

УДК 579.61; 616-093; 616.94

DOI: 10.14427/jipai.2019.3.33

Современные методы субтипирования сальмонелл при расследовании вспышек сальмонеллеза

С.А. Егорова¹, К.В. Кулешов^{2,3}, Л.А. Кафтырева^{1,4}¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия² ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия³ ФГБНУ "Федеральный научный центр - ВИЭВ им. К.И.Скрябина и Я.Р.Коваленко РАН", Москва, Россия⁴ ФГБОУ ВО "Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова" МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Modern Salmonella subtyping methods in outbreak investigations

S.A. Egorova¹, K.V. Kuleshov^{2,3}, L.A. Kaftyreva^{1,4}¹ Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia² Federal budget institute of science "Central research institute for epidemiology", Federal service for surveillance consumers' rights protection and human well-being, Moscow, Russia³ Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Center VIEV" (FSC VIEV), Moscow, Russia⁴ State Educational Institution of the Higher Professional Education "North-Western state medical University n.a. I.I. Mechnikov" of the Ministry of health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Аннотация

В обзоре представлены методы молекулярного субтипирования (серотипирование, MLST, PFGE, MLVA, WGS) изолятов *Salmonella spp.*, используемые в рамках эпидемиологического надзора и при расследовании случаев групповой заболеваемости сальмонеллезами. Отражена методическая основа и степень внедрения этих методов в работу лабораторий в мире. Особое внимание уделено методам субтипирования, основанным на данных полногеномного секвенирования, и существующим международным платформам для анализа данных "Pathogene Detection" и "Enterobase".

Ключевые слова

Salmonella, субтипирование, WGS, SNP, MLST.

Расследование вспышек сальмонеллез, направленное на выявление связанных случаев, источников и факторов передачи, разработку противоэпидемических и профилактических мероприятий, опирается на арсенал методов субвидового типирования возбудителя. Основная задача субтипирования заключается в выявлении фенотипических или генетических характеристик, на основании которых возможно оценить

Summary

The review describes the current methods of *Salmonella* molecular subtyping (molecular serotyping, MLST, PFGE, MLVA, WGS) that are used in the surveillance and outbreak investigation. Their methodological basis and the degree of implementation in laboratory practice around the world are presented, with focus on the subtyping approaches based on whole genome sequencing and existing international data analysis platforms "Pathogene Detection" and "Enterobase".

Keywords

Salmonella, subtyping, WGS, SNP, MLST.

сходство изолятов, выделенных из различных источников (человека, животных), а также продуктов питания и объектов окружающей среды. Это особенно важно, учитывая многоэтапность производства пищевых продуктов, отдельные ингредиенты которых могут поступать из различных стран и служить фактором передачи в несвязанных между собою вспышках. Ретроспективный анализ заболеваемости предполагает

мониторинг динамики субтипов возбудителя и установление связи заболеваний, возникших в разное время и на разных территориях. Применяемые для субтипирования методы должны обладать разрешающей способностью, достаточной для дифференциации штаммов, вовлеченных и не вовлеченных во вспышку.

Серотипирование штаммов *Salmonella*

Лабораторная диагностика сальмонеллезом основана на ферментативной и антигенной характеристике, которые позволяют отнести выделенный штамм к роду *Salmonella* виду *enterica* подвиду *enterica* и серологическому варианту. Традиционное серотипирование имеет ряд недостатков, включая трудоемкость, высокую стоимость сывороток, а также наличие инагглютинабельных и монофазных штаммов *Salmonella*. Разработаны методы молекулярного серотипирования, основанные на оценке генетических маркеров, характерных для определенных серотипов: как генов, отвечающих за продукцию конкретных О- и Н-антигенов, так и других серотип-специфических генетических детерминант. Детекцию генетических маркеров проводят в формате мультиплексных ПЦР или мультиплексной ДНК-гибридизации со специфическими олигонуклеотидными зондами с использованием технологий Luminex или ДНК-микрочипов [1-7]. Предложены коммерческие тест-системы, позволяющие идентифицировать до 85,0% часто встречающихся серотипов в течение 1-4 часов, например, «xMAP Salmonella Serotyping Assay» (Luminex) и «Check&Trace Salmonella» (Check-Points).

Современной альтернативой серотипированию является метод MLST (Multilocus Sequence Typing). Поскольку разрешающая способность метода ограничена низкой скоростью накопления нуклеотидных замен в генах «домашнего хозяйства», он мало информативен при расследовании вспышек [8]. Различные варианты нуклеотидной последовательности анализируемого гена (аллели) кодируются порядковыми номерами, сочетание аллелей всех исследуемых генов составляет MLST-профиль штамма. Штаммы, которые обладают идентичными аллелями всех генов, относят к одному сиквенс-типу (sequence type, ST); ST, отличающиеся по 1-2 аллелям, группируются в клональные комплексы. Преимуществом MLST является высокая воспроизводимость, общепринятая международная номенклатура, открытые базы данных, которые включают схемы для идентификации, анализа и визуализации геномных вариаций многих видов микроорганизмов. В 2012

и 2015 гг. проведены масштабные исследования методом MLST около 10 тыс. штаммов *Salmonella*, принадлежащих более чем к 500 серотипам: описано более 1000 различных ST и выявлено более 140 крупных генетических кластеров eBG (eBurstGroup) [9,10]. Для большинства серотипов отмечена выраженная корреляция (96,0%) с генетической группой eBG, присвоенной в ходе кластерного анализа. Кроме того, выявлены полифилетичные серотипы, штаммы которых, несмотря на одинаковую антигенную формулу, относятся к нескольким eBGs и произошли от разных «предшественников». Исследователи могут проводить MLST-типирование на открытых веб-ресурсах Enterobase (enterobase.warwick.ac.uk), PubMLST (pubmlst.org) и CGE (cge.cbs.dtu.dk), загружая результаты секвенирования штаммов.

Методы молекулярного серотипирования ускоряют исследование и позволяют преодолеть трудности традиционного серотипирования. В то же время в условиях глобальной циркуляции нескольких серотипов (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*) серотипирование малоинформативно для расследования случаев групповых заболеваний, вызванных изолятами распространенных серотипов.

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов геномной ДНК бактерии с разделением фрагментов рестрикции в пульсирующем поле (pulse field gel electrophoresis, PFGE)

Метод позволяет получить профиль рестрикции геномной ДНК бактерии (набор продуктов рестрикции, характеризующийся определенным количеством фрагментов различной длины, в среднем 10-30 фрагментов длиной от 10 до 800 kb) и дифференцировать штаммы *Salmonella*, относящиеся к одному серотипу. Профили получают с использованием ферментов рестрикции *XbaI*, *BlnI*. Благодаря высокой разрешающей способности, низкой себестоимости, хорошей воспроизводимости и наличию международного стандартизованного протокола (www.cdc.gov/pulsenet/participants/international), метод PFGE включен в арсенал валидированных методов молекулярной характеристики штаммов большинства серотипов *Salmonella* в надзоре за сальмонеллезами в США и странах Европы [11-13]. В то же время метод имеет ограниченные возможности для субтипирования серотипов с высоко консервативным геномом (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* DT104), генетически отдаленные

изоляты которых могут иметь идентичные PFGE-субтипы. Набор получаемых фрагментов нельзя объяснить какой-либо эволюционной математической моделью, поэтому метод подходит только для установления идентичности штаммов в рамках расследования вспышек и выявления генетических кластеров. Данные PFGE-субтипирования отражают генетическое разнообразие циркулирующих изолятов в пространстве и времени, но не их филогенетические отношения. В России метод PFGE используют в референс-центре по мониторингу за сальмонеллезами (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва): установлено превалирование на территории РФ в последние годы определенного PFGE-субтипа *S. Enteritidis* [14, 15].

Мультилокусное VNTR-типирование (multiple locus variable number tandem repeat analysis, MLVA)

Метод сравнивает изоляты по числу tandem-повторов в определенных локусах генома. Число повторов в исследуемом локусе определяют методом капиллярного электрофореза или путем секвенирования продуктов амплификации. MLVA-профили штаммов меняются достаточно быстро, что позволяет идентифицировать клоны и дифференцировать эпидемические штаммы при расследовании вспышек [8, 11, 13, 16, 17]. В странах Евросоюза и США метод MLVA широко используется при расследовании вспышек, в том числе международных, вызванных штаммами двух ведущих серотипов (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*), для субтипирования которых разработаны стандартизированные протоколы [18-25]. По сравнению с PFGE этот метод имеет большую разрешающую способность. В РФ MLVA использовался для субтипирования штаммов *S. Enteritidis*: показано, что эпидемиологическая конкордантность и дифференцирующая способность этого метода (индекс разнообразия Симпсона 0,93) были значительно выше, чем метода PFGE (0,79) [26-28]. Основным недостатком метода MLVA является низкая универсальность при типировании *Salmonella* различных серотипов, обусловленная необходимостью дизайна серотип-специфических праймеров и зондов: стандартизированная методика предложена для типирования только двух ведущих серотипов. Кроме того, VNTR-локусы могут меняться при хранении и транспортировке штаммов, некоторые локусы включены в геном профагов или плазмид, что может изменить MLVA-субтип штаммов, выделенных во время одной вспыш-

ки, и снижает эффективность и достоверность метода при проведении долгосрочных эпидемиологических исследований [11, 29].

CRISPR-типирование *Salmonella*

Метод сравнивает штаммы, оценивая полиморфизм локусов CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) - коротких палиндромных повторов в ДНК, располагающихся группами и разделенных неповторяющимися последовательностями (спейсерами). Потеря или приобретение спейсеров в процессе эволюции приводит к изменению последовательности CRISPR-локусов штамма, что выявляют путем капиллярного электрофореза или секвенирования. У *Salmonella* описаны два локуса (CRISPR1 и CRISPR2), которые характеризуются высоким полиморфизмом спейсеров, выявлена корреляция между полиморфизмом CRISPR-локусов и серотипом для 98,0% штаммов *Salmonella* [30]. Анализ полиморфизма одновременно двух CRISPR-локусов обладает высокой разрешающей способностью (индекс разнообразия 0,88), а его комбинация с оценкой полиморфизма двух генов вирулентности *Salmonella* (*fimH* и *ssel*) повысило разрешающую способность метода до 0,9 и выше. Метод, названный авторами CRISPR-MVLST, используют для субтипирования штаммов *Salmonella* при расследовании вспышек наряду с методом PFGE [31, 32].

Методы полногеномного секвенирования (whole genome sequencing, WGS)

Гомогенность генома, характерная для высоко клональных серотипов (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Montovideo*, *S. Heidelberg* и др.), не позволяет использовать традиционные молекулярные методы (PFGE, MLVA) для достоверного субтипирования штаммов при расследовании вспышек и требует применения методов, основанных на анализе всего генома микроорганизма. WGS внедрено в национальные системы надзора за заболеваниями, передающимися с пищевыми продуктами, в США (CDC, FDA), Великобритании (Public Health England), Дании (Statens serum Institut) и Канаде (Public Health Agency of Canada) [2, 33]. Согласно разработанной дорожной карте по внедрению WGS для субтипирования изолятов *Salmonella* на 2019 – 2021 гг., Европейский Центр по Контролю Заболеваемости (ECDC) ставит три основные задачи при расследовании вспышек: верификация общности вспышек, возникающих в разных странах Европейского Союза; установление источников, факторов и

путей распространения вспышек в сотрудничестве с Европейским агентством по безопасности продуктов питания; прогноз антибиотикорезистентности клинических изолятов по геномным данным [34]. Новейшие методы WGS (Oxford Nanopore) позволяют проводить анализ данных в режиме «реального времени»: идентификация штамма до вида в течение 20 мин., серотипа - в течение 40 мин., вывод о принадлежности к вспышке - через 2 часа [35].

При использовании данных WGS для субтипирования существуют два принципиальных подхода: SNP-типирование (выявление спектра ортологичных единичных нуклеотидных вариаций - single nucleotide polymorphism, SNP) и полногеномное MLST, основанное на определении набора аллельных вариантов ортологичных генов. Последний из них реализует принцип классического MLST, но в масштабе всего генома.

SNP-типирование

Полногеномное SNP-типирование проводится по биоинформатическому алгоритму, включающему получение SNP-профилей в результате выравнивания (картирования) генома нуклеотидных прочтений каждого исследуемого изолята на полногеномную нуклеотидную последовательность референс-генома [36,37]. SNP-профили сравнивают различными методами филогенетического анализа или, наиболее часто, попарной оценкой различий в количестве SNP. Этот подход наиболее распространен при субтипировании штаммов *Salmonella* из-за простоты и скорости проведения анализа в сравнении с разновидностями WGS-MLST и был неоднократно использован при расследовании международных вспышек сальмонеллеза, вызванных *S. Enteritidis* [38, 39].

Полногеномное MLST (whole genome MLST, wgMLST)

В настоящее время наблюдается тенденция к переходу от SNP-типирования к полногеномному MLST, основанному на анализе полиморфизма всех генов, составляющих геном изолята. Наиболее распространена схема анализа генов «корового» генома (гены, присутствующие у всех представителей вида *Salmonella enterica* spp. *enterica*, то есть набор ортологичных генов) – так называемое MLST корового генома (core genome MLST, cgMLST) [40,41]. Расширенная схема полногеномного MLST включает анализ как «коровых», так и дополнительных генов, которые присутствуют только у части исследуемых изолятов данного вида. Биоинформатический ал-

горитм анализа данных WGS включает несколько этапов: сборка коротких прочтений в контиги, автоматический поиск белок-кодирующих генов, и на заключительном этапе - определение в исследуемом геноме «коровых» генов и их аллельных вариантов в сравнении с уже существующей базой данных аллелей. В результате исследуемый изолят характеризуется индивидуальным полногеномным MLST-типом (набором цифр, соответствующих аллельным вариантам генов), который сравнивается в дальнейшем между изолятами. Разрешающая способность полногеномного MLST в сравнении с SNP-типированием в ряде случаев выше за счет учета в анализе не только единичных нуклеотидных полиморфизмов, но и небольших инсерций/делеций, которые могут присутствовать внутри гена. Более того, внедрение MLST на международном уровне позволяет использовать единую номенклатуру штамма, что решает проблему международной стандартизации, а также снижает требования к вычислительным ресурсам. Вместе с тем, при проведении такого рода анализа необходим индивидуальный подход, так как каждый впервые обнаруженный аллель гена требует «ручной» перепроверки [42]. Эпидемиологическая конкордантность метода cgMLST при субтипировании штаммов *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Heidelberg* показана при расследовании многочисленных вспышек сальмонеллеза [43-50].

Международные базы данных WGS, используемые для субтипирования *Salmonella*

Наряду с закрытыми WGS-базами данных возбудителей кишечных инфекций [51], существуют международные открытые информационные платформы: Pathogene Detection (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/>) и Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>). Платформа Pathogene Detection была создана по объединенной инициативе Food and Drug Administration (FDA), Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Food Safety Inspection Service (FSIS) и NCBI. NCBI сформировал инфраструктуру по хранению и анализу данных WGS, полученных в США в рамках надзора за возбудителями, в частности изолятами *Salmonella*, выделенными из продуктов питания, окружающей среды и от людей. Платформа Enterobase организована институтом WARWICK (Великобритания) и включает данные секвенирования, полученные не только из архива коротких прочтений NCBI, но и лабораторий многих стран, которые само-

стоятельно загружают данные непосредственно в эту базу. Обе платформы включают огромный массив данных WGS (более 200 тыс. геномов) не только *Salmonella*, но и других возбудителей. В Enterobase реализован подход к субтипированию возбудителей методами MLST (семи генов «домашнего хозяйства»), MLST по рибосомальным генам, cgMLST, wgMLST) с целью унифицировать и стандартизировать различные схемы MLST-анализа. Также Enterobase располагает инструментами для анализа и визуализации данных, например для проведения молекулярного серотипирования и сборки геномов *de novo*.

Если Enterobase, в основном, осуществляет функцию хранения, упорядочивания и анализа массива данных, то платформа Pathogene Detection позволяет проводить надзор за субтипами возбудителя в режиме реального времени и поиск генетически близких изолятов при расследовании вспышек. Так, после загрузки данных пользователем система автоматически проводит все необходимые этапы анализа данных, присваивает изоляту идентификатор SNP-кластера (внутри SNP-кластера изоляты различаются максимум на 50 SNP) и выдает список генетически близких изолятов, которые имеют минимальное число различий в SNP со сравниваемым изолятом или с группой изолятов. Визуальный анализ группы изолятов, входящих в SNP-кластер, позволяет определить наиболее генетически близкие изоляты, выделенные в разных странах мира. Более того, система автоматически идентифицирует гены антибиотикорезистентности, что упрощает задачу комплексного анализа. Следует отметить, что разработчики платформы Pathogene Detection планируют переход к субтипированию возбудителей на основе wgMLST.

Поскольку классификация *Salmonella* по серотипам остается «золотым стандартом» при проведении эпидемиологического надзора за сальмонеллезами, разработаны открытые биоинформатические платформы, позволяющие с высокой точностью (92-99,0%) установить серотип штамма путем анализа данных WGS. Такие платформы, как SeqSero (<http://www.denglab.info/SeqSero>) и SISTR (<https://lfz.corefacility.ca/sistr-app/>) позволяют определить серотип, анализируя нуклеотидную последовательность генов, кодирующих соматические и жгутиковые антигены. В тех случаях, когда установить антигенную формулу невозможно из-за неполноты данных WGS, платформа SISTR выбирает наиболее вероятный серотип внутри кластера cgMLST. В настоящее время SISTR внедрена в систему здравоохранения

Канады как замена классическому серотипированию [40, 52].

Заключение

Метод субтипирования должен обеспечивать достоверную оценку сходства изолятов, выделенных во время вспышки, а также позволять проводить ретроспективный анализ для оценки динамики субтипов возбудителя и связи различных по времени и месту возникновения случаев sporadических и групповых заболеваний. Относительно дешевые и быстрые методы субтипирования (традиционное серотипирование, PFGE, MLVA) наиболее доступны для использования и, несмотря на недостатки, во многих странах позиционируются как рутинные методы субтипирования *Salmonella*. В то же время эти методы не всегда позволяют достоверно дифференцировать изоляты серотипов с высоко консервативным геномом, а также не отражают филогенетические отношения штаммов.

Благодаря быстрому совершенствованию технологий секвенирования и биоинформационного анализа, методы WGS становятся доступными и наиболее предпочтительными методами субтипирования при проведении эпидемиологического надзора и расследования вспышек. Несмотря на объективное преимущество новых технологий, широкомасштабное внедрение WGS в практику рядовых лабораторий пока нереализуемо для большинства стран, поскольку требует высоких материальных затрат и комплексной экспертной оценки результатов специалистами в области биоинформатики, микробиологии и эпидемиологии. Решение этой проблемы состоит в разумном использовании дорогостоящей технологии WGS: например, исследование изолятов, принадлежащих к серотипам с высоко консервативным геномом, или выделенных при возникновении чрезвычайных ситуаций, а также при проведении фундаментальных исследований генетического разнообразия возбудителя, вирулентности и антибиотикорезистентности. Переход к эпохе «геномной эпидемиологии» требует установления взаимосвязи между вновь секвенированными геномами и данными традиционного субтипирования, для которых созданы обширные международные базы данных, такие как Enterobase, Pathogene Detection и PubMLST. В РФ актуальным является внедрение в существующую систему надзора за сальмонеллезами современных молекулярных и информационных технологий и формирование национальной базы данных молекулярных исследований.

Литература

- Zheng Z., Zheng W., Wang H., et al. Serotype determination of Salmonella by xTAG assay. *J Microbiol Methods*. 2017;141:101-107. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.08.011.
- Yoshida C., Gurnik S., Ahmad A., et al. Evaluation of molecular methods for identification of Salmonella serovars. *J Clin Microbiol*. 2016; 54:1992-1998. DOI:10.1128/JCM.00262-16.
- Braun S.D., Ziegler A., Methner U., et al. Fast DNA Serotyping and Antimicrobial Resistance Gene Determination of Salmonella enterica with an Oligonucleotide Microarray-Based Assay. *PLoS ONE*. 2012; 7(10):e46489. DOI:10.1371/journal.pone.0046489.
- Bugarel M., Tudor A., Loneragan G.H., et al. Molecular detection assay of five Salmonella serotypes of public interest: Typhimurium, Enteritidis, Newport, Heidelberg, and Hadar. *J Microbiol Methods*. 2017; 134:14-20. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.12.011.
- Heymans R., Vila A., van Heerwaarden C.A.M., et al. Rapid detection and differentiation of Salmonella species, Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis by multiplex quantitative PCR. *PLoS One*. 2018; 13(10):e0206316. DOI:10.1371/journal.pone.0206316.
- Herrera-Leo'n S., McQuiston J.R., Usera M.A., et al. Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of Salmonella spp. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(6):0095-1137. DOI:10.1128/JCM.42.6.2581-2586.2004.
- Dunbar S.A., Ritchie V.B., Hoffmeyer M.R., et al. Luminex® multiplex bead suspension arrays for the detection and serotyping of Salmonella spp. *Methods Mol Biol*. 2015;1225:1-27. DOI: 10.1007/978-1-4939-1625-2_1.
- Mughini-Gras L., Franz E., van Pelt W. New paradigms for Salmonella source attribution based on microbial subtyping. *Food Microbiology*. 2018; 71: 60-67. DOI:10.1016/j.fm.2017.03.002.
- Achtman M., Wain J., Weill F.X., et al. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in Salmonella enterica. *PLoS pathogens*. 2012; 8(6): e1002776.
- Ashton P.M., Nair S., Peters T.M., et al. Identification of Salmonella for public health surveillance using whole genome sequencing. *PeerJ*. 2016; 4:e1752. DOI:10.7717/peerj.1752.
- Ferrari R.G., Panzenhagen P.H.N., Conte-Junior C.A. Phenotypic and Genotypic Eligible Methods for Salmonella Typhimurium Source Tracking. *Front Microbiol*. 2017; 8:2587. DOI:10.3389/fmicb.2017.02587.
- Ziebell K., Chui L., King R., et al. Subtyping of Canadian isolates of Salmonella Enteritidis using Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) alone and in combination with Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and phage typing. *J Microbiol Methods*. 2017; 139: 29-36. DOI:10.1016/j.mimet.2017.04.012.
- Lienemann T., Kyuhkynen A., Halkilahti J., et al. Characterization of Salmonella Typhimurium isolates from domestically acquired infections in Finland by phage typing, antimicrobial susceptibility testing, PFGE and MLVA. *BMC Microbiol*. 2015; 15:131. DOI:10.1186/s12866-015-0467-8.
- Павлова А.С., Кулешов К.В., Гоптарь И.А., и др. Первичные данные об изучении популяционной структуры доминантного PFGE-типа S.Enteritidis JEGX01.0001-JEGA26.0001 и возможности применения полногеномного секвенирования для определения связи между различными очагами заболеваемости. В сборнике: Молекулярная диагностика. Под редакцией В.И. Покровского. 2018. С.298-299.
- Кулешов К.В., Павлова А.С., Гоптарь И.А., и др. Стандартизация получения и анализа данных полногеномного секвенирования при субтипировании изолятов Salmonella Enteritidis. В сборнике: Молекулярная диагностика. Под редакцией В.И. Покровского. 2018. С.296-297.
- Prendergast D.M., O'Grady D., Fanning S., et al. Application of multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA), phage typing and antimicrobial susceptibility testing to subtype Salmonella serovar Typhimurium isolated from pig farms, pork slaughterhouses and meat producing plants in Ireland. *Front Microbiol*. 2011; 28(5): 1087-94. DOI:10.1016/j.fm.2011.02.013.
- Muvhali M., Smith A.M., Raktantso A.M., et al. Investigation of Salmonella Enteritidis outbreaks in South Africa using multilocus variable-number tandem-repeats analysis, 2013-2015. *BMC Infectious Diseases*. 2017; 17:661. DOI:10.1186/s12879-017-2751-8.
- Larsson J.T., Torpdahl M., Petersen R.F., et al. Development of a new nomenclature for Salmonella Typhimurium multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA). *Euro Surveill*. 2009; 14(15): pii=19174. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19174>.
- Larsson J.T., Torpdahl M., MLVA working group and Møller Nielsen E. Proof-of-concept study for successful inter-laboratory comparison of MLVA results. *Euro Surveill*. 2013; 18:20566. DOI:10.2807/1560-7917.ES2013.18.35.20566.
- Lindstedt B.A., Torpdahl M., Vergnaud G., et al. Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight European countries, 2012. *Euro Surveill*. 2013;18(4):pii=20385. DOI:10.2807/ese.18.04.20385-en.
- Hopkins K.L., Peters T.M., de Pinna E., et al. Standardisation of multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) for subtyping of Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Euro Surveill*. 2011; 16(32): pii=19942. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19942>.
- Technical report EFSA. Multi-country outbreak of Salmonella Enteritidis phage type 8, MLVA profile 2-9-7-3-2 and 2-9-6-3-2 infections. DOI:10.2903/sp.efsa.2017.EN-1188. Available from: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/DOI/epdf/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1188>.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Multi-country outbreak of Salmonella Enteritidis phage types 56 and 62, MLVA profile 2-11-3-3-2 and 2-12-3-3-2 infections – 20 July 2017. Available from: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/rapid-risk-assessment-multi-country-outbreak-Salmonella-Enteritidis.pdf>
- Malorny B., Junker E., Helmuth R. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of Salmonella enterica serotype Enteritidis. *BMC Microbiol*. 2008;8:84.
- PulseNet Methods and Protocols. MLVA protocols. Available from: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocols.html>
- Кулешов К.В. Разработка и апробация методики MLVA-анализа с целью субтипирования изолятов S.Enteritidis. В сборнике: Молекулярная диагностика. Под редакцией В.И. Покровского. 2010. С.350-353.
- Кулешов К.В., Подколзин А.Т., Рожнова С.Ш. Сравнительная оценка молекулярно-генетических методов типирования изолятов S.Enteritidis в очагах групповой заболеваемости. В сборнике: Молекулярная диагностика. Под редакцией В.И. Покровского. 2010. С.353-357.
- Харитоновна Н.Е., Кулешов К.В., Рожнова С.Ш., и др. Изучение генетической гетерогенности изолятов Salmonella spp., Shigella spp., выделенных в очагах групповой и sporadicческой заболеваемости в Российской Федерации. В сборнике: Молекулярная диагностика. Под редакцией В.И. Покровского. 2014. С.372-373.
- Hopkins K.L., Maguire C., Best E., Liebana E., et al. Stability of multiple-locus variable-number tandem repeats in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J. Clin. Microbiol*. 2007; 45: 3058-3061. DOI: 10.1128/JCM.00715-07
- Fabre L., Zhang J., Guigon G., et al. CRISPR Typing and Subtyping for Improved Laboratory Surveillance of Salmonella Infections. *PLoS ONE*.2012; 7(5):e36995. DOI:10.1371/journal.pone.0036995.
- Shariat N., Sandt C.H., DiMarzio M.J., et al. CRISPR-MVLST subtyping of Salmonella enterica subsp. enterica

- serovars Typhimurium and Heidelberg and application in identifying outbreak isolates. *BMC Microbiol.* 2013;13:254. DOI: 10.1186/1471-2180-13-254.
32. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2013. Scientific Opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling, outbreak investigation and scanning surveillance: Part 1 (evaluation of methods and applications). *EFSA Journal* 2013;11(12):3502, 84 pp. DOI:10.2903/j.efsa.2013.3502
33. Franz E., Gras L.M., Dallman T. Significance of whole genome sequencing for surveillance, source attribution and microbial risk assessment of foodborne pathogens. *Curr Opin Food Sci.* 2016; 8:74–79. DOI:10.1016/j.cofs.2016.04.004.
34. European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC strategic framework for the integration of molecular and genomic typing into European surveillance and multi-country outbreak investigations – 2019–2021. Stockholm: ECDC; 2019. Available from: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/framework-for-genomic-surveillance.pdf>
35. Fernandez-Cuesta L., Sun R., Menon R., et al. Rapid draft sequencing and real-time nanopore sequencing in a hospital outbreak of *Salmonella*. *Genome Biol.* 2015; 16:7. DOI:10.1186/s13059-014-0558-0.
36. Katz L.S., Griswold T., Williams-Newkirk A.J., et al. A Comparative Analysis of the Lyve-SET Phylogenomics Pipeline for Genomic Epidemiology of Foodborne Pathogens. *Front Microbiol.* 2017; 8:375. DOI:10.3389/fmicb.2017.00375.
37. Dallman T., Ashton P., Schafer U., et al. SnapperDB: a database solution for routine sequencing analysis of bacterial isolates. *Bioinformatics.* 2018; 34(17):3028–3029. DOI:10.1093/bioinformatics/bty212.
38. Inns T., Ashton P.M., Herrera-Leon S., et al. Prospective use of whole genome sequencing (WGS) detected a multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis. *Epidemiol Infect.* 2017; 145:289–298. DOI:10.1017/S0950268816001941.
39. Pijnacker R., Dallman T.J., Aloys S.L. Tijmsma, et al. An international outbreak of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis linked to eggs from Poland: a microbiological and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases.* 2019. DOI: 10.1016/S1473-3099(19)30047-7.
40. Yoshida C.E., Kruczkiewicz P., Laing C.R., et al. The *Salmonella* In Silico Typing Resource (SISTR): An Open Web-Accessible Tool for Rapidly Typing and Subtyping Draft *Salmonella* Genome Assemblies. *PLoS ONE.* 2016; 11(1): e0147101. DOI:10.1371/journal.pone.0147101.
41. Yachison C.A., Yoshida C., Robertson J., et al. The Validation and Implications of Using Whole Genome Sequencing as a Replacement for Traditional Serotyping for a National *Salmonella* Reference Laboratory. *Front Microbiol.* 2017; 8:1044. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01044.
42. Nadon C., Van Walle I., Gerner-Smidt P., et al. PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. *Euro Surveill.* 2017; 22(23): pii=30544. DOI:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.23.30544.
43. Wuyts V., Denayer S., Roosens N.H.C., et al. Whole genome sequence analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 outbreaks from a national reference laboratory's viewpoint. *PLoS Curr.* 2015; 7:ecurrents.outbreaks.aa5372d90826e6cb0136ff66bb7a62fc. DOI:10.1371/currents.outbreaks.aa5372d90826e6cb0136ff66bb7a62fc.
44. den Bakker H.C., Allard M.W., Bopp D., et al. Rapid whole-genome sequencing for surveillance of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20:1306–1314. DOI: 10.3201/eid2008.131399.
45. Taylor A.J., Lappi V., Wolfgang W.J., et al. Characterization of foodborne outbreaks of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with whole-genome sequencing single nucleotide polymorphism-based analysis for surveillance and outbreak detection. *J Clin Microbiol.* 2015; 53:3334–3340. DOI:10.1128/JCM.01280-15.
46. Deng X., Shariat N., Driebe E.M., et al. Comparative analysis of subtyping methods against a whole-genome-sequencing standard for *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *J Clin Microbiol.* 2015; 53:212–218. DOI:10.1128/JCM.02332-14.
47. Ashton P.M., Peters T., Ameh L., et al. Whole genome sequencing for the retrospective investigation of an outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 8. *PLoS Curr.* 2015;7:ecurrents.outbreaks.2c05a47d292f376afc5a6fcd8a7a3b6. DOI:10.1371/currents.outbreaks.2c05a47d292f376afc5a6fcd8a7a3b6.
48. Bekal S., Berry C., Reimer A.R., et al. Usefulness of high-quality core genome single-nucleotide variant analysis for subtyping the highly clonal and the most prevalent *Salmonella enterica* serovar Heidelberg clone in the context of outbreak investigations. *J Clin Microbiol.* 2016; 54:289–295. DOI:10.1128/JCM.02200-15.
49. Timme R.E., Pettengill J.B., Allard M.W., et al. Phylogenetic diversity of the enteric pathogen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* inferred from genome-wide reference-free SNP characters. *Genome Biol Evol.* 2013; 5:2109–2123. DOI:10.1093/gbe/evt159.
50. Byrne L., Fisher I., Peters T., et al. A multi-country outbreak of *Salmonella* Newport gastroenteritis in Europe associated with watermelon from Brazil, confirmed by whole genome sequencing: October 2011 to January 2012. *Euro Surveill.* 2014; 19:6–13. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20866>.
51. Allard M.W., Strain E., Melka D., et al. Practical Value of Food Pathogen Traceability through Building a Whole-Genome Sequencing Network and Database. *Journal of Clinical Microbiology.* 2016; 54 (8): 1975-1983. DOI:10.1128/JCM.00081-16.
52. Robertson J., Yoshida C., Kruczkiewicz P., et al. Comprehensive assessment of the quality of *Salmonella* whole genome sequence data available in public sequence databases using the *Salmonella* in silico Typing Resource (SISTR). *Microb Genom.* 2018;4. DOI: 10.1099/mgen.0.000151.

Сведения об авторах:

Светлана Александровна Егорова - к.м.н., с.н. с. лаборатории кишечных инфекций, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. 197101 С-Пб, ул. Мира, 14, раб.тел. +7 (812) 232 48 83, моб. +7 911 959 95 19. egorova72@mail.ru

Поступила 25.07.2019 г.