известными мобильными элементами – *ISEcp1* или *ISCR1* (ранее описанным как *orf513*) использовали ПЦР-картирование с праймерами CTX-M-Rext, ISEcp1-F и *orf513* [7].

Секвенирование полученных ПЦР-продуктов проводилось с помощью амплификационных праймеров, наборов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора ABI Prism® 310 (Applied Biosystems, США).

Определение мутаций в QRDR области гена *gyrA*. Амплификацию и прямое секвенирование внутреннего фрагмента гена *gyrA* проводили с помощью праймеров STGYRA1 и STGYRA12-GT как описано ранее [1].

Анализ плазмид, несущих *bla*_{CTX-M} гены. Конъюгационный перенос плазмид от исследуемых штаммов в реципиентный штамм *E. coli* AB1456 (Rif^R) [35] проводился при совместном культивировании клеток донора и реципиента в бульоне Мюллера–Хинтон с последующим рассевом на плотные среды, содержащие рифампицин (100 мг/л) в комбинации с ампициллином (100 мг/л) или цефотаксимом (1 мг/л).

CTX-M-кодирующие плазмиды были выделены у исследованных штаммов и их трансконъюгантов с помощью наборов Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Германия). С помощью полученной плазмидной ДНК был трансформирован компетентный лабораторный штамм *E. coli* EPI300.

Рестрикционный анализ плазмид, повторно выделенных от трансформантов, проводили с помощью эндонуклеаз *PstI* (Promega, США) и *PvuII* (Amersham, США) в соответствии с методикой, описанной ранее [7].

Таблица 2. **Использованные праймеры**

№	Наименование праймера	Последовательность (5'–3')	Назначение	Ссылка
1	TEM fwd	GCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACC	blaTEM	[7]
2	TEM rev	GACAGTTACCAATGCTTAATCA		
3	SHV fwd	CGCCGGGTATTCTTATTTGTGCGC	blaSHV	[33]
4	SHV rev	TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA		
5	OXA-1 fwd	ATGAAAAACACAATACATATCAAC	blaOXA-1	[7]
6	OXA-1 rev	AAAGGACATTCACGCCTGTG		
7	CTX-M-Fext	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	blaCTX-M	[34]
8	CTX-M-R1c	CCGCTGCCGGTCTTATC		
9	CTX-M(1-2)-RNest	TGATCTCAACGCGCTGATTTA		
10	CTX-M-Rext	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA		
11	ISEcp1-F	TGTCTGGTATAATAAGAATATCATC	Генетическое окружение blaCTX-M	[7]
12	ORF513	ATCCATCACAGAGTCGTCTC		
13	STGYRA1	TGTCCGAGATGGCCTGAAGC	QRDR GyrA	[1]
14	STGYRA12-GT	CGTTGATGACTTCCGTCAGGT		

Типирование изолятов с помощью пульс-электрофореза макрорестрикционных фрагментов геномной ДНК (PFGE). PFGE-типирование выполнено в соответствии с методом, описанным M.J. Struelens и соавт. [36]. Геномная ДНК была подвергнута рестрикции эндонуклеазой *XbaI* (MBI Fermentas, Литва). Разделение фрагментов ДНК проводили на приборе CHEF DRIII (Bio-Rad, США). Для интерпретации результатов анализа использовали критерии, предложенные F.C. Tenover и соавт. [37].

Типирование изолятов с помощью мультилокусного анализа тандемных повторов (MLVA). MLVA-типирование выполнено по методике В.А. Lindstedt и соавт. [25] с детекцией по пяти VNTR локусам (STTR3, STTR5, STTR6, STTR9, STTR10). Анализ соответствующих флуоресцентно-меченных ПЦР-продуктов был проведен с помощью генетического анализатора ABI Prism® 310 и программного обеспечения Peak Scanner Software v.1.0 (Applied Biosystems). Кластерный анализ MLVA-профилей выполнен с помощью программного пакета BioNumerics Software v.6.1 (Applied Maths, Бельгия) с использованием алгоритма минимального остовного дерева (minimum spanning tree, MST) и метода невзвешенных попарных арифметических средних (*unweighted pair-group method using arithmetic averages* – UPGMA) для категориальных значений.

Результаты исследований

Чувствительность к антибиотикам

Результаты определения чувствительности исследованных нозокомиальных изолятов *S. Typhimurium* представлены в табл. 3. Все изоляты обладали высоким уровнем устойчивости к цефоперазону, цефотаксиму, цефепиму и азтреонаму (МПК ≥ 256 , ≥ 256 , ≥ 128 и ≥ 64 мг/л соответственно) и пониженной по сравнению с чувствительными в норме штаммами чувствительностью к цефтазидиму (МПК 0,5–16 мг/л). Тем не менее, 6,4% изолятов оставались чувствительными к цефтазидиму согласно критериям EUCAST. При определении МПК и методом «двойных дисков» у всех изолятов был выявлен синергизм между оксиминоцефалоспоринами и клавулановой кислотой, что свидетельствует о продукции БЛРС.

Устойчивость к ингибиторозащищенным пенициллинам была вариабельной: 88,5 и 75,7% изолятов были нечувствительны соответственно к амоксицилину/клавулановой кислоте и пиперациллину/тазобактаму. Все изоляты проявляли чувствительность к карбапенемам.

Ассоциированная устойчивость к одному и более не- β -лактамным антибиотикам была отмечена у всех изолятов. Резистентностью одновременно к пяти не- β -лактамным антибиотикам обладали 30,8% изолятов (профиль резистентности Tet-Chl-Gm-Sxt-Nal), к четырем – 34,6% (профили Tet-Chl-Gm-Sxt – 30,8% или Tet-Chl-Gm-Nal – 3,8%), к трем препаратам – 7,7% (профили Tet-Chl-Gm – 6,4%

Таблица 3. Чувствительность изолятов к антибиотикам

Антибиотик	МПК, мг/л			Распределение штаммов по категориям чувствительности, %		
	диапазон	МПК ₅₀	МПК ₉₀	Ч	УР	Р
Ампициллин	≥256	≥256	≥256	0	0	100,0
Амоксициллин/клавулановая кислота	8–32	32	32	11,5	15,4	73,1
Пиперациллин	≥256	≥256	≥256	0	0	100,0
Пиперациллин/тазобактам	2–≥256	≥256	≥256	24,4	1,3	74,4
Цефоперазон	4–≥256	≥256	≥256	–	–	–
Цефоперазон/сульбактам	2–128	16	32	–	–	–
Цефотаксим	2–≥256	≥256	≥256	0	1,3	98,7
Цефотаксим/клавулановая кислота	0,06–1	0,25	0,5	–	–	–
Цефтазидим	0,25–16	8	16	6,4	1,3	92,3
Цефтазидим/клавулановая кислота	0,25–1	0,5	0,5	–	–	–
Цефепим	4–≥256	128	128	0	1,3	98,7
Азтреонам	0,006–≥256	64	64	3,8	0	96,2
Имипенем	0,06–0,5	0,25	0,25	100,0	0	0
Дорипенем	0,06	0,06	0,06	100,0	0	0
Меропенем	0,06–0,125	0,06	0,125	100,0	0	0
Эртапенем	0,06–0,5	0,06	0,06	100,0	0	0
Гентамицин	2–≥256	16	16	10,3	1,3	88,5
Ко-тримоксазол	0,125–≥256	≥256	≥256	33,3	0	66,7
Налидиксовая кислота	4–≥512	8	≥512	56,4	0	43,6
Ципрофлоксацин	0,03–0,5	0,03	0,5	100,0	0	0
Левифлоксацин	0,03–1	0,06	0,5	100,0	0	0
Хлорамфеникол	–	–	–	26,9	0	73,1
Тетрациклин	–	–	–	26,9	0	73,1

Примечание. Ч – чувствительные, УР – умеренно резистентные, Р – резистентные.

или Gm-Sxt-Nal – 1,3%), к двум – 24,4% (профили Gm-Sxt – 21,8% или Gm-Nal – 2,6%). Только 2,6% изолятов проявляли резистентность к одному не-β-лактамному антибиотику – гентамицину.

Среди исследованных изолятов не было выявлено ни одного резистентного к ципрофлоксацину и левифлоксацину. Значения МПК фторхинолонов не превышали 0,5 мг/л, однако 43,6% изолятов проявляли устойчивость к налидиксовой кислоте.

Молекулярная характеристика детерминант резистентности к β-лактамам и хинолонам

У всех исследованных изолятов методом ПЦР в реальном времени были выявлены гены БЛРС, принадлежащие к кластеру СТХ-М-2. Анализ нуклеотидной последовательности ORF *bla*_{СТХ-М} у 10 произвольно выбранных изолятов из разных регионов показал их идентичность гену *bla*_{СТХ-М-5} (GenBank

Acc. № U95364), кодирующему ранее описанный у *S. Typhimurium* вариант БЛРС – СТХ-М-5.

При амплификации с праймерами к внутренним последовательностям генов *tnpA* *ISEcp1* и *bla*_{СТХ-М-5}, у всех изолятов был получен характерный ПЦР-фрагмент длиной около 470 пн. ПЦР-тест на наличие сцепления гена *bla*_{СТХ-М} с *ISCR1* не дал положительных результатов ни у одного из исследованных изолятов, кроме СТХ-М-2-продуцирующего штамма CAS-5 из Аргентины, взятого для сравнения. Таким образом, результаты ПЦР картирования свидетельствуют о наличии характерной для *bla*_{СТХ-М-5} ассоциации с инсерционной последовательностью *ISEcp1* [38].

ПЦР-анализ на наличие генов других распространенных β-лактамаз молекулярных классов А и D выявил присутствие *bla*_{ТЕМ} у 8,8% и *bla*_{ОХА-1}-подобных генов у 75,6% изолятов (рис. 1). Гены SHV β-лактамаз не были обнаружены. Наличие

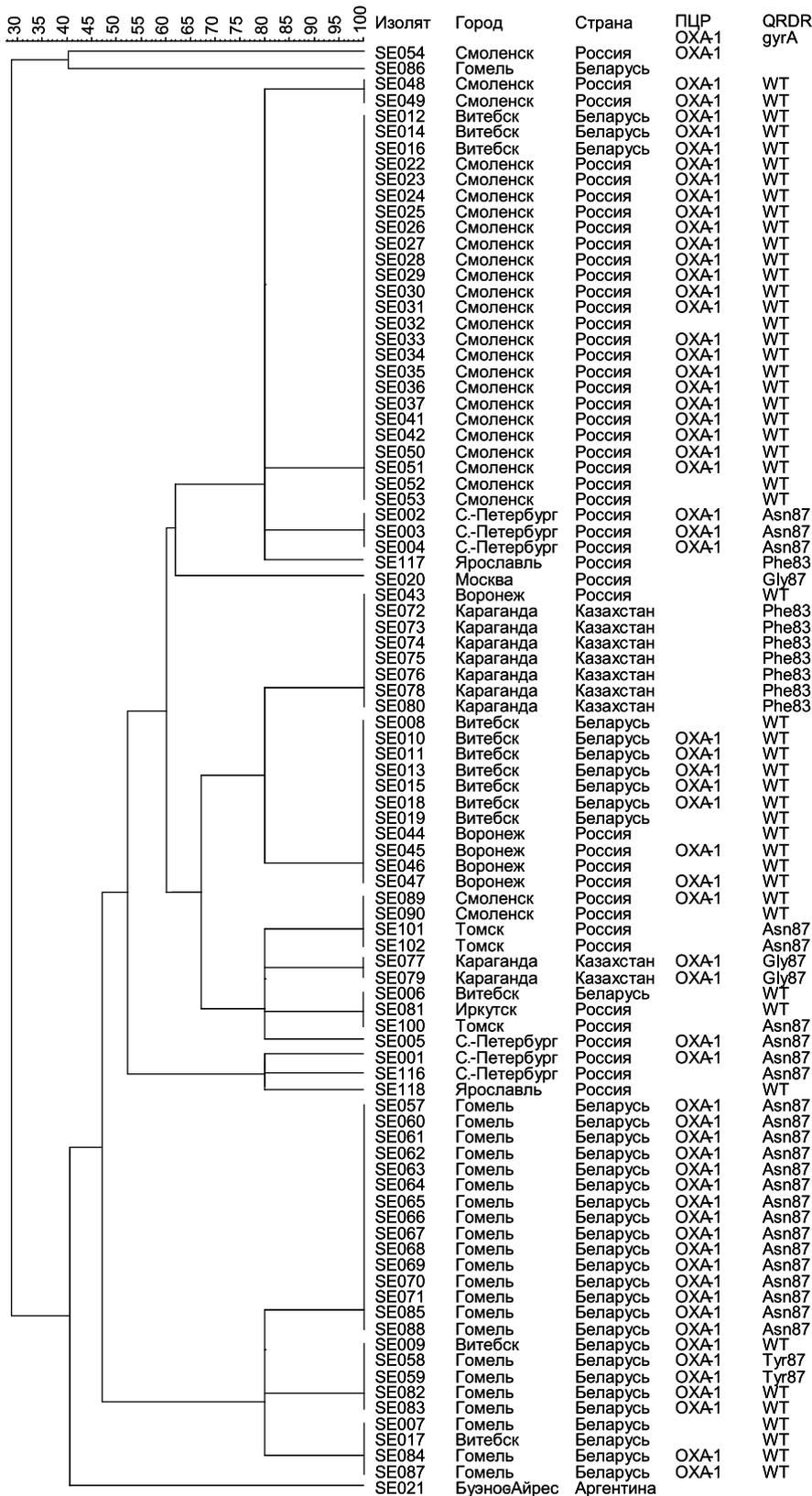


Рис. 1. Дендрограмма MLVA-профилей, построенная методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA). Длина ветвей пропорциональна числу отличающихся VNTR локусов

ОХА-1-подобных β-лактамаз, которые проявляют устойчивость к ингибированию клавулановой кислотой и тазобактамом [39], ожидаемо коррелировало с резистентностью к пиперациллину/тазобактаму.

Методом ПЦР и последующего секвенирования у изолятов, резистентных к налидиксовой кислоте, были выявлены различные точечные мутации, приводящие к аминокислотным заменам в QRDR области А субъединицы ДНК-гиразы (GyrA): Asn-87, Gly-87, Tyr-87 и Phe-83 (см. рис. 1). Во всех случаях точечные мутации в QRDR были единичными и приводили к значительному повышению МПК только налидиксовой кислоты, но не фторхинолонов.

Анализ СТХ-М-кодирующих плазмид

При конъюгативном переносе плазмид выявлено 2 типа трансконъюгантов, отличающихся по фенотипу резистентности. Трансконъюганты первого типа были получены от большинства исследованных изолятов при культивировании на среде с рифампицином и ампициллином с высокой частотой (10^{-3} – 10^{-4}) и обладали резистентностью к пенициллинам, комбинациям пенициллинов с ингибиторами, тетрациклину, хлорамфениколу, а в некоторых случаях – также к гентамицину и ко-тримоксазолу, но проявляли чувствительность к оксиимино-β-лактамам. С помощью ПЦР у трансконъюгантов данного типа были выявлены только гены ОХА-1-подобных пенициллиназ. Трансконъюганты второго типа были получены

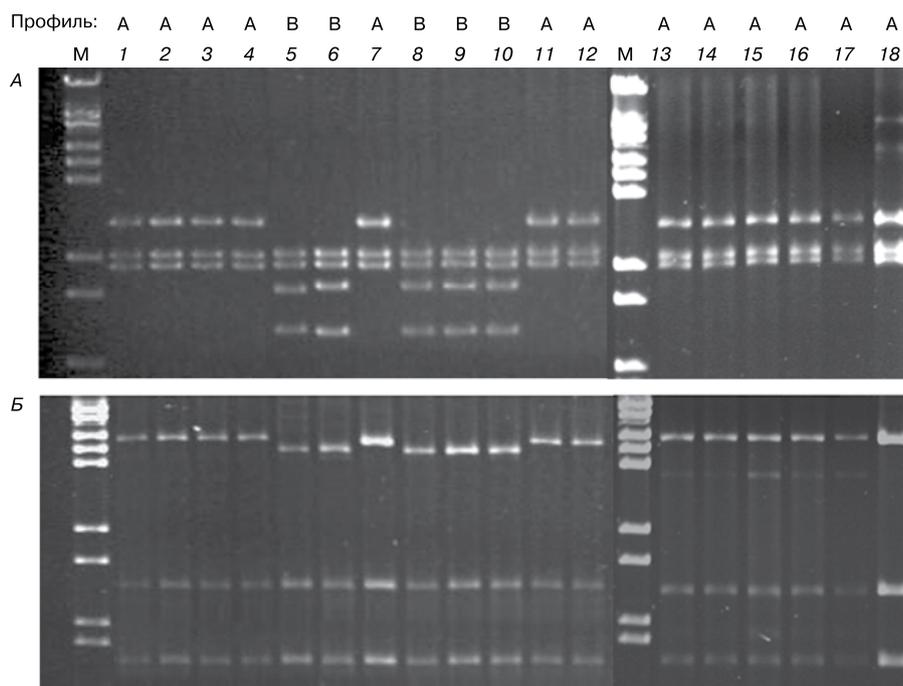


Рис. 2. Рестрикционный анализ CTX-M-кодирующих плазмид, полученных от разных изолятов. А – рестрикция эндонуклеазой *Pst*I, Б – рестрикция эндонуклеазой *Pvu*II. Изоляты: 1 – SE007/Re-27; 2 – SE009/Vt-6570; 3 – SE010/Vt-3078; 4 – SE015/Vt-13526; 5 – SE046/Vo-516; 6 – SE008/Vt-1603; 7 – SE014/Vt-14533; 8 – SE019/Vt-700; 9 – SE018/Us-16753; 10 – SE013/Us-1845; 11 – SE011/Us-13205; 12 – SE012/Or-13935; 13 – SE057/Go-16; 14 – SE058/Go-302; 15 – SE072/Ka-1124; 16 – SE084/Go-735; 17 – SE087/Re-401; 18 – SE089/Sm-527; М – маркер молекулярной массы λ /BstEII+pUC18/*Hae*III.

всего от двух цефотаксиморезистентных изолятов *S. Typhimurium* на среде, содержащей рифампицин и цефотаксим, с гораздо меньшей частотой (10^{-7} – 10^{-8}) и проявляли БЛРС фенотип (резистентность к пенициллинам и оксимино- β -лактамам), обусловленный наличием гена *bla*_{CTX-M}, оставаясь при этом чувствительными к пиперацилину/тазобактаму и не- β -лактамам антибиотикам.

Плазмиды, кодирующие CTX-M БЛРС, были также выделены от 26 изолятов из разных стационаров и перенесены в реципиентный штамм *E. coli* EPI300 с помощью трансформации. Полученные цефотаксиморезистентные трансформанты обладали единственной низкомолекулярной плазмидой (размером около 7–8 тпн). Рестрикционный анализ плазмид, выделенных от трансформантов, показал, что все они могут быть отнесены к одному из двух сходных между собой типов (рис. 2). Наиболее распространенный рестрикционный профиль А был характерен для 21 изолята, 11 из которых были выделены в стационарах Беларуси, 9 – в России и 1 – в Казахстане. Плазмиды с профилем В, выявленные у 4 изолятов из Беларуси и одного – из России, отличались наличием дополнительного

сайта рестрикции для эндонуклеазы *Pst*I и большим (приблизительно на 750 пн) размером.

У одного изолята из Иркутска (SE081/Ir-1732) и трех из Томска (SE100/Tm-27714, SE101/Tm-27715, SE102/Tm-27716) не удалось выделить и перенести CTX-M-плазмиды путем трансформации или конъюгации. Тем не менее, присутствие у этих изолятов гена *bla*_{CTX-M-5}, сцепленного с *ISEcp1*, было подтверждено с помощью ПЦР.

Типирование изолятов

Типирование с помощью метода PFGE было проведено для 14 изолятов, выделенных в России и Беларуси до 2003 г. Эпидемиологически неродственный штамм *S. Typhimurium* из Аргентины, продуцирующий CTX-M-2, был использован для сравнения.

Метод позволил отнести исследованные изоляты к одному из восьми макрорестрикционных паттернов (рис. 3). При этом 7 из 8 паттернов проявляли выраженное сходство. Семь изолятов из Витебска, Москвы и Санкт-Петербурга имели одинаковый паттерн (А1). Остальные 7 изолятов из России и Беларуси имели макрорестрикционные паттерны (А2–А7), отличающиеся от первого паттерна максимум по трем полосам, что согласно критериям, предложенным F.C. Tenover и соавт. [26], свидетельствует о вероятной родственности соответствующих изолятов. Аргентинский штамм CAS5 обладал уникальным паттерном (В1), который отличался от паттернов А1–А7 четырьмя полосами. Таким образом, результаты PFGE анализа свидетельствуют о наличии генетического родства между всеми CTX-M-5-продуцирующими изолятами *S. Typhimurium*, выделенными во время нозокомиальных вспышек в различных стационарах на территории России и Беларуси.

Все CTX-M-продуцирующие изоляты, включая более «поздние» по времени выделения культуры из России, Беларуси и Казахстана, были также типированы с помощью мультилокусного анализа

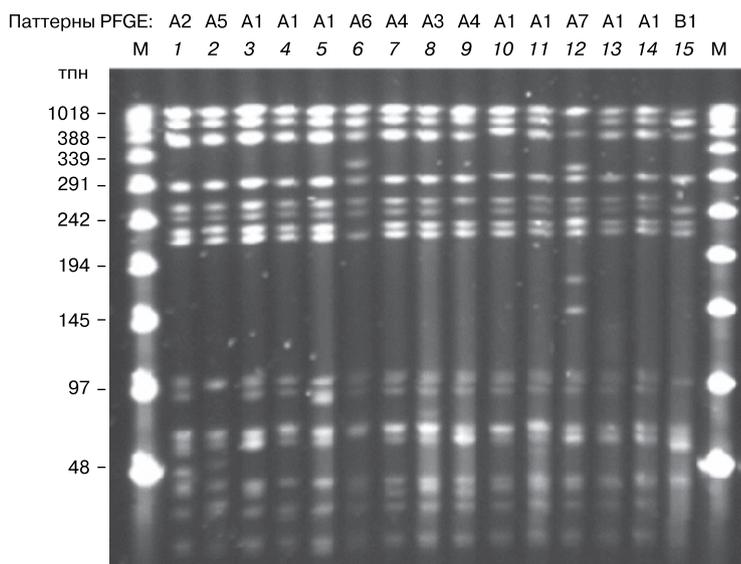


Рис. 3. Генетическое родство CTX-M-продуцирующих штаммов *S. Typhimurium* на основании сравнения паттернов PFGE. Белорусские штаммы: 1 – SE006/Vt-1358; 2 – SE007/Re-27; 3 – SE008/Vt-1603; 4 – SE009/Vt-6570; 5 – SE010/Vt-3078; 6 – SE011/Us-13205; 7 – SE012/Or-13935; 8 – SE013/Us-1845; 9 – SE014/Vt-14533; 10 – SE015/Vt-13526; 11 – SE019/Vt-700; 12 – SE018/Us-16753. Российские штаммы: 13 – SE004/Sp-891; 14 – SE020/Mo-20. Аргентинский штамм – 15 – SE021/Ar-CAS5. М – маркер молекулярной массы бактериофаг λ .

тандемных повторов (MLVA). Для сравнения в исследование были также включены чувствительные к цефалоспорином штаммы *S. Typhimurium* SE054/Sm-1878 и SE086/Mz-1910, выделенные в тех же стационарах, где и резистентные изоляты. MLVA типирование позволило отнести все изоляты к 17 типам. Несмотря на большое количество выявленных MLVA-типов, все CTX-M-продуцирующие изоляты были отнесены к одной клональной группе в результате кластеризации MLVA профилей с использованием алгоритма *минимального остовного дерева* (MST) (рис. 4). Соответствующие MLVA-профили отличались друг от друга на 1–2 VNTR-локуса. Чувствительные к цефалоспорином штаммы SE054/Sm-1878 и SE086/Mz-1910 предсказуемо отличались между собой и от наиболее близких изолятов из описанной клональной группы по 3 и более VNTR-локусам.

Изоляты, принадлежащие к 7 MLVA-типам, были получены как минимум из двух разных регионов, что наглядно отражает легкость распространения клонов, принадлежащих указанной клональной группе (см. рис. 4). Интересно отметить, что 3 наиболее ранних изолята из данной группы, выделенные в Санкт-Петербурге в 1994 г. (SE002/ Sp-832, SE003/ Sp-838, SE004/ Sp-891), были отнесены к MLVA-типу А, который является «центральным»

для всей клональной группы, что позволяет предположить их близость к исходному штамму, потомки которого распространились на территории трех стран.

Обсуждение результатов

Клональное распространение полирезистентных штаммов *S. Typhimurium* в разных странах и регионах мира широко описано в литературе [11, 16, 40], однако популяционная структура и эпидемиология нозокомиального сальмонеллеза, вызванного штаммами с множественной резистентностью, в России и соседних странах мало изучена.

Проблема нозокомиального сальмонеллеза в России обозначилась в 70-е годы XX века, пик заболеваемости в России пришелся на 1992 г. При этом, более чем в 80% случаев нозокомиальная форма сальмонеллеза была вызвана штаммами серотипа Typhimurium [5, 41]. В 1999 г. в России было зарегистрировано 32 вспышки нозокомиального сальмонеллеза, в которые в общей сложности было вовлечено 472 человека [5]. До недавнего времени было всего несколько сообщений о

распространении резистентных к цефалоспорином *S. Typhimurium* в России и Беларуси. Крупные вспышки нозокомиального сальмонеллеза, вызванного полирезистентными штаммами, были зарегистрированы в 1994–2003 гг. в Москве, Санкт-Петербурге, Смоленской, Минской, Гомельской, Гродненской и Витебской областях [7]. Выделение цефотаксиморезистентных штаммов, продуцирующих БЛРС CTX-M-5, было описано в Гомельской области и позднее – в 2007 г. [8]. Помимо этого, CTX-M-5-продуцирующие штаммы *S. Typhimurium* выделялись в Греции, Венгрии, Латвии и США [38, 42, 43].

Проведенное нами исследование показало, что у всех нозокомиальных изолятов *S. Typhimurium*, выделенных в России, Беларуси и Казахстане, резистентность к оксиминоцефалоспорином обусловлена продукцией БЛРС CTX-M-5. У всех изолятов ген *bla*_{CTX-M-5} одинаковым образом связан с инсерционным элементом *ISEcp1* и находится в большинстве случаев на небольших плаزمиде с идентичными или близкими рестрикционными профилями. Данные плазмиды не несут дополнительные детерминанты резистентности и являются неконъюгативными. Тем не менее перенос CTX-M-5-кодирующих плазмид от двух изолятов при конъюгации с низкой частотой свидетельствует о

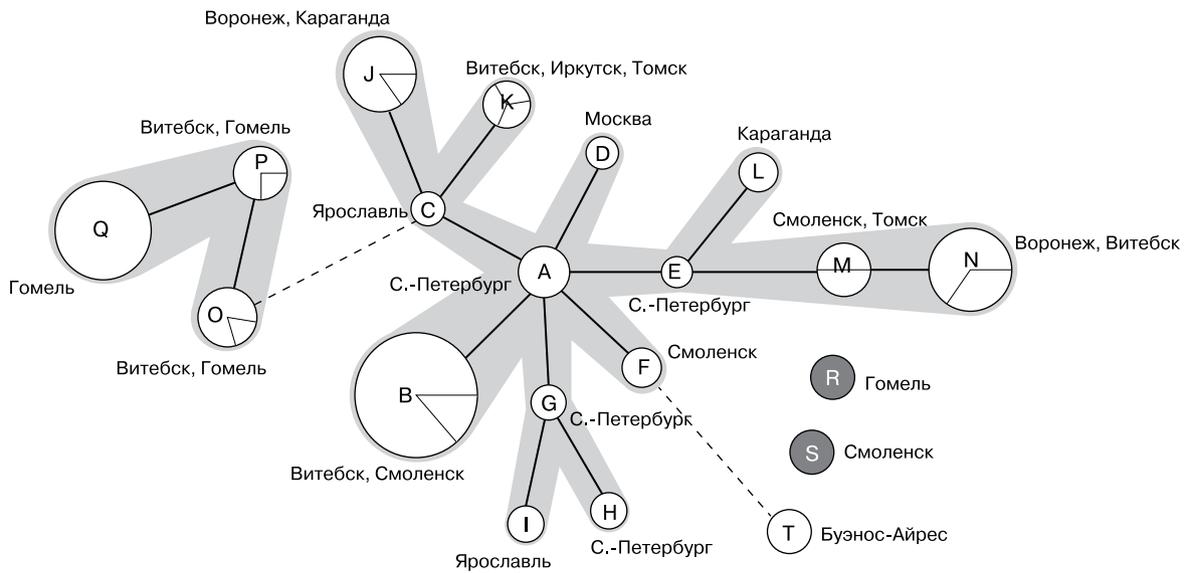


Рис. 4. Кластеризация MLVA-профилей на основании алгоритма минимального остовного дерева (MST).

Примечание. Каждому MLVA-типу соответствует круг, обозначенный буквой латинского алфавита; названия городов, где были выделены изоляты, указаны рядом с соответствующими типами. Размер круга отражает количество изолятов, принадлежащих данному MLVA-типу. Длина и тип соединительных отрезков отражают 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 клональные группы (выделены серым фоновым цветом). Различия на 3 локуса и более на диаграмме не отражены. Круги черного цвета соответствуют изолятам, не продуцирующим БЛРС.

возможности их ко-мобилизации другими плазмидами. У четырех изолятов отсутствие соответствующих плазмид может быть связано с транслокацией гена *bla*_{CTX-M}, опосредованной *ISEcp1*, которая была описана в ряде публикаций [44–47]. Аналогичный характер ассоциации гена *bla*_{CTX-M-5} с *ISEcp1* с разницей в 3 точечные мутации, локализованные в некодирующей области перед геном β-лактамазы (GenBank #AF286192) был описан у эпидемического штамма *S. Typhimurium* из Латвии [38]. Так же как и у исследованных нами изолятов, у латвийского штамма ген *bla*_{CTX-M-5} был выявлен в составе небольшой (~10 тпн) плазмиды, что указывает на возможную общность их происхождения.

Следует отметить, что близкий по структуре ген *bla*_{CTX-M-2} у штамма *S. Typhimurium* из Аргентины имеет иное генетическое окружение, связан с *ISCR1* элементом и находится в составе так называемого «модифицированного интегрона 1 класса» на большой конъюгативной плазмиде [31].

Дополнительная устойчивость к ингибиторозащищенным пенициллинам, выявленная у большинства исследованных нами изолятов *S. Typhimurium*, была связана с ко-продукцией ОХА-пенициллиназ, для которых характерна нечувствительность к ингибированию клавуланатом, тазобактамом и

сульбактамом. Гены ОХА-1-подобных β-лактамаз были выявлены в составе дополнительных конъюгативных плазмид, которые несли также детерминанты устойчивости к не-β-лактамам антибиотикам: тетрациклину, хлорамфениколу, гентамицину и ко-тримоксазолу в различных сочетаниях.

Учитывая полирезистентность CTX-M-5-продуцирующих штаммов *S. Typhimurium* особое значение имеет факт выявления у них устойчивости к хинолонам. Несмотря на то что все исследованные изоляты проявляли чувствительность к ципрофлоксацину, согласно критериям EUCAST, 43,6% из них были резистентны к налидиксовой кислоте вследствие наличия характерных аминокислотных замен в позициях 83 или 87 А-субъединицы ДНК-гиразы (*GyrA*). Согласно рекомендациям CLSI устойчивость к налидиксовой кислоте, опосредованная мутациями в QRDR *GyrA*, должна рассматриваться как предиктор возможной клинической неэффективности терапии фторхинолонами при инвазивном сальмонеллезе [12]. Известно также, что наличие единичных мутаций в QRDR *GyrA* увеличивает риск селекции дополнительных (кооперативных) мутаций и формирования резистентности высокого уровня к фторхинолонам [3].

Оба использованных нами метода субтипирования штаммов *S. Typhimurium* – пульс-электрофорез

*Xba*I макрорестрикционных фрагментов геномной ДНК (PFGE) и мультилокусный анализ тандемных повторов (MLVA) – показали, что все СТХ-М-5-продуцирующие нозокомиальные изоляты сальмонелл, выделенные на территории России, Беларуси и Казахстана в период с 1994 по 2009 гг., представляют одну клональную группу и существенно отличаются по совокупности молекулярно-генетических характеристик от чувствительных штаммов *S. Typhimurium*, выделенных в тех же стационарах.

Наибольшей дифференцирующей способностью в отношении клинических штаммов *S. Typhimurium* обладал метод MLVA. Анализ данных MLVA-типирования с помощью алгоритма минимального остоного дерева (minimum spanning tree) позволяет выявить достоверные связи между исследуемыми изолятами и является более информативным по сравнению с анализом результатов PFGE-типирования. Полученные нами результаты подтверждают вывод ряда исследователей о том, что в сочетании с должным математическим анализом метод MLVA является удобным и точным средством изучения эпидемиологии сальмонеллезов [25, 30].

Клональность пятнадцати СТХ-М-5-продуцирующих клинических изолятов *S. Typhimurium*, выделенных в Смоленске, была установлена также на основании результатов независимого исследования с использованием метода PFGE, проведенного в рамках Международной программы по мониторингу антибиотикорезистентности SENTRY [48]. В другом исследовании с использованием методов PFGE и MLVA была доказана родственность 31 СТХ-М-5-продуцирующих изолятов *S. Typhimurium*, выделенных в Гомельской области [8]. Таким образом, имеющиеся в настоящее время данные подтверждают наши наблюдения о клональном характере распространения госпитальных штаммов *S. Typhimurium*, экспрессирующих СТХ-М-5.

Несмотря на установленный с помощью молекулярно-генетических методов факт клональности полирезистентных штаммов *S. Typhimurium*, недостаточность имеющихся эпидемиологических данных не позволяет однозначно установить пути их распространения между стационарами в разных городах на территории России, Беларуси и Казахстана. Опираясь на документированные наблюдения, можно предположить, что основным путем распространения инфекции внутри стационара является передача цефотаксиморезистентных штаммов контактным путем от человека к человеку, в частности между пациентами, или посредством бессимптомного носительства у медицинского персонала и далее между стационарами – в результате перевода пациентов [5].

Так, например, в ходе данного исследования нами был выявлен случай распространения СТХ-М-5-продуцирующего штамма *S. Typhimurium* из районной больницы, где на протяжении 2 лет отмечалась его циркуляция среди пациентов, в один из стационаров города Смоленска, куда были переведены инфицированные мать и ее ребенок с тяжелой формой гастроэнтерита.

Другими авторами были описаны случаи распространения нозокомиального клона *S. enterica* между стационарами разных городов на юге США [49] и разных стран (из Филиппин в США) [50], связанные с переводом пациентов из одного стационара в другой.

Р.Т. Tassios и соавт. на основании результатов PFGE-типирования, анализа плазмид и детерминант резистентности сделали вывод о родственности штаммов *S. Typhimurium*, выделенных в Венгрии, Греции и России (в Санкт-Петербурге) [42]. При этом штамм из Санкт-Петербурга (SE005/Sp-893), описанный в работе Р.Т. Tassios и соавт. как родственник греческим и венгерским штаммам, по данным выполненного нами молекулярного типирования, принадлежит к той же клональной группе, что и остальные изоляты из России. Кроме того, известны факты «экспортирования» пациентами СТХ-М-продуцирующих штаммов *S. Typhimurium* из южной части России в другие страны: в частности – российским иммигрантом в Грецию в 1998 г. [51] и ребенком, усыновленным в США в 2000 г. [43]. Несмотря на отсутствие данных типирования этих штаммов, примечательным является тот факт, что выделенный в США изолят характеризовался наличием плазмиды размером до 9 тпн, несущей ген *bla*_{СТХ-М-5} и следовательно, сходной с плазмидами, обнаруженными у нозокомиального штамма из Латвии [38] и штаммов, циркулирующих на территории России, Казахстана и Беларуси.

Все вышесказанное позволяет сделать вывод о широком географическом распространении штаммов *S. Typhimurium*, принадлежащих к единой клональной группе. Наиболее важной особенностью штаммов данной группы является продукция БЛРС СТХ-М-5. Большинство изолятов данной группы проявляют ассоциированную устойчивость к антибиотикам разных классов за счет комбинации дополнительных плазмидных и хромосомных детерминант резистентности. Имеющиеся эпидемиологические данные указывают на возможность быстрого распространения клона в госпитальной среде путем передачи возбудителя между пациентами и, возможно, медицинским персоналом.

Литература

1. Nakaya H., Yasuhara A., Yoshimura K., Oshihoi 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.
2. Lan R., Reeves P.R., Octavia S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect Genet Evol* 2009; 9(5): 996-1005.
3. 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.
4. Foley S.L., Lynne A.M. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J Anim Sci* 2008; 86(14 Suppl):E173-87.
5. Акимкин В.Г., Покровский В.И. Нозокомиальный сальмонеллез взрослых. Издательство РАМН 2002:35-72.
6. Акимкин В.Г. Нозокомиальный сальмонеллез как самостоятельная нозологическая форма инфекционной патологии человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии* 1998; (4):106-110.
7. 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.
8. Tapalski D., Hendriksen R.S., Hasman H., Ahrens P., Aarestrup F.M. Molecular characterisation of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from Gomel region, Belarus. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(10):1030-3.
9. Orman B.E., Pineiro S.A., Arduino S., et al. Evolution of multiresistance in nontyphoid salmonella serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(12): 3963-70.
10. Yan J.J., Ko W.C., Chiu C.H., Tsai S.H., Wu H.M., Wu J.J. Emergence of ceftriaxone-resistant *Salmonella* isolates and rapid spread of plasmid-encoded CMY-2-like cephalosporinase, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(3):323-8.
11. 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.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (21st informational supplement). Wayne, PA, USA; 2011
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Arlet G., Barrett T.J., Butaye P., Cloeskaert A., Mulvey M.R., White D.G. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes Infect* 2006; 8(7):1945-54.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Cloeckaert A., Chaslus-Dancla E. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella*. *Vet Res* 2001; 32(3-4):291-300.
22. 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.
23. Martinez-Martinez L., Pascual A., Jacoby G.A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351(9105):797-9.
24. 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.
25. 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.
26. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18(6):426-39.
27. Swaminathan B., Barrett T.J., Hunter S.B., Tauxe R.V. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(3):382-9.
28. Hopkins K.L., Peters T.M., de Pinna E., Wain J. Standardisation of multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) for subtyping of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Euro Surveill* 2011; 16(32).
29. Tamamura Y., Uchida I., Tanaka K., et al. Molecular

- epidemiology of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolates from cattle in Hokkaido, Japan: evidence of clonal replacement and characterization of the disseminated clone. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(5): 1739-50.
30. Torpdahl M., Sorensen G., Ethelberg S., Sando G., Gammelgard K., Porsbo L.J. A regional outbreak of *S. Typhimurium* in Denmark and identification of the source using MLVA typing. *Euro Surveill* 2006; 11(5):134-6.
 31. Bauernfeind A., Casellas J.M., Goldberg M., et al. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection* 1992; 20(3):158-63.
 32. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (v 2.0.2012-01-01). www.eucast.org.
 33. Nuesch-Inderbinen M.T., Kayser F.H., Hachler H. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(5):943-9.
 34. Степанова М.Н. Мутационная изменчивость CTX-M β -лактамаз и формирование устойчивости к цефтазидиму у клинических и лабораторных штаммов *Escherichia coli* [диссертация на соискание уч. степ. к.б.н.]. Смоленск: СГМА 1-119.
 35. Kholodii G., Yurieva O., Mindlin S., Gorlenko Z., Rubochkin V., Nikiforov V. Tn5044, a novel Tn3 family transposon coding for temperature-sensitive mercury resistance. *Res Microbiol* 2000; 151(4):291-302.
 36. Struelens M.J., Rost F., Deplano A., et al. *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae bacteremia after biliary endoscopy: an outbreak investigation using DNA macrorestriction analysis. *Am J Med* 1993; 95(5):489-98.
 37. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33(9):2233-9.
 38. Bradford P.A., Yang Y., Salm D., Grope I., Gardovska D., Storch G. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(8):1980-4.
 39. Livermore D.M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4):557-84.
 40. Wasyl D., Sandvang D., Skov M.N., Baggesen D.L. Epidemiological characteristics of *Salmonella* Typhimurium isolated from animals and feed in Poland. *Epidemiol Infect* 2006; 134(1):179-85.
 41. Акимкин В.Г. Современные клинико-эпидемиологические аспекты нозокомиального сальмонеллеза. Медицинский алфавит. Эпидемиология и санитария 2010; (3):4-9.
 42. Tassios P.T., Gazouli M., Tzelepi E., et al. Spread of a *Salmonella typhimurium* clone resistant to expanded-spectrum cephalosporins in three European countries. *J Clin Microbiol* 1999; 37(11):3774-7.
 43. Zirnstein G.W., Swaminathan B., Angulo F., Tenover F., Rasheed J. Plasmid-Mediated CTX-M-5 β -lactamase Conferring Resistance to Ceftriaxone and Cefotaxime in a *Salmonella* serotype Typhimurium var. Copenhagen Isolate from an Infant Adopted from Russia. 2nd International Conference on Emerging Infectious Diseases; 2000 July; Atlanta, GA, US.
 44. Fabre L., Delaune A., Espie E., et al. Chromosomal integration of the extended-spectrum beta-lactamase gene blaCTX-M-15 in *Salmonella enterica* serotype Concord isolates from internationally adopted children. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(5):1808-16.
 45. Sun Y., Zeng Z., Chen S., Ma J., He L., Liu Y., et al. High prevalence of bla(CTX-M) extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(9):1475-81.
 46. Mendonca N., Leitao J., Manageiro V., Ferreira E., Canica M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(6):1946-55.
 47. Hopkins K.L., Batchelor M.J., Liebana E., Deheer-Graham A.P., Threlfall E.J. Characterisation of CTX-M and AmpC genes in human isolates of *Escherichia coli* identified between 1995 and 2003 in England and Wales. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28(3):180-92.
 48. Streit J.M., Jones R.N., Toleman M.A., Stratchounski L.S., Fritsche T.R. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns among gastroenteritis-causing pathogens recovered in Europe and Latin America and *Salmonella* isolates recovered from bloodstream infections in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27(5):367-75.
 49. Kay R.S., Vandeveld A.G., Fiorella P.D., et al. Outbreak of healthcare-associated infection and colonization with multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Senftenberg in Florida. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28(7):805-11.
 50. Olsen S.J., DeBess E.E., McGivern T.E., Marano N., Eby T., Mauvais S., et al. A nosocomial outbreak of fluoroquinolone-resistant salmonella infection. *N Engl J Med* 2001; 344(21):1572-9.
 51. Tzouveleki L.S., Gazouli M., Markogiannakis A., Paraskaki E., Legakis N.J., Tzelepi E. Emergence of resistance to third-generation cephalosporins amongst *Salmonella typhimurium* isolates in Greece: report of the first three cases. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42(2):273-5.

Авторы выражают благодарность Т.И. Дмитраченко, В.М. Семенову, Н.С. Козловой, Д.П. Гладину, Ф.Н. Шубину, Н.К. Фурсовой, Г.И. Нехаевой за предоставленные для исследования штаммы.