



***Listeria monocytogenes* като основен хранителен патоген, наличие на гени за резистентност и нови молекулярни методи за диагностика на листериоза**

Listeria monocytogenes е повсеместен хранителен патоген, свързан с високата хоспитализация и огнищата на болести, пренасяни чрез храна. В световен мащаб. *L. monocytogenes* причинява листериоза при хората и животните и може да се изолира от много хранителни матрици, основно месни, рибни и млечни продукти. Тези бактерии също се считат за потенциален източник на замърсяване за охладени и морски хранителни продукти и непастьоризирани млечни продукти и са открити при скорошни огнища и спорадични случаи на листериоза. В млекодайното направление стада крави замърсената техника за доене на кравите, които са в пряк контакт с вимената на животните често служат като потенциален източник за предаване на *L. monocytogenes*. В съответствие с това при хора, които са пряко ангажирани с гледане на животните, колене и транжиране на месо, първично производство на млечни и месни продукти, основно са докладвани три клонинга *L. monocytogenes*, хипервирулентни клонинги (СС1) и хиповирулентни клонинги (СС9 и СС121).

Патогенността на *L. monocytogenes* се определя до голяма степен от група гени, отговорна за вирулентността. Щамовете на *L. monocytogenes* от млекодайни стада носят редица маркери за вирулентност, включително островите за патогенност на *Listeria* (LPI) 3 и LPI-4, които са свързани с тежки инфекции при човека. Факторите на вирулентност са свързани с ключови стадии на адхезия, инвазия, размножаване, подвижност и междуклетъчно разпространение в клетките гостоприемници и следователно играят ключова роля за вирулентността и резистентността. Основните детерминантни гени за вирулентност включват вътрешни, кодирани от *inlA*, *inlC* и *inlJ* гени, листериолизин, кодиран от *hlyA* ген, актин кодиран от *actA* ген и свързания с инвазивността протеин, кодирани от *iap* ген. Гените за вирулентност *hlyA*, *plcB* и *prfA* са открити в щамове на *L. monocytogenes* от кръвни и млечни изолати. Освен това генът *prfA* за вирулентност е транскрипционен активатор, идентифициран сред патогенните *L. monocytogenes*. образуването на биофилм също така обикновено се свързва с *L. monocytogenes* изолати от мляко и млечни продукти, които носят различни гени за вирулентност и резистентност към антибиотици.

По стандарт диагнозата листериоза се основава предимно на изолиране и биохимично характеризиране на патогенния причинител, което отнема много време. Молекулярните подходи като PCR и мултиплексен PCR (MPCR) осигуряват бързи и с висока специфичност техники за диагностициране на *L. monocytogenes*, насочени към специфични гени.

Listeria monocytogenes е Грам-положителен, факултативен вътреклетъчен патоген, който е повсеместно разпределен в околната среда (Smith et al., 2019). Голямо **разнообразие от животински видове могат да бъдат заразени с *L. monocytogenes***, включително бозайници, птици, риби и ракообразни (Наръчник на ОЕ за сухоземните животни от 2018 г.). Глава 3.9.6 - *L. monocytogenes*). Свинете например рядко развиват листериоза, когато са изложени на замърсен с *L. monocytogenes* фураж (Наръчник на ОЕ за сухоземните животни от 2018 г.). Глава 3.9.6 - *L. monocytogenes*), макар че те могат да се превърнат в носители на *L. monocytogenes* и така **този патоген се предава на хората чрез производствената верига**, и може да причини листериоза при човека (Felix et al., 2018). Спорадично в световен мащаб се съобщава за огнища на листериоза. В Южна Африка през 2017 г. листериозата е отнела живота на 193 пациенти, като източника на замърсяване е била свинска наденица с *Listeria* (Thomas et al., 2020). Във Франция е документирано огнище (32 случая, 10 смъртни случая) поради замърсяване с *L. monocytogenes* в свински продукти в 1999-2000 г. (Matle et al., 2020). В Съединените щати CDC докладва за огнища на инфекция с *Listeria*, свързана с продукти от свинско месо през 2018г. **Замърсяването и преносът на *L. monocytogenes* по веригата за производство на храни** представляват **сериозна заплаха за общественото здраве и безопасността на храните** и са огромен проблем за държавите по света.

Антимикробната резистентност също е важен въпрос за общественото здраве и един от най-важните приоритети на Световната здравна организация (СЗО). Нарастващото ниво на антимикробна резистентност е довело до по-висока заболяемост и смъртност при пациентите и до увеличаване на разходите за здравеопазване през последните десетилетия. Мултирезистентният *L. monocytogenes* в готовите за консумация храни се счита за показател за нивата на общественото здраве, особено сред високорисковите групи. Силно препоръчително е да се повиши осведомеността относно разпоредбите за безопасност на храните, както и на употребата на лекарствата при хората и животните. Молекулярните методи като анализът на нуклеотидната последователност на *L. monocytogenes* е ефективен съвременен инструмент за генотипиране и анализ на филогенетичната връзка на видовете *Listeria* с други местни или глобални родове. Проучване, проведено в Съединените щати, съобщава за значително генетично сходство между щамовете на *L. Monocytogenes*, изолати от съдове за мляко с вирулентни щамове, изолирани от млечни продукти, които са свързани с огнища на болести, пренасяни чрез храна при хората.

В проучване на тема „*Prevalence, Antibiogram and Genetic Characterization of Listeria monocytogenes from Food Products in Egypt*“ на авторски колектив Eman E. Abdeen, Walid S. Mousa, Ola. H. Harb, Gehad A. Fath-Elbab, Mohammed Nooruzzaman, Ahmed Gaber, Walaa F. Alsanie u Ahmed Abdeen са изследвани известни и популярни готови за консумация храни като мляно месо, рибни ястия, млечни продукти и сладолед за наличие на тази патогенна бактерия. Провинция Менуфия на Египет е гъсто населена провинция, където хората консумират много популярни и разпространени в глобален мащаб готови за консумация храни като мляно месо, рибни ястия, млечни продукти и сладолед. Такива **сурови, необработени термично или недообработени храни** могат

да бъдат потенциален източник на патогенни *L. monocytogenes* при хората. Това проучване описва вирулентността и антибиотичната резистентност на *L. monocytogenes*, открити в различни готови за консумация хранителни продукти от Египет. Освен това е извършен частичен анализ на нуклеотидната последователност на гена 16S rRNA на три изолата на *L. monocytogenes*, за да се покажат генетичните прилики между изолати от изследването и различни клонинги, разпространени в глобален мащаб, които имат потенциални последици за общественото здраве.

Резултатите от това проучване сочат, че **общото разпространение на *L. monocytogenes* е 6,8 %** (n = 17), докато за други видове *Listeria* разпространението е както следва: *L. innocua* 3,2 % (n = 8), *L. grayi* 2,4 % (n = 6), *L. ivanovii* 0,4 % (n = 1) и *L. welshimeri* 0,8 % (n = 2). Сред различните проби от храни ***L. monocytogenes* най-често се открива в мляното месо (14 %), следвано от рибни продукти (8 %), колбаси (6 %) и мляко (6 %)**. Анализът на пробите от сладолед не показва наличие на *L. monocytogenes*.

Raw Milk (n = 50)		Ice Cream (n = 50)		Minced Meat (n = 50)		Fish Fillet (n = 50)		Sausage (n = 50)	
No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
3	6	0	0	7	14	4	8	3	6

Фиг. 1: Хранителни матрици, в които е открит *L. Monocytogenes*

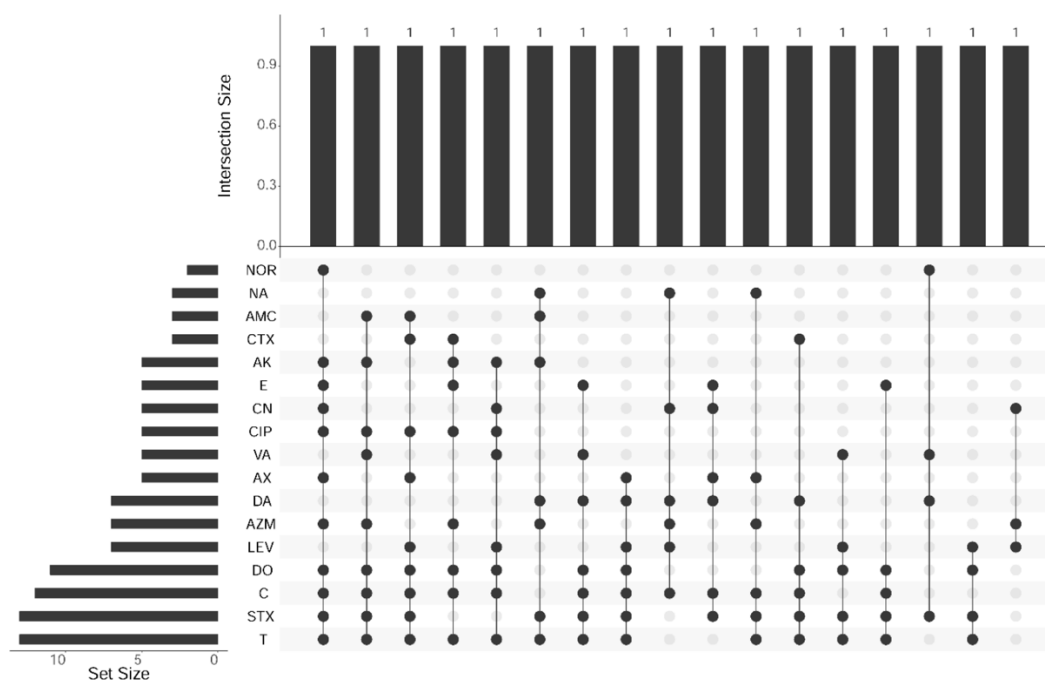
Профилите на антимикробна резистентност на изолати на *L. monocytogenes* са изследвани с помощта на метода диск дифузия. Изолатите на *L. monocytogenes* показват **висока чувствителност към β -лактами** (амоксицилин-клавуланова киселина, цефотаксим и амоксицилин), **норфлоксацин, еритромицин, гентамицин и ванкомицин**. За разлика от това се наблюдава **висока резистентност към тетрациклин (окситетрациклин и доксициклин), триметоприм-сулфаметоксазол и хлорамфеникол**. Общ подобен профил на антимикробна резистентност е наблюдаван при изолати *L. monocytogenes* от различни източници като мляко, рибно филе, колбаси и мляно месо.

Antibiotics	Antimicrobial Classes	Resistant		Intermediate		Sensitive	
		No	%	No	%	No	%
Amoxicillin-Clavulanic acid (AMC) 20/10 µg	β-lactams	3	17.7	1	5.9	13	76.4
Cefotaxime (CTX) 30 µg	β-lactams	3	17.7	2	11.8	12	70.5
Amoxicillin (AX) 30 µg	β-lactams	5	29.5	1	5.9	11	64.6
Norfloxacin (NOR) 10 µg	Fluoroquinolones	2	11.8	1	5.9	14	82.3
Ciprofloxacin (CIP) 5 µg	Fluoroquinolones	5	29.4	2	11.8	10	58.8
Levofloxacin (LEV) 5 µg	Fluoroquinolones	7	41.2	2	11.8	8	47
Danofloxacin (DA) 2 µg	Fluoroquinolones	7	41.2	2	11.8	8	47
Nalidixic acid (NA) 30 µg	Fluoroquinolones	3	17.7	10	58.8	4	23.5
Amikacin (AK) 30 µg	Aminoglycosides	5	29.4	1	5.9	11	64.6
Gentamicin (CN) 10 µg	Aminoglycosides	5	29.5	2	11.8	10	58.7
Erythromycin (E) 15 µg	Macrolides	5	29.5	1	5.9	11	64.6
Azithromycin (AZM) 15 µg	Macrolides	7	41.2	7	41.2	3	17.7
Doxycycline (DO) 30 µg	Tetracycline	11	64.6	3	17.7	3	17.7
Oxytetracycline (T) 30 µg	Tetracycline	13	76.4	1	5.9	3	17.7
Chloramphenicol (C) 30 µg	Chloramphenicol	12	70.5	2	11.8	3	17.7
Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT) 12.5/23.75 µg	Sulfonamides	13	76.4	2	11.8	2	11.8
Vancomycin (VA) 30 µg	Glycopeptides	5	29.5	2	11.8	10	58.7

% was estimated according to the total number of *L. monocytogenes* isolates ($n = 17$).

Фиг. 2: Общ профил на антимикробната резистентност на изолати *L. Monocytogenes*

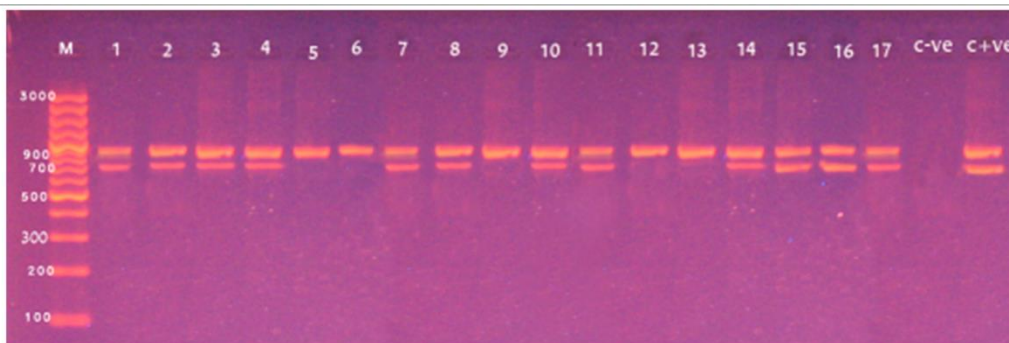
В това проучване са тествани профилите на мултирезистентност на 17 изолата *L. monocytogenes*. Изолатите на *L. monocytogenes* са мултирезистентни срещу 3 до 11 различни антибиотика, принадлежащи към 3 от 7 класа антимикробни средства:



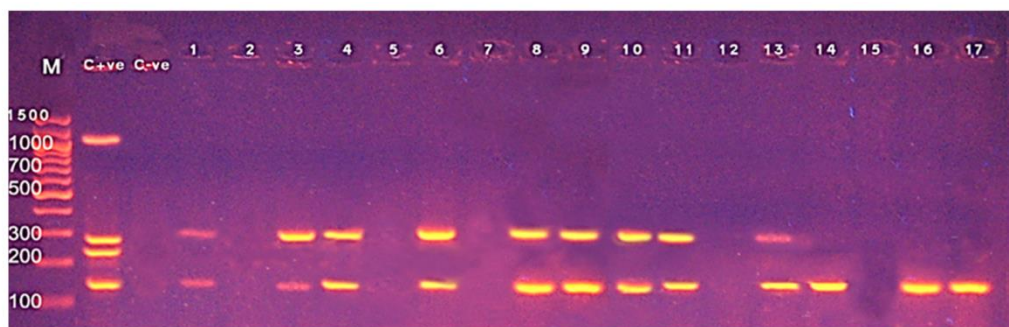
Фиг. 3: Профил на мултирезистентност на изолати *L. monocytogenes*

Посредством мултиплексен PCR са изследвани и 5 гена, отговорни за вирулентността на *L. Monocytogenes*, като е амплифициран фрагмент от 938 bp. 16S rRNA е открит при всички 17 изолата в това проучване. При скрининга на 5-те

вирулентни гени на *L. Monocytogenes hlyA* (n = 12, 70.6%) и *iap* (n = 12, 70.6%) са **най-разпространени**, следвани от *actA* гена (n = 9, 52.9%). Освен това е доказано, че гени *inlA* и *prfA* присъстват във всички тествани изолати. Трябва да се отбележи, че трите вирулентни гени (*hlyA*, *iap* и *actA*) присъстват едновременно в 6 изолата. Събрани заедно тези данни от проучването показват, че *L. monocytogenes* изолатите от хранителни продукти носят много гени за резистентност и много гени за вирулентност, показващи техния потенциал като патогени не само при животните и в храните, и при човека.



Фиг. 4: Амплификация на 16S rRNA, открит при всички 17 изолата



Фиг. 5: Амплификация на *inlA*, *actA*, *prfA*, *iap* гените за резистентност

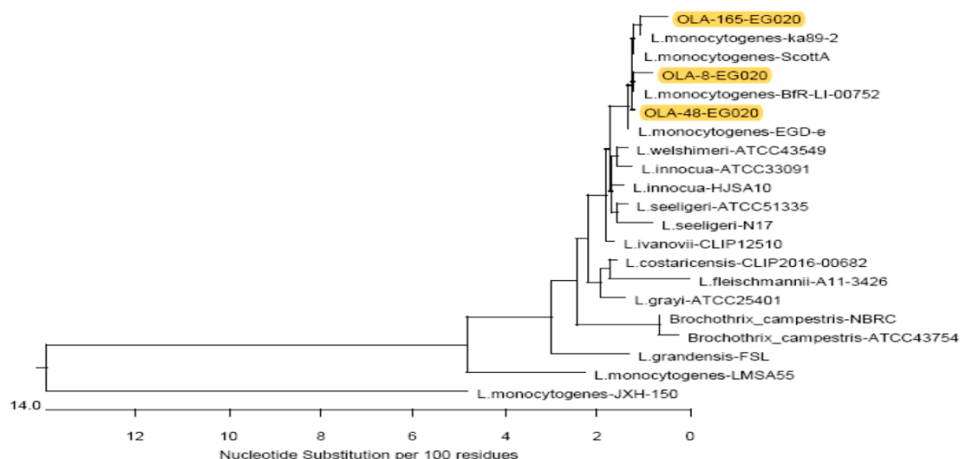
Анализът от секвенирането на 16S rRNA е използван за оценка на генното сходство на изолатите *L. monocytogenes* от рибено филе, мляно месо и сурово мляко с щамове и изолати, разпространени в глобален мащаб и публикувани в GenBank. Изолатите от проучването в Египет показват много висока степен на сходство на нуклеотидните последователности (99,1—99,8 %) с *L. monocytogenes* щамове, изолирани в Турция и Германия от месо и кайма и от други хранителни матрици. В допълнение близко сходство е направено между изолатите от Египет и тези *L. Monocytogenes*, идентифицирани от епидемията от листериоза в Масачузетс, САЩ, като подобна нуклеотидна идентичност е забелязана с изолати от зайци от Обединеното кралство.

		Percent Identity																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Divergence	1	100.0	99.6	99.1	99.8	99.8	99.8	99.8	98.8	98.8	98.9	98.7	98.3	98.6	98.8	97.9	97.0	96.6	96.4	95.9	93.7	80.9	1
	2	0.4	100.0	99.6	100.0	100.0	100.0	100.0	99.2	99.2	99.3	99.1	98.7	98.5	99.3	98.4	97.4	97.1	96.8	96.3	94.1	80.8	2
	3	0.9	0.4	100.0	99.9	99.9	99.9	99.9	98.6	98.6	98.7	98.5	98.0	97.8	98.7	97.7	96.7	96.4	96.2	95.6	93.5	80.3	3
	4	0.2	0.0	0.1	100.0	100.0	100.0	100.0	99.3	99.3	99.4	99.2	98.8	98.6	99.5	98.5	97.5	97.1	96.9	96.3	94.2	80.8	4
	5	0.2	0.0	0.1	0.0	100.0	100.0	100.0	99.3	99.3	99.4	99.2	98.8	98.6	99.5	98.5	97.5	97.1	96.9	96.3	94.2	80.8	5
	6	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	100.0	100.0	99.3	99.3	99.4	99.2	98.8	98.6	99.5	98.5	97.5	97.1	96.9	96.3	94.2	80.8	6
	7	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	100.0	99.3	99.3	99.4	99.2	98.8	98.6	99.5	98.5	97.5	97.1	96.9	96.3	94.2	80.8	7
	8	1.2	0.8	1.4	0.7	0.7	0.7	0.7	100.0	99.4	99.5	99.5	98.8	98.6	99.5	98.3	97.1	96.5	97.2	96.1	94.3	81.0	8
	9	1.2	0.8	1.4	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	100.0	99.5	99.2	99.0	98.8	99.5	98.3	97.1	96.6	97.2	96.1	94.1	81.2	9
	10	1.1	0.7	1.3	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5	100.0	99.4	98.9	99.1	99.6	98.8	97.2	96.8	97.5	96.2	94.7	81.7	10
	11	1.3	0.9	1.5	0.8	0.8	0.8	0.8	0.5	0.8	0.7	100.0	98.7	98.5	99.4	98.2	97.0	96.4	96.9	96.0	94.2	80.9	11
	12	1.8	1.3	2.0	1.2	1.2	1.2	1.2	1.0	1.1	1.3	1.3	100.0	98.3	98.9	97.9	96.5	96.4	97.1	95.5	93.7	81.0	12
	13	2.0	1.5	2.2	1.4	1.4	1.4	1.4	1.2	0.9	1.5	1.8	0.9	100.0	98.7	98.9	97.2	96.5	98.2	96.4	94.4	81.8	13
	14	1.2	0.7	1.3	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5	0.4	0.7	1.1	1.3	100.0	98.4	97.3	96.6	97.1	96.3	94.2	81.2	14
	15	2.1	1.7	2.3	1.6	1.6	1.6	1.6	1.8	1.8	1.2	1.9	2.1	1.1	1.6	100.0	97.0	96.9	97.8	96.0	95.2	81.8	15
	16	3.1	2.7	3.4	2.6	2.6	2.6	2.6	3.0	3.0	2.9	3.1	3.6	2.9	2.8	3.1	100.0	96.0	95.6	98.9	93.8	80.8	16
	17	3.4	3.0	3.7	2.9	2.9	2.9	2.9	3.6	3.4	3.3	3.7	3.7	3.6	3.4	3.2	4.1	100.0	95.1	94.9	93.7	81.6	17
	18	3.7	3.3	3.9	3.2	3.2	3.2	3.2	2.9	2.9	2.5	3.2	3.0	1.9	3.0	2.2	4.6	5.1	100.0	94.8	93.6	81.0	18
	19	3.6	3.2	3.9	3.1	3.1	3.1	3.1	3.4	3.4	3.3	3.5	3.9	3.0	3.1	3.5	0.4	4.6	4.8	100.0	92.9	79.9	19
	20	6.6	6.2	6.9	6.1	6.1	6.1	6.1	6.0	6.2	5.5	6.1	6.6	5.9	6.1	4.9	6.5	6.6	6.7	6.8	100.0	81.8	20
	21	22.2	22.2	22.9	22.3	22.3	22.3	22.0	21.7	21.1	22.1	22.0	21.0	21.7	21.0	22.4	21.2	22.0	22.8	20.9	8.8	100.0	21
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		

- OLA-8-EG020
- OLA-48-EG020
- OLA-165-EG020
- L.monocytogenes-ka89-2
- L.monocytogenes-BfR-LI-00752
- L.monocytogenes-ScottA
- L.monocytogenes-EGD-e
- L.welshimeri-ATCC43549
- L.monocytogenes-ATCC43549
- L.seeligeri-ATCC51335
- Livanovii-CLIP12510
- L.innocua-ATCC33091
- L.seeligeri-N17
- L.costaricensis-CLIP2016-00682
- L.innocua-HJSA10
- L.grayi-ATCC25401
- Brochothrix_campestris-NBRC
- L.grandensis-FSL
- L.fleischmannii-A11-3426
- Brochothrix_campestris-ATCC43754
- L.monocytogenes-LMSA55
- L.monocytogenes-JXH-150

Фиг. 6: Нуклеотидна идентичност и различие между изолатите *L. monocytogenes* от Египет и тези, представени в геномната банка

Във филогенетичното дърво се наблюдава групиране на щамовете *L. monocytogenes* от Египет с други щамове и видове *Listeria* включително *L. welshimeri* (щам ATCC 43549), *L. seeligeri* (щам ATCC 51335) и *L. innocua* (ATCC 33091) щамове от Китай с номер на присъединяване JF967629.1, JF967627.1 и JF967626.1, съответно. Освен това няколко щамове *Listeria* са показали хомология с изпитвани изолати от пилета в Китай (MT781377.1, щам HJSA10), четири щамове от различни страни и населени места, включително *L. ivanovii* от САЩ (NR_036808.1, щам CLIP 12510), *L. seeligeri* от Турция (МК490993.1, щам N17), *L. costaricensis* от Франция (МК174378.1, щам CLIP 2016/00682) и *L. grayi* от Швейцария (JN852815.1, щам ATCC 25401). От друга страна, във филогенетичното дърво са установени значителни прилики с два изолата *L. monocytogenes* от салати в Нигерия (KY053294.1, щам LMSA55) и дълбоководни седименти в Тихия океан (KR012147.1, щам JXH-150).



Фиг. 7: Филогенетично дърво на изолатите *L. monocytogenes* от Египет и тези, представени в геномната банка

Listeria monocytogenes има важно значение за общественото здраве поради честото замърсяване на хранителните продукти. В Египет *L. monocytogenes* навлиза в

хранителната верига на човека главно чрез замърсено месо и пилешки продукти. По-специално способността на *L. monocytogenes* да се развива дори и при хладилни условия на съхранение в разнообразни хранителни матрици затруднява контрола на този патоген. Откриването на тези бактерии в хранителните продукти в обектите за търговия на дребно показва **сериозен пропуск в мерките за контрол на качеството.**

Подобно проучване в Чешката република през 2004-2008г. отчита *L. monocytogenes* съответно при 5,2 %, 3,4 % и 1,8 % от деликатесните, месните и млечните продукти. Подобно проучване в Португалия е установило 7% разпространение на *L. monocytogenes* в 1035 хранителни продукта (мляко, месо, риба, брашно), което показва **потенциален риск за потребителите.** Разликата в процента на откриване на *L. monocytogenes* сред различните изследвания в различните хранителни матрици може да се обясни с видовете храни, размера на извадката, географския район и степента на санитарните мерки, прилагани по време на преработката и производството на храни.

Антибиограмата на изолатите от Египет *L. monocytogenes* срещу седемнадесет антибиотични средства показва **висока чувствителност към норфлоксацин (82,3%), амоксицилин-клавуланова киселина (76,4 %), цефотаксим (70,5 %), еритромицин (64,6 %), амоксицилин (64,6 %), гентамицин (58,7 %) и ванкомицин (58,7 %).** Докато **висока резистентност се наблюдава срещу окситетрациклин (76,4%) и триметоприм-сулфаметоксазол (76,4%), хлорамфеникол (70,5%), доксициклин (64,6%), левофлоксацин (41,2 %) и азитромицин (41,2 %).** Антимикробните профили на щамовете *L. monocytogenes*, извлечени от четири различни източника, като сурово мляко, рибно филе, колбаси и мляно месо, като цяло са сходни. Освен това, **всички 17 *L. monocytogenes* изолати са мултирезистентни.** Тези констатации са подкрепени и от по-ранни проучвания, които показват **висока устойчивост на изолати *L. monocytogenes* срещу пеницилин, амоксицилин/клавуланова киселина, тетрациклин и хлорамфеникол.** Освен това *L. monocytogenes*, изолиран от риба и рибни продукти в Индия, показва **резистентност към множество антибиотици.** Висока чувствителност на *L. monocytogenes* към няколко антибиотици, включително амоксицилин, цефалотин, флоксацилин и сулфаметоксазол, както и висока степен на резистентност срещу пеницилин, налидиксова киселина, тетрациклин и хлорамфеникол, също са открити в изолати от няколко готови за консумация хранителни продукти от мляко, месо и риба. В друго проучване също така се съобщава за **антимикробна резистентност към два или повече антибиотици от 36 *L. monocytogenes* от сурово мляко, което е пряка заплаха за общественото здраве за потребителите.** Всички тези проучвания подчертават **необходимостта от непрекъснато наблюдение на *L. monocytogenes* и проследяване на модела на антимикробна чувствителност и тяхното въздействие върху общественото здраве.**

Все по-развиващите се и напреднали молекулярни методи за изпитване предлагат **бързо и чувствително откриване на *L. monocytogenes* в хранителни продукти,** което е от **решаващо значение за хранително-вкусовата промишленост.** *Harb* и колектив показват, че МРСР, насочен към гените 16S rRNA и *hlyA*, може ефективно да открие *L. monocytogenes* в проби от храни. В сравнително проучване в Нигерия, *Usman* и екип използват МРСР за откриване на множество гени, свързани с

вирулентността (*PRFA*, *INLA*, *hlyA*, *actA* и *Iap*) в *L. monocytogenes* от мляко и млечни продукти, където **25 % от тях носят един или два от гените на вирулентността**. В Египет *Abdellrazeq* и колектив изследват **пет вирулентни гена (*PRFA*, *hlyA*, *ACTA*, *INLA* и *prs*) в *L. monocytogenes* от различни видове риби** чрез MPCR и откриват *prs* ген във **всички изследвани изолати**, докато само седем изолати пренасят други гени на вирулентност. В Индия *Kaur* и колектив в своето проучване са тествали 335 проби от храни (**пилешко, свинско и риба**) от различни търговски обекти и са установили, че **всички изолати на *L. monocytogenes* притежават *PRFA*, *PLCA*, *ACTA*, *hlyA* и *iap*** свързани с вирулентността гени. Освен това *Haj Hosseini* и колеги демонстрират гена *prfA* във всички *L. monocytogenes* от замърсени храни в Иран.

Частичното секвениране на 16S rRNA е извършено, за да се **оцени генетичната хомология сред изолатите на *L. monocytogenes*** от мляко, рибно филе и мляно месо, както и между свързаните глобални последователности. Тези констатации показват **висока нуклеотидна прилика (99,1-99,8%) между щамовете на *L. monocytogenes* с различни глобални клонинги**. Тези констатации се потвърждават и с други проучвания, при които е установена тясна връзка (над 99% сходство на нуклеотидите) между членовете на рода *Listeria* и това подчертава значението на 16S rRNA при разграничаването на видовете *Listeria*.

Техниките за нуклеотидното секвениране и мултилокусното секвениране (MLST) могат да се доусъвършенстват в още по-прецизни техники за **разпознаване на клоналните комплекси (CC) на щамовете на *L. monocytogenes* и филогенетичните знаци сред различните щамове *Listeria* в популацията**. Анализът на секвенирането на 16S rRNA на *L. monocytogenes*, изолиран от мляко в САЩ например, показва **голямо генетично разнообразие с много щамове, носещи маркери за вирулентност**, които са свързани със сериозни човешки инфекции. Сравнението с глобалните клонинги групира изолатите на *L. monocytogenes* в два отделни клъстера — **линия А**, които обикновено са свързани с **епидемична листериоза**, и **линия В**, които са свързани най-вече със **спорадични случаи на листериоза**.

Проучването показва въздействието на *L. monocytogenes* като **основен замърсител на различни хранителни продукти** и **необходимостта от повече внимание върху осведомеността и хигиенните мерки в хранително-вкусовата промишленост**. Повечето от изолатите *L. monocytogenes* от хранителни продукти са мултирезистентни, което добавя допълнителна тежест към съществуващите глобални проблеми с **антимикробната резистентност**. Секвентният анализ отчита **висока нуклеотидна хомоложност на изолати с много глобални клонинги**, което показва **широкото разпространение на такива щамове между различните страни** чрез производството и търговията с храни. Поради това са необходими основани на факти препоръки и непрекъснато образование за работниците, особено в хранително-вкусовата промишленост, за да се предотврати замърсяването на храните и появата на резистентни щамове.

С появата на евтино и бързорезултатно секвениране на целия геном през последните няколко години анализът на огнищата на листериоза се измести от предишния златен стандарт на анализа на PFGE към ядрото на генома посредством мултилокусно секвениране (*core genome multilocus sequencing (cgMLST)*) (*Luth et al.*,

2018)). Този тип секвениране *cgMLST* се основава само на гените, присъстващи в основния геном на даден вид, или поне на тези, които присъстват в групата от геноми, налични за анализ. Системата *1701-gene cgMLST* има много по-голям капацитет за разделителна способност за изолати и откриване на различия в сравнение с класическото 7-локусно секвениране MLST (Salcedo et al., 2003; Ragon et al., 2008). Като такъв *cgMLST* е в състояние не само да даде представа за цялостната структура на изолатите, циркулиращи сред населението, но също така е в състояние да допринесе за краткосрочното определяне, охарактеризиране и анализ на огнищата.

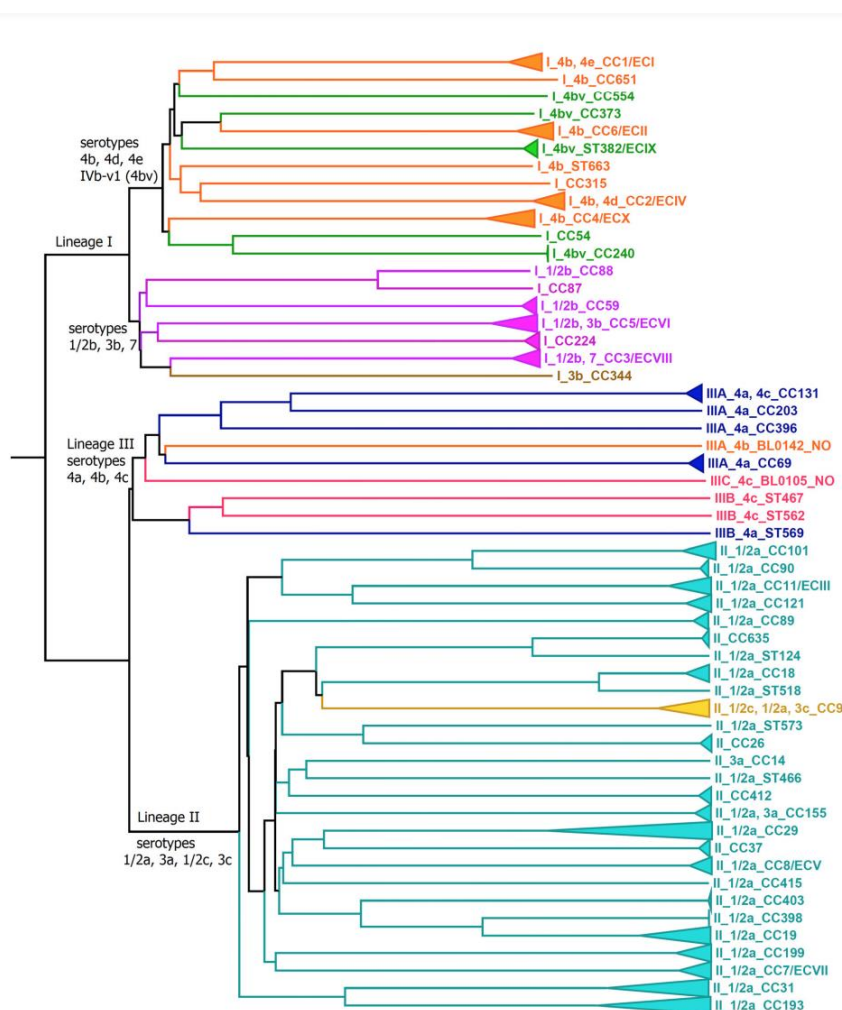
Референтните лаборатории предпочитат анализа на *cgMLST* пред други геномни анализи поради по-лесното стандартизиране на системата *cgMLST*; въпреки това анализът на структурата на популацията както в огнището, така и при филогенетичната връзка, също е от полза за анализа на начина, по който SNP и рекомбинацията допринасят за еволюцията и изменчивостта на бактериите. Повече за този иновативен метод, използван при *L. monocytogenes* може да бъде намерен в следното проучване: „Core Genome Multilocus Sequence Typing for Identification of Globally Distributed Clonal Groups and Differentiation of Outbreak Strains of *Listeria monocytogenes*“ на авторски колектив Yi Chen, Narjol Gonzalez-Escalona, Thomas S. Hammack, Marc W. Allard, Errol A. Strain, Eric W. Brown.

L. monocytogenes не е хомогенен вид, а съдържа четири отделни разклоняващи се линии, както е видно от резултатите от MLST, така и от по-новите глобални геномни анализи (Haase et al., 2014; Moura et al., 2016). При тестване за точкови мутации и рекомбинация с помощта на данните от 7-локусния MLST е установено, че появата на рекомбинация спрямо точкови мутации е около шест пъти по-честа при линия II, отколкото в линия I (den Bakker et al., 2008). Знанията обаче са ограничени по отношение на подлиниите (SL) и генния поток между линиите.

Хоризонталните механизми за генен трансфер променят генома и са важна движеща сила при оформянето на бактериалните популационни структури. Тъй като трансформацията не е документирана за *L. monocytogenes* (Borezee et al., 2000), трансдукцията, която е добре документирана при много бактериални видове (Popa et al., 2017), автоматично придобива основно значение като кандидат основен механизъм за генен трансфер. При този вид трансфер на гени интересът към бактериофагите също има практически аспекти, дължащи се на разликите в специфичните за родовете фагови адсорбционни цели (Dunne et al., 2018). Освен това съществуват сериозни изследвания и научни трудове за използването на фаги като биоконтрол в хранително-вкусовата промишленост (Carlton et al., 2005; Hagens u Loessner, 2014). Що се отнася до действителния принос на бактериофагите към генния трансфер в *Listeria*, съществуват противоречиви доказателства. В допълнение към значението на фагите при „оформянето“ на генома на *L. monocytogenes* (Klumpp u Loessner, 2013; Kuenne et al., 2013), има ясни доказателства, че фагите са отговорни за прехвърлянето на свързани с вирулентност гени от други видове към *Listeria* (Chen, Novick, 2009). С това фагите са замесени в „улесняването“ на трансфера на гени чрез генерализирана трансдукция, вероятно с различно въздействие в отделните родове и филогенетични линии (Hodgson, 2000; Orsi et al., 2011). Противно на това, малкият

размер на откритите хомоложни събития на рекомбинация не подкрепя трансдукцията като основен механизъм за прехвърляне (*den Bakker et al., 2008*).

В две обстояйни проучвания на теми: „*Lineage-specific evolution and gene flow in Listeria monocytogenes are independent of bacteriophages*“ на авторски колектив *Roxana Zamudio, Richard D. Haigh, Joseph D. Ralph, Megan De Ste Croix, Taurai Tasara, Katrin Zurfluh, Min Jung Kwun, Andrew D. Millard, Stephen D. Bentley, Nicholas J. Croucher, Roger Stephan and Marco R. Oggioni* и „*Environmental dissemination of pathogenic Listeria monocytogenes in flowing surface waters in Switzerland*“ на авторски колектив *Susanne Raschle, Roger Stephan, Marc J. A. Stevens, Nicole Cernela, Katrin Zurfluh, Francis Muchaamba & Magdalena Nüesch-Inderbinnen* са докладвани **нови огнища**, причинени от изолати *L. Monocytogenes*, съдържащи панел от геномни последователности, присъщи за клинични и хранителни изолати, с помощта на *cgMLST* секвениране, и след това са използвани **основните SNPs** за характеризирание на разликите в структурата на популацията и генния поток при висока разделителна способност на линии I, II и III.



Фиг. 8: Филогенетично дърво на всички изолати, определени от 1,827-cgMLST. Клоналните комплекси (CC) или епидемичните клонове (EC) са определени чрез MLST. CC или EC, съдържащи повече от един изолат, са представени чрез триъгълници.

Listeria monocytogenes е разделен на четири филогенетични линии (I -IV) (Ward et al., 2008; Orsi et al., 2011). Геномните секвенции на изолати на *L. Monocytogenes* са идентифицирани в Института по безопасност и хигиена на храните, Швейцария и са изолирани основно в периода 2011 до 2014 г. Средната дължина на геномните секвенции е 2 948 113 bp със средно съдържание на GC % 37,8%.

Основният геномен филогенетичен анализ на 166 швейцарски *L. Monocytogenes* изолати показва, че 51 изолати принадлежат към линия I и 113 към линия II. По отношение на произхода (клинични или хранителни) на изолатите, **клиничните изолати спадат към линия I - 36 изолати, а към линия II - 60 изолати; а хранителните изолати: към линия I - 14 изолати, а към линия II – 52 изолата.** Фенотипното изследване е използвано за потвърждаване на серотиповете (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c и 4d) на изолатите. Двата **най-често срещани серотипа са линия II серотип 1/2a (103 изолати) и линия I серотип 4b (38 изолати).** Информацията за вида на последователността на MLST (ST) показва, че **ST1** (осем изолати) е най-често срещаният ST по линии I и ST8 и ST121 (съответно със седем и осем изолата) **по линия II.**

При анализът на огнищата чрез cgMLST **разликата в алелните последователности < 10 cgMLST** е определена като **най-подходящата референтна** (Ruppitsch et al., 2015). В тези проучвания са включени наскоро публикувани изолати и от Германия (414 изолати) (Halbedel et al., 2018) и Нидерландия (128 изолати) (Kremer et al., 2017).

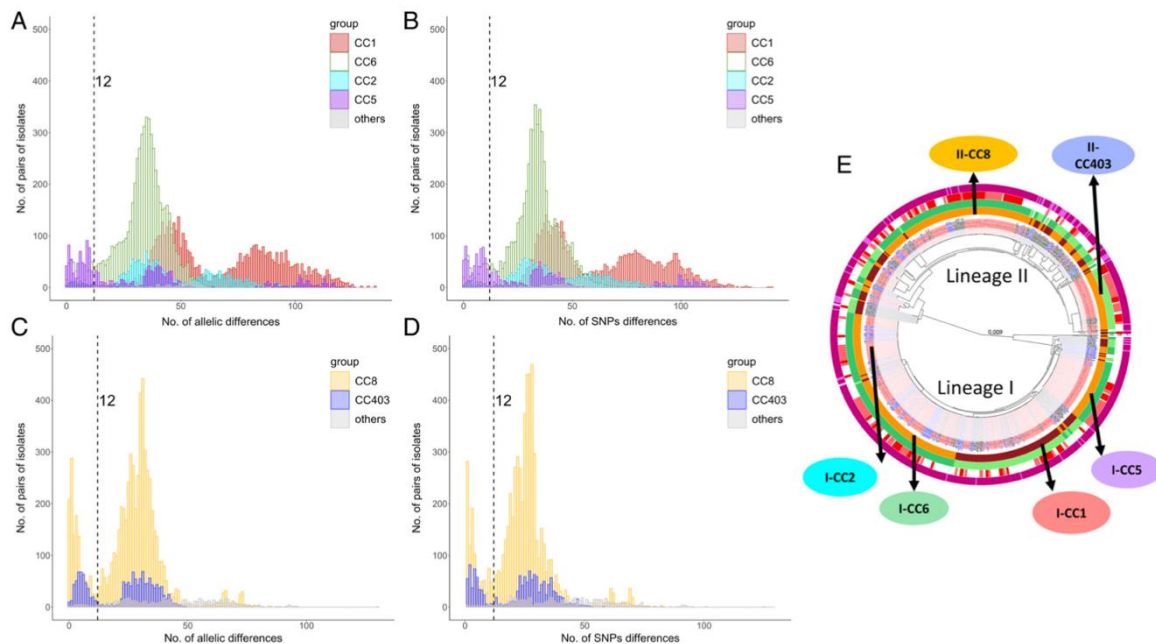
Когато са сравнени и анализирани данните отделно за **изолати от линия I и линия II**, са открити **разлики в тяхното геномно разнообразие.** Линии I изолати са по-разнообразни в рамките на подлинните, отколкото линия II, с по-широко разпределение на разстоянията по двойки и по-малко ясен пик, съответстващ на предполагаеми огнища. Подлинните имат различни популационни структури, като линия I има пикове при 36 и 80 cgMLST разлики, докато линия II показва по-тясно разпределение с пикове при 31 и 65 cgMLST разлики. Сравнени са разликите в SNP, където линия I има повече SNP в рамките на подлинните, отколкото линия II.

Когато се погледнат вместо това разликите между SL в рамките на линия се наблюдава обратната подредба линия I показва по-малко геномно разнообразие от линия II. cgMLST не е дала пълно обяснение за тази разлика, тъй като почти всички алели са различни; разликите в SNP обаче показват сериозно разнообразие, като разликите по линия I са от около 5000 SNP и от линия II са с около 15 000 SNP. В заключение, това предполага, че **линия II се състои от подлинни, които са по-силно различаващи се една от друга от тези в рамките на линия I**, но всяка подлинна от първи ред съдържа малко по-голямо разнообразие от еквивалента на линия II, което би могло да усложни заключението за огнищата по линия I.

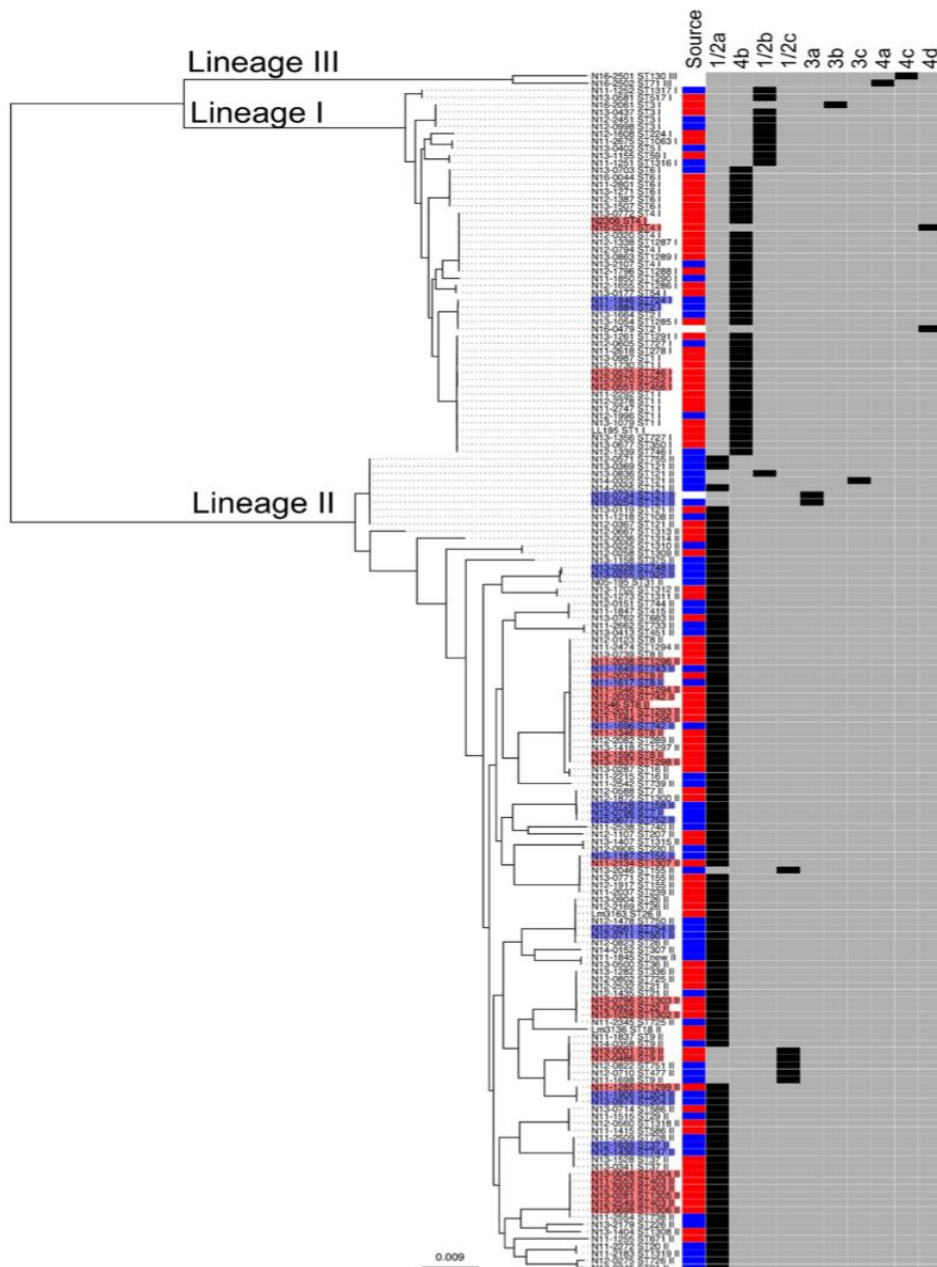
За да се разбере по-добре тази потенциално объркваща структура на популацията, генетичното разнообразие на колекцията е анализирано с помощта на MLST и PopPunk. Това е разкрило тясна връзка между идентифицираните cgMLST подлинни и двата клъстера, определени от MLST, и клъстерите PopPunk. Разликите в подредбите са ясно определени както от разликата cgMLST, така и от SNP, но също така са картографирани перфектно към клъстерите, определени от PopPunk (Lees et al., 2019). Данните показват,

че основните подредби и клъстерите PopPunk съответстват на СС. В линия I СС1 включва 100 изолати (89 от които са ST1), СС2 включва 60 изолати (58 от които са ST2), СС5 включва 56 изолати (55 от които са ST5 и един ST1063), а СС6 включва 111 изолати (110 от които са ST6). Независимо от броя на изолати на огнище (тези с по-малко от 12 СgMLST алелни разлики), има различни нива на разнообразие на SNP в рамките на тези СС/PopPunk клъстери/подлинни.

В 166-те швейцарски изолати, от клинични и хранителни източници, са идентифицирани 15 клъстера от изолати с <12 СgMLST алелни разлики. Известни са девет клинични случая, а шест са предизвикани от групи храни. Два малки клъстера съответно от два и три изолати са от линия I, докато всички останали са картографирани към линия II с три клъстера в СС8. В три случая изолати от човешки и хранителни източници се поставят в един и същ клъстер.



Фиг. 9: Геномно разнообразие в клонални комплекси в линии I и II. По двойки СgMLST и SNP разликите са анализирани за основните клонални комплекси за всяка линия. За линия I разпределението на двойките СgMLST (A) и SNP (B) разликите са показани за клонални комплекси СС1 (червено), СС2 (циан), СС5 (лилаво) и СС6 (зелено). За линия II разпределението на двойките СgMLST (C) и SNP (D) разликите са показани за СС8 (жълто) и СС403 (синьо). СС, показани в панели А – D, са посочени на филогенетичното дърво на генома на ядрото и стрелките показват съответните PopPUNK клъстери (оранжеви и кафяви), нанесени върху първия пръстен (E).



Фиг. 10: Швейцарски *L. monocytogenes* геномно филогенетично дърво. Филогенетично SNP дърво с максимална вероятност е конструирано с помощта на 1596 основни гена с геномни последователности от 166 швейцарски изолати, които са свързани с родовете I, II и III. В топлинната карта вдясно от дървото е показан източникът на изолатите (клинични изолати в червено, хранителни матрици в синьо и други в бяло), а серотипът е посочен (в черно). Изолатите на огнища са в червено, а хранителните взривове в синьо.

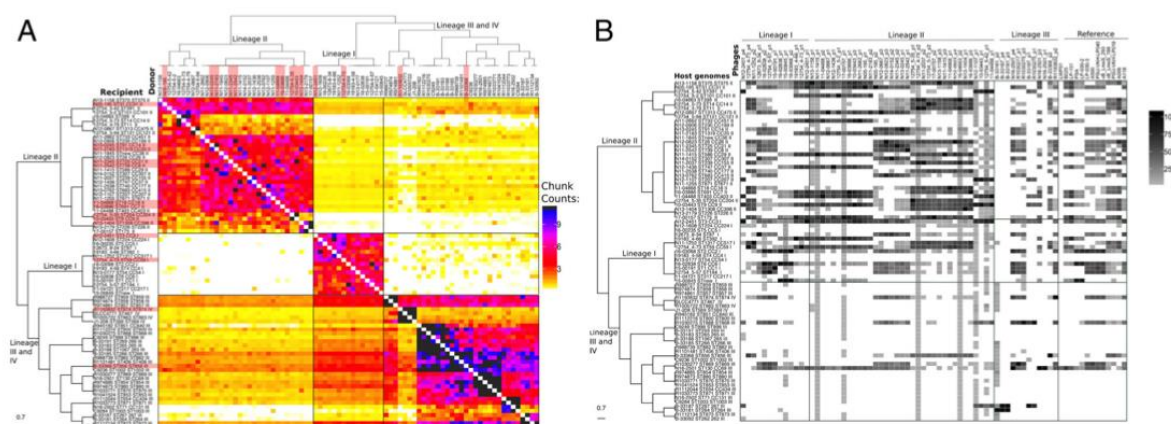
Скоростта на рекомбинация на *L. monocytogenes* е анализирана отделно за линии I, II и III с помощта на *Gubbins* съответно на 371, 336 и 38 изолати. Средната стойност на броя на полиморфизмите, въведени чрез рекомбинация по отношение на мутацията (r/m), и броя на рекомбинации по отношение на полиморфизмите, въведени чрез мутация ($p/0$), се отчитат за вътрешни и крайни линии. Има разлики в средното

съотношение на рекомбинация между вътрешното и външното разклонение за линии I и III, но се счита, че е много по-малко за линия II, с горещи точки за рекомбинация (Kuenne et al., 2013) лесно откриваеми в основния геном. Съобразно данните в тези проучвания рекомбинацията се е случвала по-често в линии II и III, където скоростта r/m е била 40-33 пъти по-висока в сравнение с линия I.

Lineages	Mean r/m^a			Mean ρ/θ^b		
	Internal	Terminal	Total	Internal	Terminal	Total
Lineage I ($n = 371$)	0.0046	0.0091	0.0137	0.0002	0.0013	0.0015
Lineage II ($n = 336$)	0.3146	0.2324	0.5470	0.0149	0.0075	0.0224
Lineage III ($n = 39$)	0.1100	0.3460	0.4559	0.0038	0.0114	0.0151

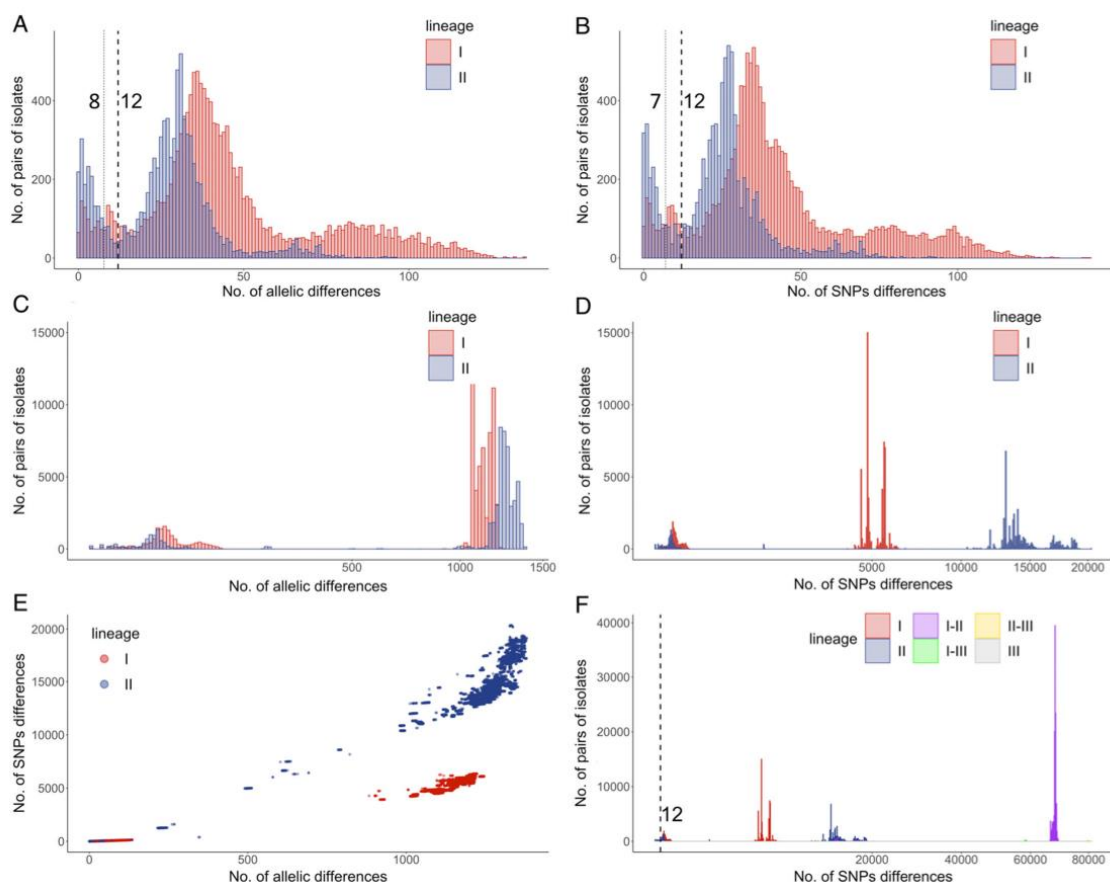
^a r/m is the ratio of base substitutions predicted to have been imported through recombination compared with those occurring through point mutations.

^b ρ/θ (ρ/θ) is the ratio of the number of recombination events to point mutations, a measure of the relative rates of recombination and point mutation.



Фиг. 11: Топлинната карта на матрицата *ChromoPainter* и поява на профаги. Асемблирането на генома от 81 изолата за този анализ съдържа само един изолат за всеки клонален комплекс, включително 15 изолати, принадлежащи към линия I, 33 към линия II, 29 към линия III и 4 към линия IV. Групирането на геномите, наблюдавани в топлинната карта, е направено с помощта на *FineStructure*. Всеки ред на топлинната карта представлява геномите на изолатите.

Характеризирани са също и модели на генния поток и структурата на популацията с помощта на *ChromoPainter* и *fineSTRUCTURE*. Графиките показват очевидни признаци на „генен поток“ между линиите. Налице е висок генетичен обмен от двете линии I и II към линия III.



Фиг. 12: Специфична по рода еволюция на *L. monocytogenes*. По двойки *cgMLST* (A, B) и *SNP* (C, D, F) разликите са анализирани за 708 изолати от Швейцария, Германия и Холандия. Двойният *SNP* анализ, разглеждащ цялата популация (F), включва данни за разлики в рамките на линия I (червено), в рамките на линия II (синьо), в рамките на линия III (сиво) и разликите между родовете I и II (лилаво), между родовете I и III (зелено) и между родовете II и III (жълто).

Хоризонтални генни трансфери чрез трансдукция и трансформация

За да се тества дали бактериофагите са отговорни за хоризонталния трансфер на гени в набора от изолати, са картографирани профагите в набора от секвенирани геноми, като заключението е, че откриването на подобни фагов генетичен материал или фагови частици в геномите на изолатите *L. monocytogenes* може да се смята като „заместител“ на трансфера на ДНК чрез трансдукция. Идентифицирани са 41 непокътнати и 47 изолати с трансдукция от общо 81 *L. monocytogenes* изолати (по един представител за всеки CC), използвайки *PHASTER*. Данните показват, че са налични голяма група фагови гени и в двете линии I и II, както и по-малък брой фагови гени в линия III. Някои геноми, особено по линия II, показват силна хомология с много фагови генетични участъци или фагови остатъци, присъстващи в родове I и II. Фагите от род II показват много по-високи нива на идентичност на последователността до фагите, присъстващи в другите линии. За да се провери въздействието на фагите върху генетичната трансформация, е картографирана честотата на изолиране в гена на регулатора на компетентността в 81-те изолати. Открити са фаг-

прекъснат *comK* ген в 2/15 изолати от род I, 10/33 изолати от род II, 1/29 от род III и 1/4 по линия IV, обаче, нито един от тези геноми не показва никакво отклонение от редукция на ДНК-обмен.

При тестване на генния поток между родословията с помощта на *ChromoPainter* данните ясно показват **корелация между броя на генетичните участъци разменена ДНК и техният размер**. Във всяка от трите линии постъпващата ДНК, произхождаща от едно и също родословие, се открива по-често (по-голям брой участъци генен материал) и в по-голямо количество (размер на генните участъци). От трите линии, **линия III показва най-голям брой събития на рекомбинация**.

Фиг. 13: Анализ на гените за вирулентност при изолатите на *Listeria monocytogenes*:

Strain ID	No. core genes	No. accessory genes	No. unique genes	No. exclusively absent genes	N50	L50	ST ^b	No. genomes in NENT-DB
L28	2497	306	14	1	476,849	3	1	30
L44	2497	357	25	1	476,856	3	1	30
L42	2497	267	56	2	479,292	3	1	30
L128-3	2497	365	60	7	524,722	3	1	30
L174	2497	327	0	1	476,855	3	1	30
L49	2497	264	0	2	478,300	3	4	12
L58	2497	265	0	1	478,305	3	4	12
L105	2497	305	13	4	478,306	3	4	12
L124	2497	328	3	2	541,335	2	4	12
L12	2497	338	3	0	551,226	3	6	56
L164	2497	271	0	5	510,038	2	6	56
L52	2497	291	21	3	476,821	3	2332	0
L41	2497	294	37	3	478,264	3	59	4
L50	2497	246	32	0	609,560	2	7	9
L72	2497	379	10	2	446,908	3	7	9
L36	2497	299	13	3	571,154	2	451	1
L86	2497	352	111	4	582,512	2	91	1
L137	2497	295	0	0	1,490,250	1	29	1
L180	2497	331	43	1	1,489,724	1	29	1
L51	2497	321	0	0	1,497,622	1	37	8
L138	2497	354	12	1	1,530,524	1	37	8
L57	2497	275	0	2	543,302	2	412	4
L111	2497	277	0	0	543,302	2	412	4
L127	2497	276	0	0	526,717	2	412	4
L188	2497	277	0	0	543,302	2	412	4

В тези две обстоятелства проучвания са изследвани също и наличните гени за резистентност на щамовете *Listeria monocytogenes*. **Всички щамове *L. monocytogenes* съдържат четири присъщи гена на резистентност към антибиотици, включително ген на фосфомицин хидролаза *fosX*, гена *lin*, гена за хинолонова резистентност *porB* и гена за резистентност към сулфонамиди *sul*. Гени на кадмиева резистентност *cadA1* и *cadC1* са открити са в щам L86 (CC14). Не са открити гени за резистентност към арсен или бензалкониев хлорид.**

В проучването на водите и околната среда за наличие на *L. monocytogenes* тези патогени са намерени във водни проби, локализиращи в селскостопанска и

неземеделска среда, урбанизирани райони и планински райони до надморска височина 1560 м. По-голямата част (84%) се предполага, че се дължат и на антропогенни фактори. Предишни проучвания показват, че **видовете *Listeria* оцеляват при конвенционалните процеси на пречистване на отпадъчни води и че отпадъците от селскостопанска дейност, производство на храни и от бита са потенциални източници на клинично значими *L. monocytogenes*.**

Разпространението на *L. monocytogenes* в естествените водоизточници може да варира в зависимост от методологията за изпитване, събраните проби от различни матрици и сезона на вземане на проби. Следователно, липсата на периодични извадки и липсата на достатъчно данни биха могли да повлияят на резултатите за разпространението и разнообразието на *L. monocytogenes*. Макар недостатъчните налични данни в тези проучвания, те подчертават **широкото географско разпределение на клинично значимите *L. monocytogenes* в екосистемата, в храните и сред клиничните случаи и най-вече необходимостта от постоянен и задълбочен мониторинг на този патоген в различни матрици и чрез нови модерни молекулярни методи за диагностика. Сред изолатите повечето принадлежат към серотипове и клонални комплекси, съответстващи на тези от огнища на човешка листериоза и спорадични случаи на инфекция при хора и животни. Въпреки ограничения брой изолати в настоящото изследване и различията в методологиите на изследванията, използвани от предишни изследователи, тези резултати от тези по-ранни проучвания подкрепят наблюдението, че популациите *L. monocytogenes* във водната среда съдържат серотипове, които може да причинят листериоза и че водите са още един източник на замърсяване и крият риск от наличието на *L. monocytogenes*. Освен това профилирането на гени на вирулентност разкрива, че всички щамове съдържат непокътнати гени, свързани с инвазивност и инфекция, подчертавайки потенциала на вирулентност и клиничното значение на *L. monocytogenes*.**

Трябва да се отбележи, че е имало липса на гени за резистентност към бензалконий и арсен и много ниско разпространение на гени за резистентност към кадмий сред щамовете в това проучване. Тези детерминанти често се свързват с *L. monocytogenes*, изолирани от храната и от хората, и недостигът им сред изолатите в това проучване може да отразява **специфични адаптации в естествената среда, в съответствие с скорошно проучване, което наблюдава много ниско разпространение на гените за резистентност към кадмий сред *L. monocytogenes* от дивата природа.**

Значителна част (16%) от клонингите принадлежат към СС4, който съдържа LPI-4 и се счита за хипервирулентен въз основа на неговата невровирулентност и способност за плацентарна инфекция. СС4 е силно свързан с човешки изолати и, за разлика от други щамове серотип 4b, досега не е описван в повърхностните води.

По същия начин СС1 и СС6 допринасят главно за човешката листериоза, а през последните години се наблюдава **увеличаване на тежки случаи на листериоза, свързани с *L. monocytogenes* СС6, клонинг, който за първи път е замесен в епидемия в САЩ през 1998-1999 г. и тъй като се разпространява в световен мащаб, причинявайки едно от най-големите огнища на листериоза в Южна Африка през 2017-2018 г., голямо огнище в Германия през 2018-2019 г., локално огнище в Швейцария през 2016 г. (В Швейцария през 2018-2020 г. причини 34 случая и 10 смъртни случая).**

Наличието в повърхностните води на *L. monocytogenes*, принадлежащи към СС, подчертава потенциала на водите като резервоар и разпространител за патогенни *L. monocytogenes*. По-специално, използването на речна вода за напояване на културите през сухите сезони може да позволи на *L. monocytogenes* във водата да навлезе в хранителната верига. Напояването многократно е било свързано с повишен риск от замърсяване на продуктите преди прибиране на реколтата с *L. monocytogenes*, особено ако водата за напояване се черпи от повърхностни води. Освен това напояването в рамките на три дни след прибиране на реколтата се свързва с *L. monocytogenes* в производствената среда. Следователно речната вода за напояване може да крие риск за общественото здраве, ако замърсеният продукт се консумира суров.

По същия начин, пробите от повърхностни води в това проучване съдържат специфични СС, които според докладваните данни са причинили листериоза при говеда, като *L. monocytogenes* СС1, СС4 и СС412 са сред **най-честите причини за енцефалит на преживните животни** в Централна Европа. Тези СС също често се откриват в **околната среда и във фуражи, поилки, изпражнения и при преживни животни**. Понастоящем пътищата на въвеждане на тези СС във фермерската среда не са добре разбрани, въпреки че **разваленият силаж се счита за основен източник**. Появата на *L. monocytogenes* в реките, докладвана в това проучване, сочи, че повърхностните води биха могли да бъдат възможен източник на **клонинги, причиняващи болести при говеда**. По-специално, използването на речна вода за напояване на едър рогат добитък може да представлява възможно излагане на говежди патогенни *L. monocytogenes*.

Съвсем наскоро излезналото проучване на тема: „*Prevalence and Genetic Diversity of Listeria monocytogenes Isolated From Retail Pork in Wuhan, China*“ на авторски колектив *Yiqian Wang, Qiang Ji, Shaowen Li, Mei Liu* е **още едно доказателство за високата циркулация на *Listeria monocytogenes*, генетичното разнообразие на линиите изолати от свинско месо и високото разпространение на този инвазивен патоген** в така нашумелия от 2019г. насам град Ухан в Китай.

Както стана ясно и от предходните проучвания *Listeria monocytogenes* е **повсеместно разпространена бактерия и причинител на зоонозна листериоза с висока смъртност**. Консумацията на замърсени храни, от животински произход, е свързана както с епидемична, така и със спорадична листериоза. В това проучване от март 2021г. са идентифицирани **общо 64 изолати на *L. monocytogenes* от 259 проби от свинско месо, продавани в 11 вериги супермаркети**, които са характеризирани със сравнителен анализ на целия геном. **Всички изолати са очертани в осем клонални комплекса (СС), а именно СС2, СС8, СС9, СС11, СС155, СС121, СС204 и СС619, обхващащи две линии (I и II) и носещи 35 антибиотично устойчиви гена (fosX, LNU, MPRF, tetM и DHFR)**. Следва да се отбележи, че **островите на патогенността на *Listeria* (LIP1)-1, LIP1-3 и LIP1-4 са разпределени във всички изолати ST619** от две вериги супермаркети, които са тясно свързани с клинични изолати (<40 SNP). Някои от изолатите от различни вериги супермаркети с разлика от 0 SNP показват общ източник на снабдяване със свинско месо. По-специално, **57,81 % от щамове тип IB, IIA или IIIB пренасят CRISPR-Cas система, СС121 изолати пренасят и двата вида IB и IIA CRISPR-Cas системи, Cas протеини на СС155 изолати, разположени между два**

CRISPR локуси, всеки СС има уникална организация на Cas протеини, както и CRISPR локуси. Системата CRISPR-Cas спомага диференциацията на изолати *L. monocytogenes*, получени от свинско месо. Сравненията на нивото на генома са допринесли за разбирането на генетичните различия и вариации между изолатите и са предоставили информация за генетичния състав и сродството на тези патогени.

Разбирането на разпространението на *L. monocytogenes* в свинското месо може да предостави основни данни за оценка на риска от заразяване на човека с *Listeria*. В повечето държави са проведени проучвания на замърсяването на свинското месо с *L. monocytogenes*. В Европейския съюз през 2018 г. *L. monocytogenes* в свинското месо е открит в 1,3 % от 24 814 изследвани единици и в 0,8 % (11 от общо 1365) от изследваните проби при търговията на дребно (ЕОБХ и ECDC, 2019 г.). В Южна Африка наличието на *L. monocytogenes* е по-високо в свинското месо (13,3 %; 18/135) през 2014-2016г. (Matle et al., 2019). В Мексико *L. monocytogenes* присъства в 16/79 (20,3 %) проби от свинско месо, събрани от кланици в периода 2014-2015 г. (Figueroa-Lopez et al., 2019). В Китай през последните години са докладвани случаи на замърсяване с *L. monocytogenes* в сурово свинско месо на дребно (11,68 - 30%), охладено свинско месо (11 - 55 %) и свинско месо RTE (4,6 - 13,5%) (Yin et al., 2015; Li et al., 2018; Chen et al., 2019; Zhang et al., 2019). Свинското месо е най-често консумираното месо в Китай, а в Европа, основният консуматорски навик е месото да се приема варено или сготвено. Като се има предвид, че с промяната на начина на живот честотата на консумация на храни с ниско потребление се увеличава, замърсяването на свинското месо (4,61 - 13,5%) се предполага, че се осъществява чрез кръстосано замърсяване в процеса на приготвяне на храна, което увеличава риска от заразяване за хората.

Listeria monocytogenes е силно разнороден вид; структурата на популацията му е разделена на 14 серотипа (Yin et al., 2019) и четири филогенетични линии (I, II, III и IV) (Orsiet al., 2011), които са класифицирани в множество клонални комплекси (СС) въз основа на MLST) (Ragon et al., 2008). В западните страни СС (1-6) от линия I са основните типове, отговорни за епидемиите при хората. Освен това СС8, СС9, СС121 и СС155 от линия II са основните причинители на листериозата при човека; въпреки това тяхната честота на докладване е по-ниска от тази на изолати от линия I, които причиняват предимно спорадична листериоза (Chenal-Francisque et al., 2011; Chen et al., 2016; Maury et al., 2016). В Китай епидемиите от листериоза се различават от тези в други държави; рядко се съобщава за огнища, а спорадичните случаи са по-чести, което може да се дължи на някои връзки и генетичен обмен между преобладаващите клонинги СС87, СС8 и СС9 в храните (Li et al., 2019; Yin et al., 2019; Zhang et al., 2019). По-специално, в предишни проучвания се съобщава за циркулацията на типичния *L. monocytogenes* СС87 клонинг в храните и при клиничните случаи (Wang et al., 2019; Yin et al., 2020). *L. monocytogenes* е постоянно променящ се вид. Динамичните епидемиологични изследвания са особено необходими, за да се разберат генетичните различия и структури на свързаните с тях вирулентни гени, резистентни към антибиотици гени и хоризонтални движещи се генни елементи, както и наличието на системата CRISPR-Cas.

Град Ухан в провинция Хубей има 14 милиона жители, които най-често консумират свинско месо в диетата си. Въпреки че хората постепенно обръщат повече внимание на безопасността на храните, данните от подобни епидемиологични проучвания са недостатъчни. В настоящото проучване са извършени геномни анализи за генетично разнообразие, вирулентност, антибиотична резистентност и CRISPR-Cas системи на изолати *L. monocytogenes*. Тези изследвания се очаква да бъдат от полза за разбирането на разпространението и характеризирането на замърсяването с *Listeria* в търговията на дребно и едро със свинско месо и живи животни от и в Китай и ЕС, което е необходимо за ефективното решаване на проблемите, свързани с храните от животински произход, и за гарантиране на безопасността от фермата до трапезата.

TABLE 1 | Details of *L. monocytogenes* strains isolated from pork in Wuhan.

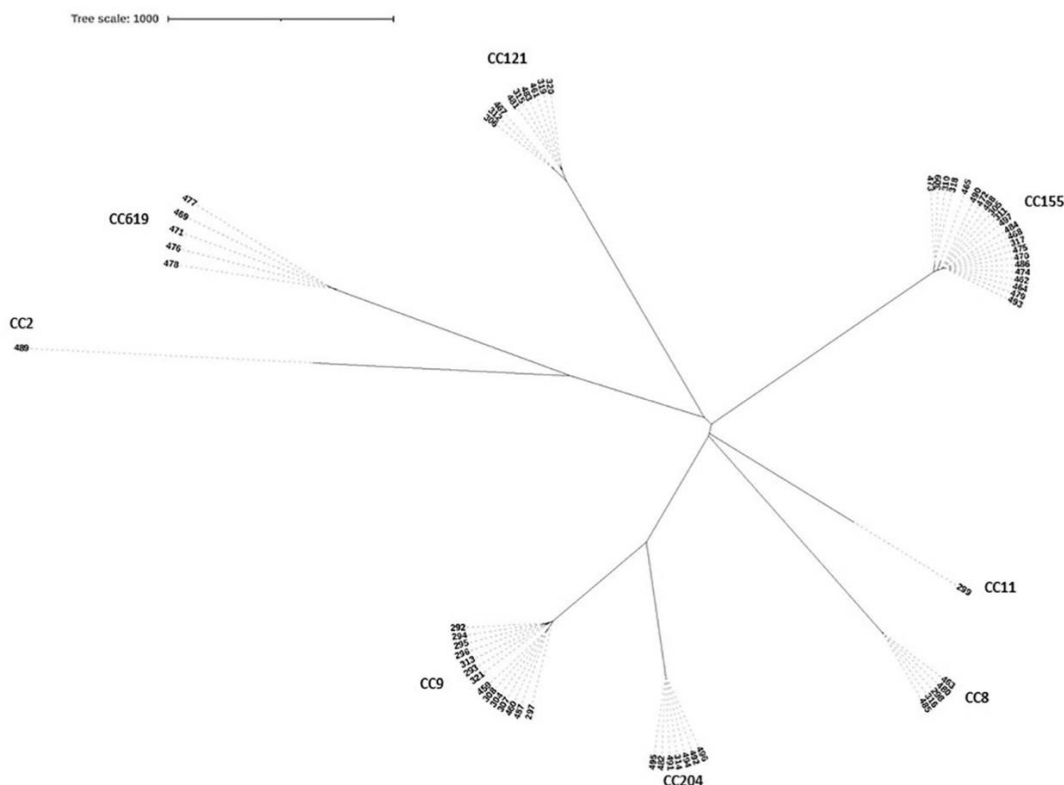
Strain	Serotype	ST	Clonal cluster	Slaughterhouse	Supermarket	District	Collection time	Accession number
292	1/2c	9	CC9	D	Z1	Hanyang	01-18-2019	ERS5455033
293	1/2a	9	CC9	J	S1	Wuchang	01-18-2019	ERS5455034
295	1/2c	9	CC9	E	Z1	Hanyang	01-18-2019	ERS5455035
296	1/2c	9	CC9	F	Y	Hanyang	01-18-2019	ERS5455036
297	1/2c	9	CC9	F	Y	Hanyang	01-18-2019	ERS5455037
298	1/2a	8	CC8	F	Y	Hanyang	01-18-2019	ERS5455038
299	1/2a	11	CC11	G	Y	Hanyang	01-18-2019	ERS5455039
304	1/2c	9	CC9	G	Y	Hanyang	01-18-2019	ERS5455040
305	1/2a	155	CC155	A	Y	Hanyang	01-18-2019	ERS5455041
306	1/2a	121	CC121	G	W1	Hanyang	01-18-2019	ERS5455042
307	1/2c	9	CC9	G	W1	Hanyang	01-18-2019	ERS5455043
308	1/2c	9	CC9	G	H	Hanyang	01-18-2019	ERS5455044
309	1/2a	155	CC155	G	H	Hanyang	01-18-2019	ERS5455045
310	1/2a	155	CC155	G	H	Hanyang	01-18-2019	ERS5455046
311	1/2a	155	CC155	H	L1	Hanyang	01-18-2019	ERS5455047
312	1/2a	121	CC121	A	W2	Hankou	01-18-2019	ERS5455048
313	1/2c	9	CC9	A	W2	Hankou	01-18-2019	ERS5455049
314	1/2a	204	CC121	B	W2	Hankou	01-18-2019	ERS5455050
315	1/2a	121	CC121	C	M	Hankou	01-18-2019	ERS5455051
316	1/2a	8	CC8	D	L2	Wuchang	01-18-2019	ERS5455052
317	1/2a	155	CC155	A	Z2	Wuchang	01-18-2019	ERS5455053
318	1/2a	155	CC155	I	S1	Wuchang	01-18-2019	ERS5455054
319	1/2a	121	CC121	K	J1	Wuchang	01-18-2019	ERS5455055
320	1/2a	121	CC121	L	P1	Wuchang	01-18-2019	ERS5455056
321	1/2c	9	CC9	A	P1	Wuchang	01-18-2019	ERS5455057
459	1/2c	9	CC9	E	Z3	Hanyang	08-18-2019	ERS5455058
460	1/2c	9	CC9	E	Z3	Hanyang	08-18-2019	ERS5455059
461	1/2a	121	CC121	E	Z3	Hanyang	08-18-2019	ERS5455060
462	1/2a	155	CC155	M	Z3	Hanyang	08-18-2019	ERS5455061
463	1/2a	8	CC8	M	Z3	Hanyang	08-18-2019	ERS5455062
464	1/2a	155	CC155	M	Z3	Hanyang	08-18-2019	ERS5455063
465	1/2a	155	CC155	D	Z3	Hanyang	08-18-2019	ERS5455064
467	1/2a	121	CC121	D	Z3	Hanyang	08-18-2019	ERS5455065
468	1/2a	155	CC155	B	W3	Hanyang	08-18-2019	ERS5455066
469	1/2b	619	CC619	B	W3	Hanyang	08-18-2019	ERS5455067
470	1/2a	155	CC155	B	W3	Hanyang	08-18-2019	ERS5455068
471	1/2b	619	CC619	B	J2	Hanyang	08-18-2019	ERS5455069
472	1/2a	155	CC155	A	J2	Hanyang	08-18-2019	ERS5455070
473	1/2a	155	CC155	A	J2	Hanyang	08-18-2019	ERS5455071
474	1/2a	155	CC155	K	J2	Hanyang	08-18-2019	ERS5455072
475	1/2a	155	CC155	K	J2	Hanyang	08-18-2019	ERS5455073
476	1/2b	619	CC619	N	J2	Hanyang	08-18-2019	ERS5455074
477	1/2b	619	CC619	N	J2	Hanyang	08-18-2019	ERS5455075
478	1/2b	619	CC619	N	J2	Hanyang	08-18-2019	ERS5455076
479	1/2a	155	CC155	G	W4	Hanyang	08-18-2019	ERS5455077
480	1/2a	8	CC8	G	W4	Hanyang	08-18-2019	ERS5455078
481	1/2a	121	CC121	A	W4	Hanyang	08-18-2019	ERS5455079
482	1/2a	204	CC121	A	W4	Hanyang	08-18-2019	ERS5455080
483	1/2a	121	CC121	A	W4	Hanyang	08-18-2019	ERS5455081
484	1/2a	155	CC155	A	W4	Hanyang	08-18-2019	ERS5455082
485	1/2a	8	CC8	F	D	Hankou	08-18-2019	ERS5455083
486	1/2a	155	CC155	F	D	Hankou	08-18-2019	ERS5455084
487	1/2c	9	CC9	A	D	Hankou	08-18-2019	ERS5455085

Strain	Serotype	ST	Clonal cluster	Slaughterhouse	Supermarket	District	Collection time	Accession number
488	1/2a	155	CC155	I	D	Hankou	08-18-2019	ERS5455086
489	1/2b	2	CC2	I	D	Hankou	08-18-2019	ERS5455087
490	1/2a	155	CC155	B	W5	Hanyang	08-18-2019	ERS5455088
491	1/2a	204	CC121	B	W5	Hanyang	08-18-2019	ERS5455089
492	1/2a	204	CC121	A	W5	Hanyang	08-18-2019	ERS5455090
493	1/2a	155	CC155	A	W5	Hanyang	08-18-2019	ERS5455091
494	1/2a	204	CC121	J	W5	Hanyang	08-18-2019	ERS5455092
495	1/2a	204	CC121	J	W5	Hanyang	08-18-2019	ERS5455093
496	1/2a	204	CC121	G	W5	Hanyang	08-18-2019	ERS5455094
497	1/2a	155	CC155	G	W5	Hanyang	08-18-2019	ERS5455095

Фиг. 14: Детайлна таблица на изолатите *L. Monocytogenes* от Китай в свинско месо, клоналните комплекси и серотиповете на изолатите

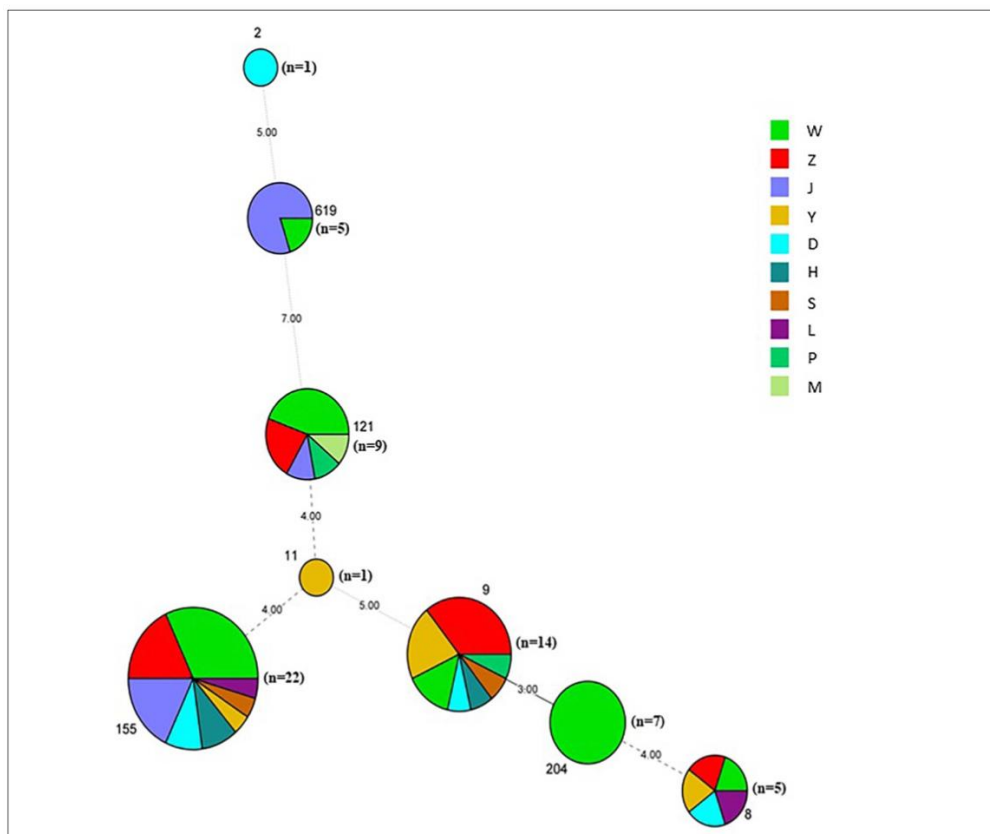
Общо 64 *L. monocytogenes* щамове са изолирани от 259 проби от свинско месо (24,71%) в 53 супермаркета, принадлежащи към 11 вериги супермаркети, които са доставени от 14 кланици (64 изолати се състоят от серотипове 1/2a, 1/2b и 1/2c, принадлежащи към осемте ST (2, 8, 9, 11, 121, 155, 204 и 619), като преобладаващите ST са ST155, ST121 и ST9).

Характеристиките на високата диференциация на **cgMLST** се основават на **1748 основни гена**. Всички получени изолати са класифицирани в осем клонални комплекса CC, CC8, CC9, CC121, CC155, CC204, CC619, CC2 и CC11. Анализът **cgMLST** може да отразява генетичното разнообразие и връзката, има висока диференциация и проследимост и е **моцнен инструмент за подобряване на мониторинга и наблюдението**.



Фиг. 15: Neighbor-joining филогенетично дърво на изолати *L. monocytogenes*, както е определено от **cgMLST** въз основа на 1748 основни гена. Съседното дърво, което се свързва, показва родството на изолатите от 64 *L. monocytogenes*, всеки клъстер съответства на специфичен CC.

Филогенетичното дърво е изградено съобразно поредица от резистентни към антибиотици гени. Всичките 64 изолати са групирани в две клона: всички щамове 1/2b (ST 2, 619) принадлежат към клон В, а щамове 1/2a и 1/2c (ST 8, 9, 11, 121, 155 и 204) са част от клон А. Щамове, принадлежащи към клон А, са допълнително класифицирани в два клона, включващи различни ST изолати. Интересното е, че всеки щам на ST е групиран в една и съща група и съдържа същите резистентни към антибиотици гени.

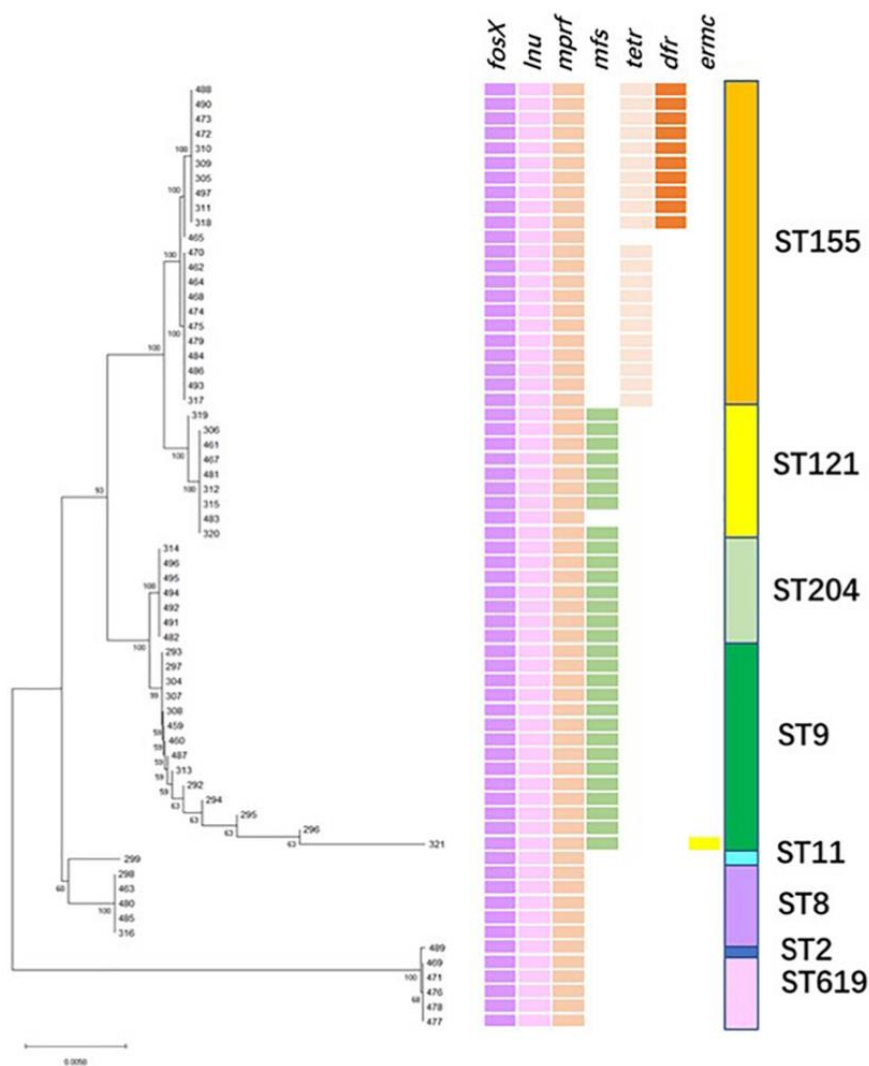


Фиг. 16: Филогенетично дърво на 64 изолати *L. monocytogenes*, както е определено от MLST въз основа на 1748 основни гена. Всяко кръгче представлява ST.

Важно е да се отбележи, че **резистентни към фосфомицин гени fosX, резистентен ген LNU към линкозамид и множествен пептиден резистентен ген mprF са присъствали във всички изолати.** Освен това ST204, ST121 и ST9 (с изключение на изолат Lm483) **щамове крият друг ген за резистентност mfs.** Щамове ST155 са разделени на две групи, с изключение на трите антибиотично-резистентни гена, споменати по-горе, **едната група пренася гена за тетрациклинова резистентност (tetM), а другата пренася tetM и генно кодирана дихидрофолат редуктаза (DHFR),** като в това проучване за първият е докладван изолат, носещ DHFR. Изолати с висока резистентност към фосфомицин са докладвани в различни държави (Harakeh et al., 2009; Hasegawa et al., 2013). По-специално, Scortti et al. (2006, 2018) са установили в проучването си, че **повечето щамове на L. monocytogenes са чувствителни на фосфомицин in vitro-in vivo,** като епистатичното взаимодействие между гените за вирулентност и резистентност контролира бактериалната

чувствителност към фосфомицин *in vivo*. Генът за антимикробна резистентност *mprF*, който присъства изключително в СС1, СС8 и СС121, е докладван при клинични и хранителни изолати (Zuber *et al.*, 2019). Moreno *et al.* (2014) в своето проучване е докладвал, че изолати от кланици, свинско трупно месо и изолати от човешки инфекции съдържат гена за резистентност *mprF*. Като се имат предвид сложните характеристики на присъщата и придобита антибиотична резистентност, е важно да се определи антибиотичният фенотип и механизмът на тези изолати.

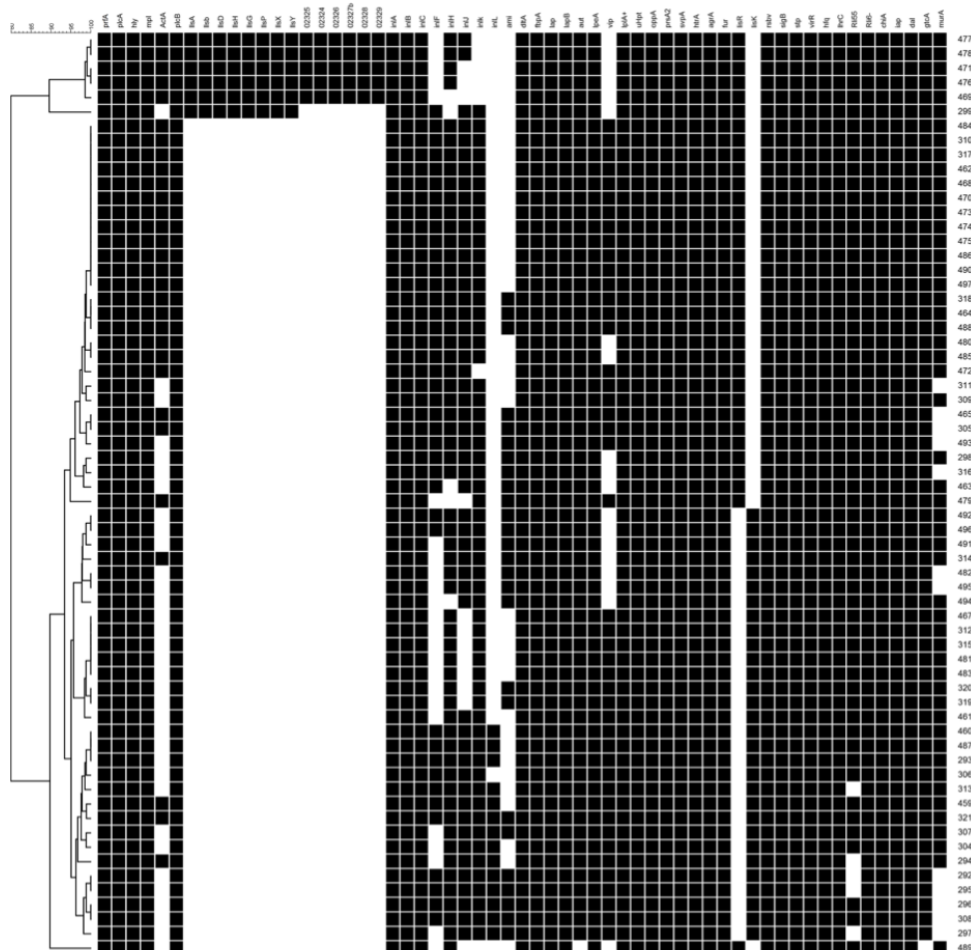
Фиг. 17: Наличие на *LIP1-1*, *LIP1-3* и *LIP1-4* в *Listeria* изолатите. Профили на гените за резистентност



В това проучване общо 64-те *L. monocytogenes* щамове, обхващат линии I и II. Пропорциите на тези изолати в рамките на линии I и II са съответно 90, 6 и 9,4 %.

LIP1-1 е намерен във всички изолати и нито един от изолати не съдържа **LIP1-2**; **LIP1-3** е открит във всички изолати **ST619** и **ST2**, принадлежащи към линия II, а **LIP1-4** е разпределен само в **ST619** изолати.

За да се изследва потенциалът за вирулентност на 64-те изолата, е извършено *in silico* откриване на 91 вирулентни и свързани с вирулентността гени. Наблюдава се в резултатите, че вирулентните и свързаните с вирулентността гени са широко разпространени и в 64-те изолата, особено в щамовете ST619, което показва висока вирулентност и потенциален висок риск за хората.



Фиг. 18: Профили на вирулентност на 64-те изолата *L. monocytogenes*

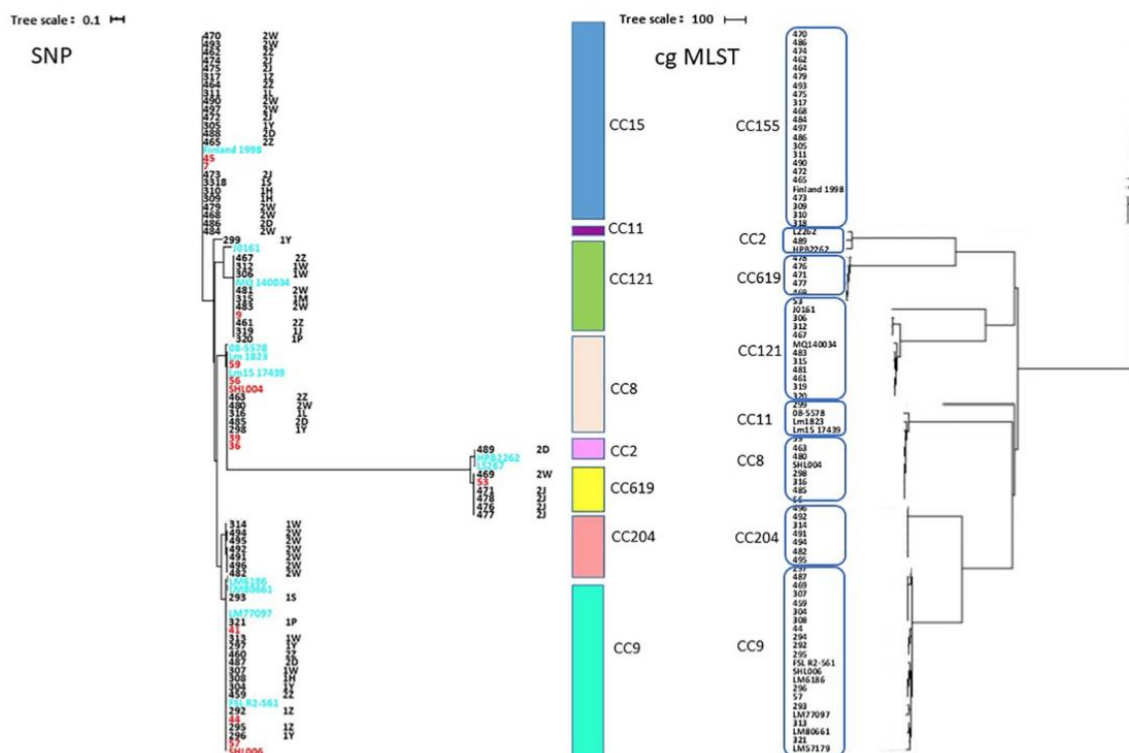
Филогенетична връзка на изолати от множество вериги за доставки

SNP на всеки изолат е получен като са сравнявани с щама *EGDe*, 8 клъстера, включващи 8 CC, са в съответствие с филогенетичното дърво, като е използван cgMLST. Част от изолатите от различните вериги супермаркети показват висока генетична прилика (0-50 разлики в SNP). Тъй като свинското месо от тези три вериги супермаркети е доставяно от една и съща кланица А, то се предполага, че замърсяването на свинското месо вероятно е било получено от една и съща производствена верига, което навежда отново вниманието на спазването на добри хигиенни практики в производството и засилване на мониторинга и вземане на проби от първичното производство. Разнообразието на щамовете, изменчивостта им и постоянния генен трансфер, вероятно също се дължи и на сложната верига за доставки на храни. Важно е да се отбележи, че специфични ST изолати като ST8 от това проучване показват висока

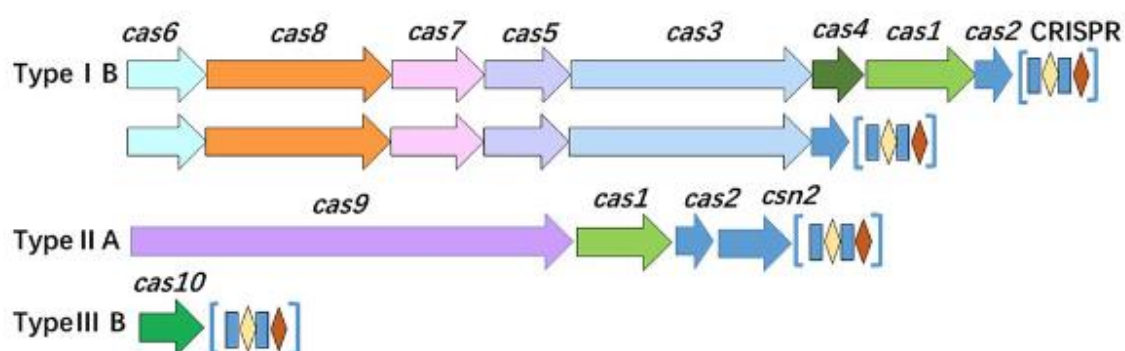
генетична прилика (<21 SNP разлики) с клинични изолати Lm 1823 и SHL004. Това представлява проблем и висок риск за общественото здраве поради потенциала на тези патогени да се прехвърлят на хората по хранителната верига.

Базирано на системата CRISPR-Cas субтипизиране, допринасящо за подобряване на диференциацията на изолатите

Анализът на изолатите показва **наличието на CRISPR-Cas в повечето изолати (37/64, 57,81 %)**. Въз основа на броя и разнообразието на системата CRISPR-Cas, тези изолати са разделени на два класа (класове 1 и 2) и три вида (типове IB, IIA и IIIB). Сред 8 ST, само **ST121, ST155 и ST619** изолатите имат пълна CRISPR-Cas система. Интересното е, че всички щамове ST121, пренасяни и от двата вида IB и IIA CRISPR-Cas системи, и CRISPR локуси на изолати ST155 са съществували както в началото, така и надолу по веригата на Cas протеини. Други ST пренасят само Cas10 протеин или един до четири Cas3 протеина. Изолати **ST9** съдържат или **Cas10** или **Cas3** протеини. Както бе споменато по-горе, установено е, че **генотиповете на системата CRISPR-Cas са свързани с ST**. Разнообразието на системата CRISPR-Cas показва ролята на различните функции в съответните щамове, които вероятно са свързани с различни ST, срещани в различни среди. Интересното е, че **13 двойки от изолати (0 SNP разлика) са неразличими по SNP субтипизирането, но тези изолати могат да бъдат диференцирани чрез CRISPR-Cas субтипизиране**. Например е установено, че три щамове с 0-SNP-разлики, изолирани от една и съща верига супермаркети, носят различни спейсъри на CRISPR. Накратко, тези резултати потвърждават, че **организацията на системата CRISPR-Cas показва генетично разнообразие на изолати, като по този начин отразява по-високата способност за диференциация на щамовете**.



Фиг. 19: Филогенетични дървета от 64 изолата и 20 клинични изолата, конструирани от SNPs и cgMLST. (Вляво) SNP бяха идентифицирани чрез SNPhylo, използвайки EDGe като референтен щам. Щамовете, маркирани със светло син цвят, са чужди клинични изолати. Щамовете, маркирани с червен цвят, са клинични изолати от Китай. Дясната колона показва СС, съответстващи на клоните на филогенетичното дърво. Думите след имената на изолатите са времената на изолация и веригите супермаркети. „1“ представлява щамовете, изолирани през януари 2019 г. „2“ представлява щамовете, изолирани през август 2019 г. Отдалеченото дърво на щамове *L. Monocytogenes* е определено чрез cgMLST въз основа на 1748 основни гена. Дървото показва родството на 64 *L. Monocytogenes* изолати с 20 клинични изолати, всеки син кръг представлява един специфичен СС.



Фиг. 20: Разпределение на CRISPR-Cas системите сред изолатите

Заклучение:

Listeria monocytogenes е сериозен хранителен патоген и представлява значителна заплаха за общественото здраве. Като основна причина за появата на огнища на листериоза се счита замърсената храна от животински произход, както и повърхностните води (de Valk et al., 2001; Choi et al., 2014). Този патоген с доказателства за зоонотично предаване причинява световна икономическа и здравна тежест (Halbedelet al., 2020; Thomas et al., 2020). Поради това подобряването на откриването на бактериално замърсяване на свинското, говеждото и птичето месо е ефективна мярка за предотвратяване на листериозата при хората.

Секвенирането на генома постепенно се използва за разкриване на подробните характеристики на типизирането, вирулентните и антибиотичните резистентни гени и се е превърнало в полезен инструмент за изследване и за подкрепа на общественото здраве (Halbedel et al., 2018; Allard et al., 2019). CgMLST и SNP имат предимството на висока диференциация и специфичност и се използват широко в диагностиката и епидемиологията, в хуманната и ветеринарна медицина (Hurley et al., 2019; Jagadeesan et al., 2019; Rivas et al., 2019; Papic et al., 2020). На този етап от развитието на биотехнологиите подтипизирането на CRISPR рядко се използва за молекулярни изследвания на епидемии, причинени от *Listeria*. В настоящото проучване, основано на изолати от сурово свинско месо в Китай, WGS е приложен за получаване на информация за cgMLST, SNP и системата CRISPR-Cas.

Същите кълъстери са класифицирани от cgMLST или SNP. Наблюдава се, че **изолати от клинични спорадични случаи и случаи на огнище могат да бъдат групирани заедно със свинските изолати, получени в това проучване, тъй като те имат близки връзки, което е отразено в разликите в SNP.** Освен това резултатите сочат, че **изолатите от свинско месо са потенциален висок риск за причиняване на листериоза при човека по цялата хранителна верига.**

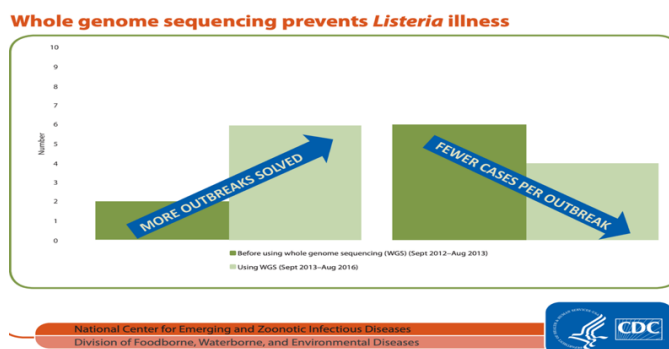
CRISPR-Cas системите са адаптивни системи за имунна защита в много прокариотни микроорганизми; те придават защитни механизми срещу хоризонтални генни трансферни елементи и вариации при различните видове (Marraffini, 2015; Koonin et al., 2017). За някои видове патогени са използвани базирани на CRISPR приложения за определяне на генотипа, в случая на *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium* (Xie et al., 2019). Прилагането му по отношение на *L. monocytogenes* обаче е ограничено поради трудности при изолирането на структурите на CRISPR от *Listeria* генотипа, по-специално при щамовете от линия I (Di et al., 2014). **RliB-CRISPR е повсеместно разпределен сред генома на изолати *Listeria* (Sesto et al., 2014).** Taylor and Stasiewicz (2019) са посочили, че **подтипизирането на CRISPR не може да подобри диференциацията на устойчивите и спорадичните щамове на *L. monocytogenes*.** Чрез анализ на организацията на Cas протеините и подредането на CRISPR локуси на изолати, е установено, че **типове IB, IIА и IIIВ показват своите уникални вариации в Cas протеини и спейсъри, и има забележителни характеристики на Cas3 протеини и CRISPR в други щамове.** Важно е да се отбележи, че **щамовете на *L. monocytogenes* с тясна еволюционна връзка са неразличими по SNP субтипизиране, но те биха могли да бъдат подходящо разграничени чрез CRISPR субтипизиране.** Нашите резултати показват, че **съчетаването на организацията на Cas протеини и CRISPR локуси може да бъде допълнителна мярка за диференциация на генетично близките „неразличими“ щамове, които крият CRISPR.** Системата CRISPR-Cas играе множество роли отвъд адаптивния имунитет, т.е. **генно регулиране и вирулентност (Fure et al., 2019).** Разбирането на структурата и функцията на системата CRISPR-Cas допринася за разработването на полезни технологии и продукти за контрол на патогена, т.е. включвайки фагите, които инвазират *Listeria* предлагат нови инструменти за откриване, диференциация, подпомагано от CRISPR-Cas фагово инженерство, диагностика и биоконтрол (Hagensu Loessner, 2014; Hupfeld et al., 2018; Meile et al., 2020).

Listeria monocytogenes, носещи различни фактори на вирулентност, са със силно разнородни разпределения между СС и линиите (Tavares et al., 2020).

Четирите известни патогенни острова на *Listeria* играят жизненоважна роля за оцеляването и инфекцията на *L. monocytogenes* при гостоприемници, които са описани главно за линия I (LPI-1, -3 и -4) и подлиния II (LPI-1 и LPI-2). Maury et al. (2016) установява, че **СС1, СС6, СС4 и СС2, принадлежащи към линия I, са доминиращите СС, причиняващи листериоза в западните държави, особено СС4, носещи както LPI-1, така и 4 придава хипервирулентност чрез засилване на инвазията в ЦНС и плацентата.** Като има предвид, че **спорадичната листериоза е основната характеристика на клиничните случаи, регистрирани в Китай, а в**

клиничните случаи при хора са налице СС -87, -8, -9, -121, -155 и -619), СС87 изолати, носещи LPI-1, -3 и -4 са един от най-разпространените хипервирулентни СС в клиничните изолати (Liet *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). СС619 изолати, носещи LPI-1, -3 и -4, принадлежащи към линия II, са изолирани от различни вериги супермаркети, които имат тясна еволюционна връзка с клинични ST619 изолати (50 SNP разлики), което предполага, че те крият висок риск да причинят листериоза по цялата верига за производство на храни. По този начин изолатите на СС, наблюдавани в това проучване, предполагат, че макар появата на предполагаеми хипервирулентни изолати да не е висока, всички изолати, свързани с веригата за производство на свинско месо, биха могли да имат значителни последици за общественото здраве.

В това проучване WGS е приложена като инструмент за изследване за откриване на замърсяване с *L. monocytogenes* в сурово свинско месо, продавано в супермаркетите. Специфичните системи CRISPR-Cas допринасят за подобряване на диференциацията на генетично близките „неразличими“ щамове. Някои вериги супермаркети имат различни канали за доставка, което води до разнообразие на изолати. Множество стопанства, ферми и въдства, доставящи животни в една и съща кланица, вероятно са причина за изобилното разнообразие на щамове, изолирани от едни и същи търговски вериги или търговци на дребно. Важно е да се отбележи, че съществува тясна еволюционна връзка в изолатите от свинското месо, продавано в различни вериги супермаркети и доставяно от една и съща кланица, което още веднъж затвърждава, че *L. monocytogenes* се разпространява по веригата за производство на храни от началните етапи в производството до крайните етапи на приготвяне и консумиране на тези храни (по цялата агрохранителна верига). Генетичните прилики между изолати от различни вериги супермаркети предполагат значението и необходимостта от проследяване и откриване на източниците на доставки на месо както на равнище кланица, така и на равнище стопанство. Високата степен на изолиране на този патоген от замърсено свинско месо, означава спешната необходимост от укрепване на системите за наблюдение и мониторинг на този патоген.



Selected Multistate Outbreaks

2021	<ul style="list-style-type: none">• Fully Cooked Chicken - Listeriosis• Queso Fresco - Listeriosis	<ul style="list-style-type: none">• Packaged Salads - Listeriosis
2020	<ul style="list-style-type: none">• Deli Meats - Listeriosis• Enoki Mushrooms - Listeriosis	<ul style="list-style-type: none">• Soft Cheeses - Listeriosis• Ice Cream - Listeriosis
2019	<ul style="list-style-type: none">• Hard-boiled Eggs - Listeriosis• Listeria monocytogenes Infections• Deli-Sliced Meats and Cheeses - Listeriosis	<ul style="list-style-type: none">• Commercially Produced, Prepackaged Caramel Apples - Listeriosis• Bean Sprouts - Listeriosis• Cheese - Listeriosis• Dairy Products - Listeriosis
2018	<ul style="list-style-type: none">• Pork Products - Listeriosis• Deli Ham - Listeriosis	<ul style="list-style-type: none">• Cheese - Listeriosis
2017	<ul style="list-style-type: none">• Vulto Creamery Soft Raw Milk Cheese - Listeriosis	<ul style="list-style-type: none">• Ricotta Salata Cheese - Listeriosis
2016	<ul style="list-style-type: none">• Frozen Vegetables - Listeriosis• Raw Milk - Listeriosis	<ul style="list-style-type: none">• Cantaloupes - Listeriosis

Фиг. 21: По данни на CDC - някои от огнищата на *L. Monocytogenes* в различни хранителни матрици

Проучванията на водите показват, че *L. monocytogenes*, циркулиращи във водната среда, принадлежат към СС и съдържат същите черти на вирулентност като *L. monocytogenes*, които често са изолирани от клинични случаи при хора и животни и от глобално възникващи огнища, включително хипервирулентни клонове СС1, СС4 и СС6.

Тези всички данни от проучванията допринасят за по-доброто разбиране на разнообразието на *L. monocytogenes*, генното разнообразие, изменчивостта на този патогенен причинител и адаптивността му в различни матрици. Резултатите от такива проучвания биха послужили, за да предоставят информация за подобряване на стратегиите от фермата до трапезата, подобряване на хигиенните практики в производствата, подобряване на здравето и благосъстоянието на хора и животни.

В заключение, данните показват значителни разлики в еволюцията на четирите линии на *L. monocytogenes*, с разлики в скоростта на рекомбинация и потока на основните генни последователности. Освен това констатацията, че фагите предполагат обратна връзка с основния геномен генен поток показва, че трансформацията, а не трансдукцията е най-вероятният механизъм за еволюцията на основния геном. От епидемиологична гледна точка, трябва да се внедрят час по-скоро новите молекулярни методи в диагностиката на *L. Monocytogenes*, да се подобри мониторинга и да се повиши обществената осведоменост за този патологичен причинител, пренасян чрез храни и води.

Изготвил:

Красимира Захариева,

Главен експерт в дирекция ОРХВ

Използвана литература:

- *Prevalence, Antibiogram and Genetic Characterization of Listeria monocytogenes from Food Products in Egypt* - Eman E. Abdeen, Walid S. Mousa, Ola. H. Harb, Gehad A. Fath-Elbab, Mohammed Nooruzzaman, Ahmed Gaber, Walaa F. Alsanie and Ahmed Abdeen
- *Environmental dissemination of pathogenic Listeria monocytogenes in flowing surface waters in Switzerland* - Susanne Raschle, Roger Stephan, Marc J. A. Stevens, Nicole Cernela, Katrin Zurfluh, Francis Muchaamba & Magdalena Nüesch-Inderbinen
- *Lineage-specific evolution and gene flow in Listeria monocytogenes are independent of bacteriophages* - Roxana Zamudio, Richard D. Haigh, Joseph D. Ralph, Megan De Ste Croix, Taurai Tasara, Katrin Zurfluh, Min Jung Kwun, Andrew D. Millard, Stephen D. Bentley, Nicholas J. Croucher, Roger Stephan and Marco R. Oggion
- *Prevalence and Genetic Diversity of Listeria monocytogenes Isolated From Retail Pork in Wuhan, China* - Yiqian Wang, Qiang Ji, Shaowen Li and Mei Liu
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., et al. (2020). CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. doi: 10.1093/nar/gkz935
- Halbedel, S., Wilking, H., Holzer, A., Kleta, S., Fischer, M. A., Lüth, S., et al. (2020). Large nationwide outbreak of invasive listeriosis associated with blood sausage, germany, 2018-2019. doi: 10.3201/eid2607.200225
- Matle, I., Mbatha, K. R., and Madoroba, E. (2020). A review of Listeria monocytogenes from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. doi: 10.4102/ojvr.v87i1.1869
- Papic, B., Kušar, D., Zdovc, I., Golob, M., and Pate, M. (2020). Retrospective investigation of listeriosis outbreaks in small ruminants using different analytical approaches for whole genome sequencing-based typing of Listeria monocytogenes. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104047
- Meile, S., Sarbach, A., Du, J., Schuppler, M., Saez, C., Loessner, M. J., et al. (2020). Engineered reporter phages for rapid bioluminescence-based detection and differentiation of viable Listeria cells. doi: 10.1128/AEM.00442-20
- Tavares, R. M., Silva, D. A. L. D., Camargo, A. C., Yamatogi, R. S., and Nero, L. A. (2020). Interference of the acid stress on the expression of *lIsX* by Listeria monocytogenes pathogenic island 3 (LPI-3) variants. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109063
- Taylor, A. J., and Stasiewicz, M. J. (2019). CRISPR-Based Subtyping using whole genome sequence data does not improve differentiation of persistent and sporadic Listeria monocytogenes strains. doi: 10.1111/1750-3841.14426
- Thomas, J., Govender, N., McCarthy, K. M., Erasmus, L. K., Doyle, T. J., Allam, M., et al. (2020). Outbreak of listeriosis in south africa associated with processed meat. doi: 10.1056/NEJMoa1907462
- Wang, Y., Luo, L., Li, Q., Wang, H., Wang, Y., Sun, H., et al. (2019). Genomic dissection of the most prevalent Listeria monocytogenes clone, sequence type ST87, in China. doi: 10.1186/s12864-019-6399-1

- Xie, X., Wang, Z., Zhang, K., Li, Y., Hu, Y., Pan, Z., et al. (2019). Pig as a reservoir of CRISPR type TST4 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant during 2009-2017 in China. doi: 10.1080/22221751.2019.1699450
- Yin, Y., Doijad, S., Wang, W., Lian, K., Pan, X., Korycin'ski, I., et al. (2020). Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from invasive listeriosis in china. doi: 10.1089/fpd.2019.2693
- Yin, Y., Yao, H., Doijad, S., Kong, S., Shen, Y., Cai, X., et al. (2019). A hybrid sub-lineage of *Listeria monocytogenes* comprising hypervirulent isolates. doi: 10.1038/s41467-019-12072-1
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., et al. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. doi: 10.1093/jac/dks261
- Zuber, I., Lakicevic, B., Pietzka, A., Milanov, D., Djordjevic, V., Karabasil, N., et al. (2019). Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from a small-scale meat processor in montenegro, 2011-2014. doi: 10.1016/j.fm.2018.12.005
- Core Genome Multilocus Sequence Typing for Identification of Globally Distributed Clonal Groups and Differentiation of Outbreak Strains of *Listeria monocytogenes* - Yi Chen, Narjol Gonzalez-Escalona, Thomas S. Hammack, Marc W. Allard, Errol A. Strain, Eric W. Brown
- ECDC JOINT REPORT - European *Listeria* typing exercise (ELiTE)
- <https://www.cdc.gov/listeria/index.html>
- Application of Whole Genome Sequencing to Aid in Deciphering the Persistence Potential of *Listeria monocytogenes* in Food Production Environments - Natalia Unrath, Evonne McCabe, Guerrino Macori and Séamus Fanning
- Painset, A.; Bjorkman, J.T.; Kiil, K.; Guillier, L.; Mariet, J.F.; Felix, B.; Amar, C.; Rotariu, O.; Roussel, S.; Perez-Reche, F.; et al. LiSEQ—Whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe.
- EFSA; ECDC. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA J. 2021
- Lecuit, M. *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology.
- Disson, O.; Moura, A.; Lecuit, M. Making sense of the biodiversity and virulence of *Listeria monocytogenes*.
- Wiczorek, K.; Bomba, A.; Osek, J. Whole-genome sequencing-based characterization of *Listeria monocytogenes* from fish and fish production environments in Poland.
- Ecogenetics of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* - Fernando Baquero, Val F. Lanza, Melodie Duval, Teresa Coque
- ECDC TECHNICAL REPORT Seventh external quality assessment scheme for *Listeria monocytogenes* typing , June 2021