

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНТЕРОАГРЕГАТИВНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* ONT:H30 18-726 (№ В-8857), ВЫДЕЛЕННОГО ОТ ПАЦИЕНТА С ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ, И НОВЫЙ СПОСОБ ПЦР-ИДЕНТИФИКАЦИИ



М.А. Макарова^{1,2}, Е.Е. Круглов^{3,4}, Л.А. Кафтырева^{1,2}

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

³ ЧУ ОО ВО Медицинский университет «Реавиз», г. Самара, Россия

⁴ ФГБУ ГНИИИ военной медицины МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Цель работы — изучить биологические свойства энтероагрегативного штамма *Escherichia coli* (EAgEC), выделенного из биопсийного материала слизистой оболочки толстой кишки пациента с язвенным колитом, а также разработать новый способ ПЦР-идентификации штаммов этой патогруппы. *Материалы и методы.* В исследовании приняли участие 46 пациентов с верифицированным диагнозом «язвенный колит». Выделение 87 штаммов *E. coli* осуществлялось из биопсийного материала толстой кишки, полученного в ходе стандартной эндоскопической процедуры. Описание биохимических свойств бактерий сочеталось с молекулярно-генетическим определением детерминант вирулентности и наличием механизмов антибиотикорезистентности. С использованием набора реагентов «АмплиСенс®Эшерихиозы — FL» был проведен скрининг на наличие диареогенных штаммов *E. coli*, который выявил наличие одного штамма EAgEC. Методический подход по созданию нового способа идентификации штамма базировался на поиске уникальной генетической последовательности в гене глутаматдекарбоксилазы (*gad*). *Результаты.* Штамм *E. coli* 18-726 по биохимическим признакам можно описать как типичный для своего вида. Изученный штамм характеризовался фенотипом множественной резистентности к антимикробным препаратам, а также отсутствием чувствительности к пяти препаратам бактериофагов. Штамм *E. coli* 18-726 имел уникальную последовательность гена, кодирующего O-антиген, которая отличалась от 188 известных O-антигенов (ONT), и по идентичности нуклеотидной последовательности гена, кодирующего синтез H-антигена, принадлежал к серовару H30. Таким образом, антигенная формула штамма EAgEC 18-726 выражалась как ONT:H30. Штамм *E. coli* 18-726 содержал значительный спектр генов, реализующих свойства вирулентности (*iss*, *capU*, *aggA*, *aggB*, *aggC*, *aggD*, *aap*, *aar*) и резистентности к антибиотикам (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1B}, *aadA1*, *aadA5*, *mph(A)*, *catB3*). Новый способ идентификации EAgEC при хронических заболеваниях кишечника базируется на методе ПЦР с применением праймеров для специфического участка гена глутаматдекарбоксилазы (*gad*). *Заключение.* 1) Проанализированы био-

Адрес для переписки:

Круглов Егор Евгеньевич
195043, Россия, Санкт-Петербург, Лесопарковая ул., 4,
ФГБУ ГНИИИ военной медицины МО РФ.
Тел.: 8 (812) 527-39-57, 8 937 213-19-14 (моб.).
E-mail: krugegr@rambler.ru

Contacts:

Egor E. Kruglov
195043, Russian Federation, St. Petersburg, Lesoparkovaya str., 4,
State Research and Test Institute of Military Medicine.
Phone: +7 (812) 527-39-57, +7 937 213-19-14 (mobile).
E-mail: krugegr@rambler.ru

Для цитирования:

Макарова М.А., Круглов Е.Е., Кафтырева Л.А. Биологическая характеристика энтероагрегативного штамма *Escherichia coli* ONT:H30 18-726 (№ В-8857), выделенного от пациента с язвенным колитом, и новый способ ПЦР-идентификации // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 5. С. 899–908. doi: 10.15789/2220-7619-BCO-1858

Citation:

Makarova M.A., Kruglov E.E., Kaftyreva L.A. Biological characteristics of the enteroaggregative *Escherichia coli* ONT:H30 18-726 (no. B-8857) strain isolated from a patient with ulcerative colitis and a new method of PCR identification // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 5, pp. 899–908. doi: 10.15789/2220-7619-BCO-1858

химические, антигенные и молекулярно-генетические свойства штамма *E. coli* ONT:H30 18-726 (№ В-8857), выделенного от пациента с гистоморфологически установленным диагнозом «язвенный колит». 2) Создан и запатентован способ ПЦР-идентификации EAgEC, основанный на выявлении специфического участка гена глутаматдекарбоксилазы в геноме штаммов.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, EAgEC, язвенный колит, ПЦР, вирулентность, антибиотикорезистентность.

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE ENTEROAGGREGATIVE *ESCHERICHIA COLI* ONT:H30 18-726 (No. B-8857) STRAIN ISOLATED FROM A PATIENT WITH ULCERATIVE COLITIS AND A NEW METHOD OF PCR IDENTIFICATION

Makarova M.A.^{a,b}, Kruglov E.E.^{c,d}, Kaftyreva L.A.^{a,b}

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^c Reaviz Medical University, Samara, Russian Federation

^d State Research and Test Institute of Military Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the work is to assess biological properties of the enteroaggregative *Escherichia coli* (EAgEC) strain isolated from the colon mucosa biopsy material from a patient with ulcerative colitis, and to develop a new method for PCR identification of *E. coli* strains. **Materials and methods.** The study involved 46 patients with a verified ulcerative colitis. Isolation of 87 *E. coli* strains was carried out by using colon biopsy material obtained during a standard endoscopic procedure. The description of the biochemical bacterial properties was combined with the molecular genetic detection of virulence determinants and presence of antibiotic resistance mechanisms. Using the “AmpliSense® Escherichiose — FL” reagent kit, a screening for the presence of diarrheagenic *E. coli* strains was performed, which revealed the presence of a single strain of EAgEC. The methodological approach to creating a new method for strain identification was based on the search for a unique genetic sequence within the glutamate decarboxylase (*gad*) gene. **Results.** *E. coli* 18-726 can be described biochemically typical to its species. The studied strain was characterized by a multiple resistance phenotype (MDR) to antibiotics, as well as a lack of sensitivity to five bacteriophages. The *E. coli* 18-726 strain had a unique sequence of the gene encoding the O-antigen, which differed from 188 known O-antigens (ONT) and, by the identity of the nucleotide sequence of the gene encoding the synthesis of the H-antigen, the strain belonged to the H30 serovar. Thus, the antigenic formula of strain EAgEC 18-726 was expressed as ONT:H30. The *E. coli* 18-726 strain contained a significant spectrum of genes that enable properties of virulence (*iss*, *capU*, *aggA*, *aggB*, *aggC*, *aggD*, *aap*, *aar*) and resistance to antibiotics (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1B}, *aadA1*, *aadA5*, *mph(A)*, *catB3*). A new method for identifying EAgEC in chronic bowel disease is based on the polymerase chain reaction method using primers for a specific region of bacterial glutamate decarboxylase (*gad*) gene. **Conclusion.** 1) The biochemical, antigenic and molecular genetic properties of *E. coli* ONT:H30 18-726 strain (No. B-8857) isolated from a patient with histomorphologically diagnosed ulcerative colitis were analyzed. 2) A method for PCR identification of EAgEC strains based on the detection of a specific region within the bacterial genomic glutamate decarboxylase gene has been created and patented.

Key words: *Escherichia coli*, EAgEC, ulcerative colitis, PCR, virulence, antibiotic resistance.

Введение

В настоящее время в связи с внедрением и использованием молекулярно-генетических методов в лабораторную практику доступным становится изучение микробиома человека не только при инфекционной патологии, но и при различных полиэтиологических нозологиях. Роль микробного фактора является дискуссионным вопросом в отношении воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) человека. Гипотеза, которая находится в процессе экспериментального подтверждения, заключается в выявлении специфического инфекционного агента, вызывающего заболевания, который не был обнаружен до настоящего времени. Также обсуждается вопрос о возник-

новении дисбаланса между индигенной микробиотой и слизистой оболочкой толстой кишки, который приводит к трансформации некоторых представителей нормобиоты, в частности *E. coli* [15]. Высокая пластичность генома *E. coli* способствует неконтролируемому формированию уникальных патогенных штаммов из комменсальных. Установлено, что распространенность штаммов-носителей генетических маркеров известных детерминант персистенции и патогенности в кишечной микробиоте здоровых лиц без признаков острого или хронического заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) не превышает 10%. При снижении концентрации и активности индигенной микробиоты в популяции *E. coli* могут произойти изменения, способствующие увеличению

клонов потенциальных патогенов. Опасность таких микробиологических нарушений становится очевидной, если принять во внимание чрезвычайно широкий спектр факторов вирулентности *E. coli*: эндо- и экзотоксины, цитотоксины, колицины, адгезины, инвазины, а также антилизоцимная, антикомплементарная и гемолизирующая активность, способность подавлять фагоцитоз, гистоповреждающие ферменты и метаболиты, резистентность к антимикробным препаратам (АМП), способность к L-трансформации и др. [3, 14]. В последние годы обсуждается роль адгезивно-инвазивных *E. coli* (АИЕС) в инициацию аутоиммунного процесса при болезни Крона (БК) [26]. Известно, что АИЕС могут проникать и размножаться в макрофагах, вызывая высвобождение большого количества фактора некроза опухоли (TNF α), который вызывает воспаление кишечника, характерное для БК [23, 27]. При изучении причин возникновения язвенного колита (ЯК), который характеризуется поражением дистальных отделов толстой кишки, в последние годы также высказываются предположения о роли *E. coli* как возможного патобионта-инициатора заболевания [23, 27]. При среднетяжелом и тяжелом течении ЯК современные стандарты лечения регламентируют применение АМП [6, 11, 23].

Цель исследования: изучить биологические свойства штамма *E. coli* ONT:H30 18-726 (№ В-8857) и разработать новый способ детекции энтероагрегативных штаммов *E. coli* из биопсийного материала пациентов с гистоморфологическим диагнозом «язвенный колит».

Материалы и методы

Исследование было проведено на базе эндоскопического отделения Клиник Самарского государственного медицинского университета (г. Самара). Биопсийный материал в соответствии с критериями включения и исключения из исследования был получен в ходе стандартной эндоскопической процедуры при проведении колоноскопии 46 пациентам с гистоморфологически установленным диагнозом «язвенный колит» [4, 10]. Идентификацию штаммов *E. coli* проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS) с использованием системы Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия) [1]. Чувствительность к 18 антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом с использованием агара Мюллера–Хинтон (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) и дисков (Oxoid, Великобритания). Интерпретацию результатов проводили согласно Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микро-

организмов к антимикробным препаратам» 2018 г. [7]. Чувствительность к 5 препаратам бактериофагов: «Бактериофаг колипротейный», «Пиобактериофаг поливалентный очищенный», «Секстафаг», «Пиобактериофаг поливалентный», «Пиобактериофаг комплексный», «Интести» (АО «НПО Микроген», Россия) проводили согласно действующим клиническим рекомендациям [9]. Для интерпретации результатов использовали показатели: R – устойчив (0/+), I – промежуточная чувствительность (+/+), S – чувствителен (+++/++++).

Принадлежность штаммов к диареогенным *E. coli* (DEC) проводили молекулярным методом с использованием набора реагентов «АмплиСенс® Эшерихиозы – FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) в режиме «реального времени» (амплификатор «СХТ-1000», Bio-Rad, США). Подготовку библиотеки генома EAgEC проводили с помощью набора TrueSeq (Illumina Inc., США), секвенирование выполняли на платформе MiSeq (Illumina). Аннотацию генома проводили с помощью утилиты Prokka v. 1.11 и геномного сервера FAST. Для анализа последовательностей ДНК полных геномов штаммов *E. coli* использовали веб-сайт Центра геномной эпидемиологии (<https://cge.cbs.dtu.dk/services>). Поиск генетических детерминант патогенности, вирулентности, антибиотикорезистентности и установление антигенной характеристики штамма (О- и Н-антигенов) проводили с использованием онлайн сервисов: PathogenFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PathogenFinder>); VirulenceFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder>); ResFinder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder>); SerotypeFinder 1.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder>).

Разработка детекции штаммов EAgEC, колонизирующих дно язвенной поверхности слизистой оболочки толстой кишки при ЯК, базировалась на ПЦР-методике и заключалась в выявлении уникального сочетания SNP-полиморфизмов гена глутаматдекарбоксилазы (*gad*) *E. coli* ONT:H30 18-726.

Результаты

Скрининг принадлежности штаммов к DEC, проведенный молекулярным методом, выявил наличие специфичных EAgEC участков ДНК в штамме *E. coli* 18-726. По культурально-ферментативным свойствам штамм EAgEC 18-726 характеризовался типичными видовыми признаками *E. coli*: давал положительную реакцию с метиловым красным и отрицательную Фогеса–Проскауэра, не расщеплял мочевины, не образовывал сероводород и фенилаланиндезаминазу, не ферментировал инозит и адонит, не рос на цитратном агаре Симмонса, был индол-поло-

жительным, ферментировал маннит и глюкозу до кислоты и газа, обладал β-галактозидазной активностью. По ферментативным свойствам штамм проявлял вариабельность в отношении углеводов, спиртов и аминокислот (табл. 1).

Результаты изучения чувствительности к АМП EAgEC 18-726 показали, что штамм в соответствии с международными критериями характеризовался фенотипом множественной резистентности (MDR) — резистентность к трем и более классам АМП. Резистентность была отмечена к β-лактамам (аминопенициллины, ингибитор-защищенные аминопенициллины, цефалоспорины III–IV поколения), хинолонам/фторхинолонам, аминогликозидам, тетрациклину, сульфаниламидам и триметоприму. Штамм сохранял чувствительность к карбапенемам (меропенем), хлорамфениколу и нитрофурантоину. Методом «двойных дисков» с цефтазидимом, цефотаксимом, цефепимом и амоксициллин/клавуланатом установлено, что штамм являлся продуцентом бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС).

Изучение спектра литического действия бактериофагов и их активности в отношении штамма EAgEC 18-726 выявило его фагорезистентность ко всем тестируемым препаратам (табл. 2).

Анализ генома EAgEC 18-726 с помощью платформы SerotypeFinder 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder>), онлайн-ресурса «Center for Genomic Epidemiology», показал, что штамм имел уникальную последовательность

гена, кодирующего O-антиген, которая отличалась от 188 известных O-антигенов (ONT). По идентичности нуклеотидной последовательности гена, кодирующего синтез H-антигена, штамм принадлежал к серовару H30. Таким образом, антигенная формула штамма EAgEC 18-726 выражалась как ONT:H30.

В табл. 3 представлены гены вирулентности штамма EAgEC ONT:H30 18-726. Результаты анализа на платформе VirulenceFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder>) показали наличие генов вирулентности с идентичностью 100–99,9% референтным образцам: ген *aap* (антиагрегационный белок, дисперзин), ген *aar* (белок-регулятор транскрипционного активатора класса AraC/XylS), ген *aggA* (большая субъединица адгезивно-агрегационных фимбрий I типа), ген *iss* (белок устойчивости к бактерицидному действию сыворотки крови), ген *capU* (гомолог гексозилтрансферазы); с идентичностью 99,7–99,56% референтным образцам: ген *aggC* (периплазматический шаперон, сборщик начального этапа адгезивно-агрегационных фимбрий I типа) и ген *aggD* (шаперон, сборщик адгезивно-агрегационных фимбрий I типа); с идентичностью 98,95% — ген *gad* (глутамат декарбоксилаза) и идентичностью 98,17% — ген *aggB* (белок афимбриальной адгезивной оболочки энтеробактерий AfaD).

Анализ сборки геномных данных с использованием интернет-сервиса ResFinder 4.1 выявил совокупность генетических механизмов реализации устойчивости к антибиотикам, которые описаны в табл. 4.

Таблица 1. Основные ферментативные свойства штамма EAgEC 18-726, выделенного от пациента с язвенным колитом

Table 1. Main enzymatic properties of strain EAgEC 18-726 isolated from a patient with ulcerative colitis

Тест или субстрат Assay or substrate	Штамм EAgEC 18-726 EAgEC 18-726 strain	Тест или субстрат Assay or substrate	Штамм EAgEC 18-726 EAgEC 18-726 strain
Лактоза Lactose	+	Дульцит Dulcitate	+
Сахароза Sucrose	-	Сорбит Sorbitol	-
Арабиноза Arabinose	-	Салицин Salicin	-
Мальтоза Maltose	-	Орнитин Ornithine	+
Ксилоза Xylose	-	Лизин Lysine	+
Рамноза Ramnose	+	Аргинин Arginine	-

Примечание. «+» — положительная реакция; «-» — отрицательная реакция.

Note. “+” — positive reaction; “-” — negative reaction.

Таблица 2. Чувствительность штамма EAgEC 18-726 к препаратам бактериофагов

Table 2. Sensitivity of strain EAgEC 18-726 to bacteriophage preparations

Бактериофаг Bacteriophage	Наличие лизиса Lysis	Результат Result
Колипротейный Coli- <i>Proteus</i>	-	R
Пиополивалентный очищенный Pyopolyvalent purified	1+	R
Секстафаг Sextaphage	-	R
Комплексный Complex	-	R
Интести Intesti	-	R

Примечание. «-» — отсутствие литической активности; «1+» — низкая литическая активность; R — нечувствителен к бактериофагу.

Note. “-” — lack of lytic activity; “1+” — low lytic activity; R — bacteriophage insensitivity.

Штамм *E. coli* ONT:H30 18-726 был депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» ФБУН ГНЦ ПМБ с присвоением регистрационного номера В-8857 и выдачей свидетельства о депонировании от 25.11.2019 г. № 193.

Представленность широкого спектра генов, кодирующих факторы вирулентности, наличие значительного количества мобильных генетических элементов, а также множественная резистентность к АМП и фагоустойчивость *E. coli* ONT:H30 18-726 обосновали необходимость в создании способа выявления аналогичных штаммов в биологическом материале пациентов с ЯК. Метод основан на выявлении уникального сочетания SNP-полиморфизмов гена глутаматдекарбоксилазы (*gad*), расположенных в диапазоне NZ_GL896790.1:2763405–2763726 штамма *E. coli* ONT:H30 18-726 с использованием четырех специфических праймеров. Нуклеотидные последовательности праймеров представлены

в табл. 5. Проведение ПЦР возможно как в режиме «реального времени», так и с последующей электрофоретической детекцией.

Состав реакционной смеси: очищенная вода, пара праймеров — 0,4 мкМ каждого, 1х буфер для амплификации, концентрация Mg^{2+} — 2,5 мМ, 1х SybrGreen для детекции в «режиме реального времени», 1х раствор полимеразы без экзонуклеазной активности, матрица ДНК — 5 мкл на 20 мкл реакционной среды, режим амплификации приведен в табл. 6.

При детекции в режиме «реального времени» о наличии EAgEC свидетельствует повышение интенсивности флуоресценции по каналу FAM в обеих реакционных смесях одновременно, при этом пороговое значение цикла (Ct) — 35. При гель-электрофоретической детекции о наличии энтероагрегативного штамма *E. coli* можно судить по наличию продуктов амплификации специфических длин в обеих реакционных смесях одновремен-

Таблица 3. Характеристика генов вирулентности штамма *E. coli* ONT: H30 18-726, кодирующих механизмы реализации факторов патогенности

Table 3. Characteristics of the virulence genes of *E. coli* ONT: H30 18-726 strain encoding mechanisms to enable pathogenicity factors

Ген Gene	Идентичность, % Identity, %	Референт/образец, п.н. Reference/sample, bp	Функция белка Protein function	Референс-номер Reference No.
<i>aap</i>	100	351/351	Антиагрегационный белок, дисперзин Anti-aggregation protein, dispersin	Z32523
<i>aar</i>	100	201/201	Белок-регулятор транскрипционного активатора класса AraC/XylS AraC/XylS class regulator protein of the transcriptional activator	SSI_AA794
<i>aggA</i>	100	516/516	Большая субъединица адгезивно-агрегационных фимбрий I типа type I adhesive-aggregation fimbriae large subunit	SSI_AA804
<i>aggB</i>	98,17	438/438	Белок афимбриально-адгезивной оболочки энтеробактерий AfaD Enterobacterial afimbrial-adhesive membrane AfaD protein	U12894
<i>aggC</i>	99,7	2311/2385	Периплазматический шаперон, сборщик начального этапа адгезионно-агрегационных фимбрий I типа Periplasmic chaperone, assembler of the initial stage for adhesion-aggregation type I fimbriae	AFRH01000026
<i>aggD</i>	99,56	687/759	Шаперон, сборщик адгезионно-агрегационных фимбрий I типа Chaperone, adhesion-aggregation type I fimbriae collector	U12894
<i>capU</i>	99,9	1016/1089	Гомолог гексозилтрансферазы Hexosyltransferase homologue	CU928145
<i>gad</i>	98,95	1243/1401	Глутаматдекарбоксилаза Glutamate decarboxylase	FN554766
<i>iss</i>	100	294/294	Устойчивость к бактерицидному действию сыворотки крови Resistance to blood serum bactericidal effect	CP001846

Таблица 4. Характеристика генов штамма *E. coli* ONT: H30 18-726, кодирующих механизмы устойчивости к антибактериальным препаратамTable 4. Characteristics of the *E. coli* ONT: H30 18-726 strain genes encoding mechanisms of antibacterial drug resistance

Гены резистентности Resistance genes	Идентичность, % Identity, %	Референт/образец, п.н. Reference/sample, bp	Контиг Contig	Референс-номер Reference No.
Бета-лактамы Beta-lactams				
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	100	876/876	NODE_386_length_4574_cov_78.801483	AY04443 6
<i>bla</i> _{TEM-1B}	100	861/861	NODE_474_length_3323_cov_77.119469	AY45
Аминогликозиды Aminoglycosides				
<i>AAC (3)-IIa</i>	99,77	861/861	NODE_90_length_2624_cov_87.983994	X51534
<i>AAC (6')-Ib-кp</i>	100	600/600	NODE_793_length_723_cov_95.589211	DQ30391 8
<i>aadA1</i>	100	789/789	NODE_120_length_24792_cov_89.782104	JQ48015 6
<i>aadA5</i>	100	789/789	NODE_380_length_1006_cov_86.854874	AF13736 1
<i>APH (3'')-Ib</i>	100	803/804	NODE_215_length_4521_cov_79.155052	AF02460 2
<i>APH (3'')-Ib</i>	99,88	804/804	NODE_215_length_4521_cov_79.155052	AF31347 2
<i>APH (3'')-Ib</i>	99,88	804/804	NODE_215_length_4521_cov_79.155052	AF32155 0
<i>APH (3'')-Ib</i>	99,88	804/804	NODE_215_length_4521_cov_79.155052	AF32155 1
<i>APH (6)-Id</i>	100	837/837	NODE_215_length_4521_cov_79.155052	M28829
<i>aadA1</i>	100	789/789	NODE_120_length_24792_cov_89.782104	JQ48015 6
Макролиды Macrolides				
<i>mdf (A)</i>	98.13	1233/1233	NODE_176_length_28514_cov_76.946098	Y08743
<i>mph (A)</i>	100	906/906	NODE_203_length_7502_cov_81.290855	D16251
Хлорамфеникол Chloramphenicol				
<i>catB3</i>	100	442/633	NODE_741_length_781_cov_64.875801	AJ00981 8
<i>catB3</i>	100	442/633	NODE_741_length_781_cov_64.875801	U13880
Хинолоны/Фторхинолоны Quinolones/Fluorquinolones				
<i>gyrA p. S83A*</i>	100	600/600	NODE_793_length_723_cov_95.589211	DQ303918
Сульфаниламиды Sulfonamides				
<i>sul1</i>	100	840/840	NODE_203_length_7502_cov_81.290855	U12338
<i>sul2</i>	100	816/816	NODE_515_length_4637_cov_74.394867	AY03413 8
Тетрациклины Tetracyclines				
<i>tet (D)</i>	100	1185/1185	NODE_474_length_3323_cov_77.119469	AF46707 7
Триметроприм Trimetroprim				
<i>dfrA1</i>	100	474/474	NODE_120_length_24792_cov_89.782104	X00926
<i>dfrA17</i>	100	354/474	NODE_309_length_1052_cov_83.835548	AM9372 44
<i>dfrA17</i>	100	354/474	NODE_309_length_1052_cov_83.835548	FJ460238

Примечание. * — мутации в генах.

Note. * — genes mutation.

Таблица 5. Нуклеотидные последовательности праймеров для детекции SNP-полиморфизмов гена *gad*Table 5. Nucleotide primer sequences for detecting SNP polymorphisms in the bacterial *gad* gene

Праймеры первой реакционной смеси First reaction mix primers	Праймеры второй реакционной смеси Second reaction mix primers
F1: CGTCAGAACCTGGCCACTTTT	F2: TCGACCTGCGTTGCGTAAAC
R1: TATCCGTTGGTTTGCCTGCA	R2: CATCCCAGTAGCGGGCG
Размер ПЦР-продукта: 292 п.н. PCR product size: 292 bp	Размер ПЦР-продукта: 240 п.н. PCR product size: 240 bp

Примечание. Реакции с обеими парами праймеров проводятся отдельно друг от друга.

Note. PCR with both pairs of primers is carried out separately.

но: для первой реакции — 292 п.н., для второй — 240 п.н. [8]. Получен патент на изобретение «Способ выявления энтероагрегативных штаммов *E. coli* из толстой кишки у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника» (№ 2758475 RU от 28.10.2021) [8].

Обсуждение

Воспалительные заболевания кишечника, к которым относится ЯК, являются одной из наиболее серьезных проблем гастроэнтерологии во всех странах. По тяжести течения, частоте осложнений и летальности они занимают ведущее место в структуре болезней [11, 18]. Несмотря на многолетнюю историю изучения, этиология ЯК остается неизвестной, а патогенез недостаточно раскрытым [11].

Патогенные *E. coli* характеризуются широким спектром факторов вирулентности, включая адгезины, токсины, сидерофоры, капсулы и инвазины и др. Такие штаммы могут вызвать патологический процесс практически каждого органа или системы. Не исключена роль *E. coli* при хронических заболеваниях ЖКТ, в инициации и поддержании патологического воспалительного процесса, а также язвенно-некротических реакций [16]. Генетическое разнообразие *E. coli*, наличие специфических генов вирулентности позволяют предположить этиологическую значимость этих микроорганизмов в развитии ЯК [5, 28]. Штаммы EAgEC — одной из шести патогрупп DEC — вызывают острые кишечные инфекции у детей и взрослых во всех странах. Метааналитические эпидемиологические исследования выявили статистически значимую связь EAgEC с диареями: острыми, продолжительными, хроническими, диареями ВИЧ-инфицированных и путешественников [17]. Длительная персистенция EAgEC может вызывать хроническое воспаление кишечника, снижая его абсорбционную функцию, приводя к алиментарной дистрофии, анемии, гипопротейнемии, нарушениям физического и когнитивного состояния [20]. EAgEC, в отличие от других патогенных *E. coli*, характеризует широкая вариабельность генетических маркеров вирулентности [16, 24]. Это указывает на то, что вызывать воспалительный процесс способны только штаммы EAgEC, несущие специфические гены вирулентности. В то же время ни один из факторов вирулентности не был неопровержимо связан с вирулентностью EAgEC, а гены, кодирующие их, не присутствуют равномерно во всех изолированных штаммах. Эксперименты *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* убедительно показали, что EAgEC могут адгезироваться на эпителиоциты тонкой, подвздошной и толстой кишки, образуя

Таблица 6. Режимы амплификации для детекции SNP-полиморфизмов гена *gad*

Table 6. Amplification modes for detection of *gad* gene SNP polymorphisms

№ цикла Cycle No.	Температура, °C Temperature, °C	Время Time	Количество циклов Number of cycles
1	95	5 мин 5 min	1
2	95	30 с 30 s	40
3	65	65 с 65 s	
4	72	20 с 20 s	
5	72	5 мин 5 min	1

прочную биопленку с последующим цитотоксическим и провоспалительным действием. Патогенез заболевания включает три этапа: а) обильное прилипание к слизистой оболочке кишечника — адгезия и колонизация; б) продукция цитотоксинов и энтеротоксинов; в) индукция воспаления слизистой оболочки. Воспаление, вызванное EAgEC, является результатом обильной колонизации слизистой оболочки кишечника [12, 19].

Проведенный анализ полногеномного секвенирования показал, что у штамма *E. coli* ONT:H30 18-726 (№ В-8857) присутствует несколько детерминант, ассоциированных с адгезией и колонизацией — *aggA*, *aggB*, *aggC* и *aggD*, кодирующих активатор транскрипции экспрессии хромосомных и плазмидо-кодируемых факторов вирулентности, включая антиагрегационный белок дисперзин (ген *aap*), который способствует проникновению бактерии через слизь крипт толстой кишки [25]. Данный метаболический путь может привести к генерализации инфекции — развитию сепсиса — за счет блокировки фибриногена, который участвует в механизме тромбоза — защитной реакции организма при сепсисе [2, 21]. Вирулентный адгезивный аппарат дополнительно представлен геном агрегативного регулона — *aar*, который обеспечивает активность более 40 генетических элементов, ответственных за взаимодействие с эпителиальными клетками кишечника человека [22]. У изученного штамма был идентифицирован ген *iss*, обеспечивающий устойчивость к бактерицидному действию сыворотки крови, наличие которого можно расценивать как потенциал гематогенной генерализации инфекции или существенного ухудшения течения основного заболевания, в настоящем случае — ЯК.

К одним из основных препаратов для лечения ЯК и поддержания ремиссии относятся АМП, поэтому проблема антибиотикорезистентности представляется особо актуальной. Проведенное исследование показало, что штамм *E. coli* ONT:H30 18-726 (№ В-8857) характеризовался множественной устойчивостью к АМП разных групп. Резистентность к цефалоспорином III–IV поколения обусловлена продукцией эпидемически значимой глобально распространенной в популяции грамотрицательных бактерий цефалоспоринызы СТХ-M15. Низкая литическая активность и полная фагоустойчивость к биологическим препаратам — бактериофагам — в отношении изученного штамма предполагает невозможность применения отечественных препаратов к элиминации данного патогена при эмпирической терапии ЯК. Фагоустойчивость к биологическим агентам отмечается в литературе и характеризуется развитием резистентности к препаратам данного типа, а также необходимостью регулярного обновления фармакологического набора фаготерапевтических препаратов [13].

Таким образом, данные, полученные по результатам полногеномного секвенирования штамма EAgEC, выделенного от пациента с гистологически подтвержденным диагнозом «язвенный колит», свидетельствуют, что традиционные культуральные методы изучения

штаммов *E. coli*, колонизирующих кишечник пациентов с ЯК, включая определение чувствительности к АМП, подходят только для фенотипической характеристики выделенного изолята. В виду этого одним из перспективных направлений в детекции EAgEC у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, а также в изучении механизмов резистентности к АМП, становится применение современных генетических методик. Использование дополнительных методов позволит получить информацию, необходимую клиницисту для принятия решения о назначении адекватной этиотропной терапии пациентов с ЯК. Для получения достоверных данных об этиологии ЯК и роли EAgEC в патогенезе воспаления толстого кишечника требуется проведение дальнейших исследований. Особенно это становится актуальным в связи с широким распространением среди больных ЯК грамотрицательных бактерий с фенотипом множественной резистентности к АМП, продуцирующих БЛРС.

Благодарности

Особая благодарность выражается Никите Андреевичу Буланцеву — выпускнику магистратуры SCAMT ИТМО (Санкт-Петербург) за помощь в обработке массивов сиквенс-данных.

Список литературы/References

1. Баранцевич Е.П., Баранцевич Н.Е. Применение MALDI-ToF масс-спектрометрии в клинической микробиологии // Трансляционная медицина. 2014. № 3. С. 23–28. [Barantsevich E.P., Barantsevich N.E. MALDI-ToF mass spectrometry in clinical microbiology. *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine*, 2014, no. 3, pp. 23–28. (In Russ.)] doi: 10.18705/2311-4495-2014-0-3-23-28
2. Галстян Г.М., Гапонова Т.В., Жибурт Е.Б., Балашова Е.Н., Берковский А.Л., Быстрых О.А., Купряшов А.А., Оловникова Н.И., Ошоров А.В., Рыбка М.М., Троицкая В.В., Буланов А.Ю., Журавель С.В., Лубнин А.Ю., Мазурок В.А., Недомолкин С.В., Певцов Д.Э., Рогачевский О.В., Салимов Э.Л., Трахтман П.Е., Чжао А.В., Шерстнев Ф.С., Савченко В.Г. Клиническое использование криопреципитата // Гематология и трансфузиология. 2020. Т. 65, № 1. С. 87–114. [Galstyan G.M., Gaponova T.V., Zhiburt E.B., Balashova E.N., Berkovskiy A.L., Bystrykh O.A., Kupryashov A.A., Olovnikova N.I., Oshorov A.V., Rybka M.M., Troitskaya V.V., Bulanov A.Yu., Zhuravel S.V., Lubnin A.Yu., Mazurok V.A., Nedomolkin S.V., Pevtsov D.E., Rogachevskiy O.V., Salimov E.L., Trakhtman P.E., Chzhao A.V., Sherstnev F.S., Savchenko V.G. Clinical guidelines for cryoprecipitate transfusions. *Gematologiya i transfuziologiya = Russian Journal of Hematology and Transfusiology*, 2020, vol. 65, no. 1, pp. 87–114. (In Russ.)] doi: 10.35754/0234-5730-2020-65-1-87-114
3. Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Липская Л.В., Коноваленко И.Б., Пясетская М.Ф., Курчикова Т.С., Ведерникова Н.Б., Морозова О.Т., Смирнова М.В., Попенко Л.Н., Любушкина М.И., Савочкина Ю.А., Макарова М.А., Сужаева Л.В., Останкова Ю.В., Иванова М.Н., Павелкович А.М., Наабер П., Сепп Э., Кыльялг С., Мицюлявичене И., Балод А. Штаммы энтеробактерий, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра и металло-β-лактамазу ndm-1, выделенные в стационарах в странах Балтийского региона // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 1. С. 29–36. [Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Lipskaya L.V., Konvalenko I.B., Pyasetskaya M.F., Kurchikova T.S., Vedernikova N.B., Morozova O.T., Smirnova M.V., Popenko L.N., Lyubushkina M.I., Savochkina Yu.A., Makarova M.A., Suzhaeva L.V., Ostankova Yu.V., Ivanova M.N., Pavelkovich A.M., Naaber P., Sepp E., Kyl'yalg S., Mitsyulyavichene I., Balode A. Enterobacteriaceae, producing ESBLs and metallo-β-lactamase NDM-1, isolated in hospitals of Baltic region countries. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 1, pp. 29–36 (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2013-1-29-36
4. Каторкин С.Е., Жестков А.В., Суворова Г.Н., Мякишева Ю.В., Лямин А.В., Андреев П.С., Давыдова О.Е., Круглов Е.Е. Комплексная характеристика клинических, патоморфологических, микробиологических особенностей язвенного колита // Военно-медицинский журнал. 2019. Т. 340, № 10. С. 68–71. [Katorkin S.E., Zhestkov A.V., Suvorova G.N., Myakisheva Yu.V., Lyamin A.V., Andreev P.S., Davydova O.E., Kruglov E.E. Complex characteristics of clinical, pathological and microbiological features of ulcerative colitis. *Voenno-meditsinskiy zhurnal = Military Medical Journal*, 2019, vol. 340, no. 10, pp. 68–71. (In Russ.)]

5. Макарова М.А., Круглов Е.Е., Матвеева З.Н., Зверьякина Н.Н., Кафтырева Л.А. Характеристика штаммов *Escherichia coli*, выделенных при остром аппендиците и хроническом язвенном колите // Проблемы медицинской микологии. 2020. Т. 22, № 4. С. 66–71. [Makarova M.A., Kruglov E.E., Matveeva Z.N., Zver'yakina N.N., Kaftyreva L.A. Characteristics of *Escherichia coli* strains isolated in acute appendicitis and ulcerative colitis. *Problemy meditsinskoi mikologii = Problems in Medical Mycology*, 2020, vol. 22, no. 4, pp. 66–71. (In Russ.)] doi: 10.24412/1999-6780-2020-4-66-71
6. Об утверждении стандарта медицинской помощи больным с язвенным колитом (при оказании специализированной помощи): Приказ Минздравсоцразвития России от 8.06.2007 № 406. [On approval of the standard of medical care for patients with ulcerative colitis (in the provision of specialized care): Order of the Ministry of Health and Social Development of Russia dated June 8, 2007 No. 406. (In Russ.)] URL: <https://docs.cntd.ru/document/902048232> (31.05.2022)
7. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: рекомендации Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. Версия 2021-01. 222 с. [Assessment of microorganisms sensitivity to antimicrobial agents: Guidelines of the Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. Version 2021-01. 222 p. (In Russ.)] URL: <https://www.antibiotic.ru/minzdrav/category/clinical-recommendations> (31.05.2022)
8. Патент № 2758475 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68 (2006.01). Способ выявления энтероагрегативных штаммов *Escherichia coli* из толстой кишки у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника: № 2020140059; заявлено 2020.12.04; опубликовано 2021.10.28 / Круглов Е.Е., Мякишева Ю.В., Викторов Д.А., Соловьев А.В., Лямин А.В., Жестков А.В., Макарова М.А., Кафтырева Л.А. Патентообладатель: Круглов Е.Е. 8 с. [Patent No. 2758475 Russian Federation, Int. Cl. C12Q 1/68 (2006.01). Method for detecting enteroaggregative *Escherichia coli* strains from the colon in patients with inflammatory bowel diseases. No. 2020140059; application: 2020.12.04; date of publication 2020.12.04 / Kruglov E.E., Myakisheva Yu.V., Viktorov D.A., Solov'ev A.V., Lyamin A.V., Zhestkov A.V., Makarova M.A., Kaftyreva L.A. Proprietor: Kruglov E.E. 8 p.]
9. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике. Федеральные клинические рекомендации. М.: 2014. 39 с. [Rational use of bacteriophages in medical and anti-epidemic practice. Federal clinical guidelines. Moscow, 2014. 39 p. (In Russ.)]
10. Суворова Г.Н., Мякишева Ю.В., Каторкин С.Е., Андреев П.С., Давыдова О.Е., Лямин А.В., Круглов Е.Е., Сухачев П.А. Гистологическая картина и микробный пейзаж при язвенном колите // Вестник новых медицинских технологий. 2018. Т. 25, № 4. С. 170–175. [Suvorova G.N., Myakisheva Yu.V., Katorkin S.E., Andreev P.S., Davydova O.E., Lyamin A.V., Kruglov E.E., Sukhachev P.A. Histology and microbic landscape with ulcerative colitis. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*, 2018, vol. 25, no. 4, pp. 170–175. (In Russ.)] doi: 10.24411/1609-2163
11. Язвенный колит: Клинические рекомендации. 2020. ID 193. 69 с. [Clinical guidelines «Ulcerative colitis». 2020. ID 193. 69 p. (In Russ.)] URL: https://cr.minzdravc.gov.ru/recommend/193_1 (31.05.2022)
12. Biran D., Sura T., Otto A., Yair Y., Becher D., Ron E. Surviving serum — the *E. coli* iss gene (increased serum survival) of extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) is required for the synthesis of group 4 capsule. *Infect. Immun.*, 2021, vol. 89, no. 10: e00316-21. doi: 10.1128/IAI.00316-21
13. Bolocan A.S., Callanan J., Forde A., Ross P., Hill C. Phage therapy targeting *Escherichia coli*—a story with no end? *FEMS Microbiol. Lett.*, 2016, vol. 363, no. 22: fnw256. doi: 10.1093/femsle/fnw256
14. Butler D.A., Rana A.P., Krapp F., Patel S.R., Huang Y., Ozer E.A., Hauser A.R., Bulman Z.P. Optimizing aminoglycoside selection for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* with the aminoglycoside-modifying enzyme (AME) gene *aac(6)*'-Ib. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2021, vol. 76, no. 3, pp. 671–679. doi: 10.1093/jac/dkaa480
15. Costa R.F.A., Ferrari M.L.A., Bringer M.A., Darfeuille-Michaud A., Martins F.S., Barnich N. Characterization of mucosa-associated *Escherichia coli* strains isolated from Crohn's disease patients in Brazil. *BMC Microbiol.* 2020, vol. 20, no. 1: 178. doi: 10.1186/s12866-020-01856-x
16. Desvaux M., Dalmaso G., Beyrouthy R., Barnich N., Delmas J., Bonnet R. Pathogenicity factors of genomic islands in intestinal and extraintestinal *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.*, 2020, vol. 25, no. 11: 2065. doi: 10.3389/fmicb.2020.02065
17. Huang D.B., Nataro J.P., DuPont H.L., Kamat P.P., Mhatre A.D., Okhuysen P.C., Chiang T. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.*, 2006, vol. 43, no. 5, pp. 556–563. doi: 10.1086/505869
18. Iablokov S.N., Klimenko N.S., Efimova D.A., Shashkova T., Novichkov P.S., Rodionov D.A., Tyakht A.V. Metabolic phenotypes as potential biomarkers for linking gut microbiome with inflammatory bowel diseases. *Front. Mol. Biosci.*, 2021, no. 7: 603740. doi: 10.3389/fmolb.2020.603740
19. Jenkins C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2018, vol. 416, pp. 27–50. doi: 10.1007/82_2018_105
20. Jensen B.H., Olsen K.E., Struve C., Krogfelt K.A., Petersen A.M. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2014, vol. 27, no. 3, pp. 614–630. doi: 10.1128/CMR.00112-13
21. Moraes C., Longo J., Silva L.B., Pimenta D.C., Carvalho E., Morone M.S., da Rós N., Serrano S.M.T., Santos A.C.M., Piazza R.M.F., Barbosa A.S., Elias W.P. Surface protein dispersin of enteroaggregative *Escherichia coli* binds plasminogen that is converted into active plasmin. *Front. Microbiol.*, 2020, no. 11: 1222. doi: 10.3389/fmicb.2020.01222
22. Morin N., Santiago A., Ernst R., Guillot S., Nataro J. Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *E. coli*. *Infect. Immun.*, 2012, vol. 81, no. 10, pp. 122–132. doi: 10.1128/IAI.00676-12
23. Mousavifar L., Roy R. Recent development in the design of small “drug-like” and nanoscale glycomimetics against *Escherichia coli* infections. *Drug Discov. Today*, 2021, vol. 26, no. 9, pp. 2124–2137. doi: 10.1016/j.drudis.2021.02.025
24. Nuesch-Inderbinen M.T., Hofer E., Hächler H., Beutin L., Stephan R. Characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from healthy carriers and from patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.*, 2013, vol. 62, no. 12, pp. 1828–1834. doi: 10.1099/jmm.0.065177-0
25. Prieto A., Bernabeu M., Sánchez-Herrero J.F., Pérez-Bosque A., Miró L., Bäuerl C., Collado C., Hüttener M., Juárez A. Modulation of AggR levels reveals features of virulence regulation in enteroaggregative *E. coli*. *Commun. Biol.*, 2021, vol. 4, no. 1: 1295. doi: 10.1038/s42003-021-02820-9

26. Shaler C.R., Elhenawy W., Coombes B.K. The unique lifestyle of Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli. *J. Mol. Biol.*, 2019, vol. 431, no. 16, pp. 2970–2981. doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.023
27. Tyakht A.V., Kostyukova E.S., Popenko A.S., Belenikin M.S., Pavlenko A.V., Larin A.K., Karpova I.Y., Selezneva O.V., Semashko T.A., Ospanova E.A., Babenko V.V., Maev I.V., Cheremushkin S.V., Kucheryavyy Y.A., Shcherbakov P.L., Grinevich V.B., Efimov O.I., Sas E.I., Abdulkhakov R.A., Abdulkhakov S.R., Lyalyukova E.A., Livzan M.A., Vlassov V.V., Sagdeev R.Z., Tsukanov V.V., Osipenko M.F., Kozlova I.V., Tkachev A.V., Sergienko V.I., Alexeev D.G., Govorun V.M. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat. Commun.*, 2013, no. 4: 2469. doi: 10.1038/ncomms3469
28. Zhang S.L., Wang S.N., Miao C.Y. Influence of microbiota on intestinal immune system in ulcerative colitis and its intervention. *Front. Immunol.*, 2017, no. 8: 1674. doi: 10.3389/fimmu.2017.01674

Авторы:

Макарова М.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Круглов Е.Е., к.м.н., доцент кафедры клинической медицины ЧУ ОО ВО Медицинский университет «Реавиз», г. Самара, Россия; научный сотрудник научно-исследовательского испытательного отдела ФГБУ ГНИИИ военной медицины МО РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Кафтырева Л.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник группы эпидемиологии брюшного тифа ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Makarova M.A., DSc (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Medical Microbiology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Kruglov E.E., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Medicine, Reaviz Medical University, Samara, Russian Federation; Researcher, Research and Testing Department, State Research and Test Institute of Military Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Kaftyreva L.A., DSc (Medicine), Leading Researcher, Typhoid Epidemiology Research Group, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Department of Medical Microbiology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 28.12.2021
Отправлена на доработку 17.01.2022
Принята к печати 28.08.2023

Received 28.12.2021
Revision received 17.01.2022
Accepted 28.08.2023