



Огнища на *Salmonella* и *Listeria*, нива на антимикробна резистентност и иновации в молекулярните диагностични методи

Научен обзор

Микробното замърсяване и хранителните инфекции са сериозен проблем за общественото здраве в световен мащаб. Поради тази причина откриването, мониторингът и характеризирането на патогените представлява значително предизвикателство при изпълнение на мерките за контрол на качеството. Известно е, че стандартните подходи, като методи за култивиране и биохимични тестове, отнемат много време и са енергоемки. Обратно, молекулярните технологии, базирани на геномна идентификация на бактерии, са бързи и евтини.

Съдържание:

- **Зоозози и зооозни агенти, включени в задължителния годишен мониторинг (Директива 2003/99/ЕО списък А) – стр. 1 – 15**
 - *Salmonella* spp. и докладвани огнища – стр. 3 - 9
 - *Listeria monocytogenes* и докладвани огнища – стр. 10 - 14
- **Доклад на ЖАСРА за консумация на антимикробни средства и нива на АМР. Основни констатации от доклада на ЖАСРА по антимикробни групи – стр. 15 – 24**
- **Антимикробна резистентност на *Salmonella* и *Listeria monocytogenes* съгласно годишния доклад на ЕОБХ и ECDC за зооозите, зооозните причинители и антимикробната резистентност – стр. 25 - 33**
- **Нови методи за диагностика на *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes* – стр. 33 – 53**
- **Използвани литературни източници – стр. 54 - 57**

Системата на Европейския съюз (ЕС) за мониторинг и събиране на информация относно зооозите се основава на Директива 2003/99/ЕО за зооозите и зооозните причинители, която задължава държавите членки на ЕС да събират подходящи и, когато е приложимо, сравними данни относно зооозите, зооозните агенти, антимикробната резистентност и хранителните взривове. Съгласно годишния доклад (EUOHZ), изготвен от ЕОБХ (Европейски орган за безопасност на храните (EFSA)) и Европейски център за профилактика и контрол на заболяванията (ECDC) до Европейската комисия (ЕК), за 2022 г., тази година **основните зооозни патогени, предизвикващи инфекции при хора и животни и причина за хранителни взривове са: *Salmonella*, *Campylobacter*, *L. monocytogenes*, шига токсин продуциращи *Escherichia coli* (STEC), *Mycobacterium bovis*, *Brucella*, *Trichinella* и *Echinococcus*.**

В доклада EUOHZ за 2022 г. са включени данните за заболявания при хора, причинени от различни хранителни матрици и водоизточници, и зооозите (FWD) (бруцелоза, кампилобактериоза, токсоплазмоза, ехинококоза, листериоза, салмонелоза, инфекция с шига

токсин продуциращи *E. coli*, трихинелоза и йерсиниоза), данни за нововъзникващите и векторно-пренасяните болести (EVD) (Ку-треска, бяс, туларемия и инфекция с вируса на Западен Нил (WNV)) и туберкулоза (ТВ) (инфекция с *Mycobacterium tuberculosis* complex, включващ *M. bovis* и *M. caprae*) в ECDC. Целият доклад за зоонозите е наличен на следния адрес: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2023.8442>

Зоонози и зоонозни агенти, включени в задължителния годишен мониторинг (Директива 2003/99/ЕО списък А)

През 2022 г. кампилобактериозата е потвърдена като **най-често съобщаваната зооноза** (както е от 2005 г. насам). Тя съставлява **61,3% от всички докладвани, потвърдени и изолирани зоонозни патогени**, предизвикали инфекции при хора през 2022 г. След кампилобактериозата, салмонелозата, йерсиниозата, STEC инфекциите и листериозата са **най-често съобщаваните зоонозни заболявания**. Въз основа на данни за тежестта на протичане на заболяването, листериозата и инфекцията, предизвикана от вируса на Западен Нил са двете **най-тежки заболявания, с най-високи нива на смъртност и хоспитализации сред докладваните случаи**. При тези две заболявания **почти всички пациенти са хоспитализирани** (съответно **96,0% от потвърдените случаи за листериоза** и **86,9% от локално придобитите вероятни и потвърдени случаи на инфекция с вируса на Западен Нил**). **Най-големият брой смъртни случаи се дължи на листериозата (N = 286)**, следван от инфекциите с вируса на Западен Нил (N = 92) и салмонелозата (N = 81). Листериозата и инфекцията с вируса на Западен Нил също са зоонозите с най-висок процент смъртност, 18,1% и 8,3%, съответно. По отношение на FBO (*food borne outbreak*), *Salmonella* съставлява **най-големият брой огнища и случаи, следвана от „бактериални токсини, неуточнени“ и „норовируси и други калицивируси“**. Броят на хранителните взривове се е увеличил с **43,9% през 2022 г. в сравнение с 2021 г.** Освен това броят на човешките инфекции, хоспитализациите и докладваните смъртни случаи, предизвикани от FBO, също се е увеличил съответно с **49,4%, 11,5% и 106,5%**.

Докладвани хоспитализации и смъртни случаи при хора и хранителни взривове, причинени от зоонозни агенти за 2022г.:

Disease	Surveillance data on human cases (source: ECDC)											Foodborne outbreaks (source: EFSA)					
	Confirmed human cases N	Hospitalisations			Deaths				Foodborne outbreaks				Hospitalisations and proportion of hospitalised cases		Deaths and case fatality		
		Status available	Reporting MSs ^a	Cases and proportion of hospitalised cases	Outcome available	Reporting MSs ^a	Deaths and Case fatality	Outbreaks	Cases	N	%	N	%	N	%		
Campylobacteriosis	137,107	44,876	327	16	10,551	23.5	84,425	616	17	34	0.04	295	1097	83	76	0	0
Salmonellosis	65,208	29,003	44.5	17	11,287	38.9	36,856	56.5	17	81	0.22	1014	6632	1406	21.2	8	0.12
Yersiniosis	7919	213	26.7	17	636	30.1	3,765	47.5	17	0	0	14	96	4	4.2	0	0
STEC infections	7117	2933	41.2	17	1190	38.5	4,824	67.8	21	28	0.58	71	408	63	15.4	1	0.25
Listeriosis	2738	1386	50.6	19	1330	96.0	1,578	57.6	21	286	18.1	35	296	242	81.8	28	9.5
West Nile virus infection ^b	1111	366	32.9	8	318	86.9	1,111	100.0	11	92	8.3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Echinococcosis	722	277	38.4	15	128	46.2	405	56.1	15	1	0.25	0	0	0	-	0	-
Q fever	719	NA	NA	NA	NA	NA	445	61.9	14	4	0.90	0	0	0	-	0	-
Tularaemia	620	151	24.4	10	91	60.3	227	36.6	11	2	0.88	0	0	0	-	0	-
Brucellosis	198	79	39.9	10	95	69.6	81	40.9	10	0	0	0	0	0	-	0	-
Tuberculosis caused by <i>M. bovis</i> , <i>M. caprae</i>	130	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Trichinellosis ^c	41	11	26.8	5	7	63.6	11	26.8	5	0	0	7	68	10	14.7	0	0
Rabies	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Източник: Годишен доклад за зоонозите, зоонозните причинители и AMP за 2022 г., <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2023.8442>

При сравнение на данните за зоонозите при човека за 2021 г. и 2022 г. се наблюдават стабилни нива на уведомяване за зоонозите, причиняващи най-голям брой случаи

(салмонелоза и кампилобактериоза). За всички други зоозози, с изключение на трихинелозата (-51,9%) и туларемията (-29,5%), има увеличение на процента на уведомяване през 2022 г. в сравнение с 2021 г. Процентът на локално придобитите инфекции с вируса на Западен Нил се е увеличил значително през 2022 г. в сравнение с 2021 г. (+631,8%) поради епидемичен взрив, включващ основно Италия и Гърция. По-малко увеличение се наблюдава при Ку-треска (+56,5%), бруцелоза (+29,2%), йерсиниоза (+16,3%), листериоза (+15,9%), ехинококоза (+13,8%), туберкулоза, причинена от *M. bovis*, *M. caprae* (+13,2%) и STEC инфекции (+8,8%).

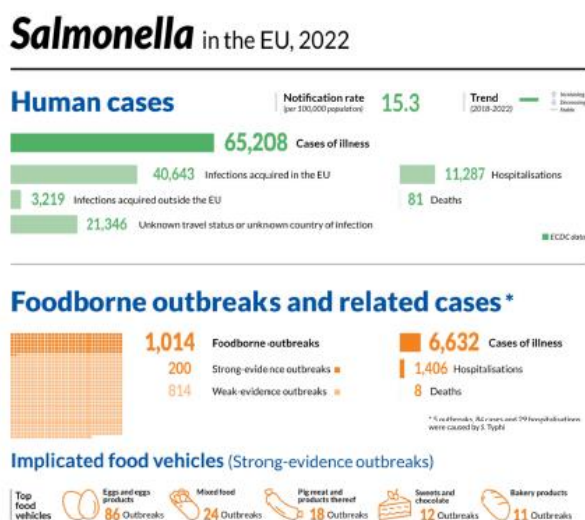
Брой потвърдени инфекции при хора, нива на докладване на данни за 2022г.:

Zoonosis	Cases (N)		Notification rates (confirmed cases per 100,000 population)		
	2022	2021 Absolute difference	2022	2021 Absolute difference	Relative difference (%)
Campylobacteriosis	137,107	-210	43.1	< 0.01	< 0.01
Salmonellosis	65,208	5039	15.3	< 0.01	< 0.01
Yersiniosis	7919	910	2.2	+0.30	+16.3
STEC infections	7117	711	2.1	+0.17	+8.8
Listeriosis	2738	373	0.62	+0.08	+15.9
West Nile virus infection ^a	1111	959	0.25	+0.22	+631.8
Echinococcosis	722	133	0.19	+0.02	+13.8
Q fever	719	259	0.17	+0.06	+56.5
Tularaemia	620	-261	0.14	-0.06	-29.5
Brucellosis	198	36	0.04	+0.01	+29.2
Tuberculosis caused by <i>M. bovis</i> , <i>M. caprae</i>	130	15	0.03	< 0.01	+13.2
Trichinellosis ^b	41	-38	0.01	-0.01	-51.9
Rabies	0	0	0	0	-

Източник: Годишен доклад за зоозозите, зоозозните причинители и АМР за 2022 г., <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2023.8442>

Salmonella spp.

Салмонелозата е **втората по значимост зоозоза** в ЕС и извън ЕС. Салмонелозата е и **втората най-често съобщавана хранителна**



хранителна стомашно чревна инфекция при хора в Европейския съюз и е **основна причина за хранителни епидемии** в държавите членки на Европейския съюз и страните, които са извън ЕС.

През 2022 г. има 65 208 потвърдени случая на салмонелоза при хора, което съответства на нива на нотификация в Европейския съюз от 15,3 случая на 100 000 души от населението. Степента на уведомяване е стабилна в сравнение с тази през 2021 г.

Общата тенденция за инфекции със *Salmonella* не показва значително увеличение или намаление през периода 2018–2022 г. Делът на хоспитализираните случаи е 38,9%, което е малко по-високо в сравнение с 2021 г., с ниво на смъртност в ЕС от 0,22%, което е подобно на 2021 г.

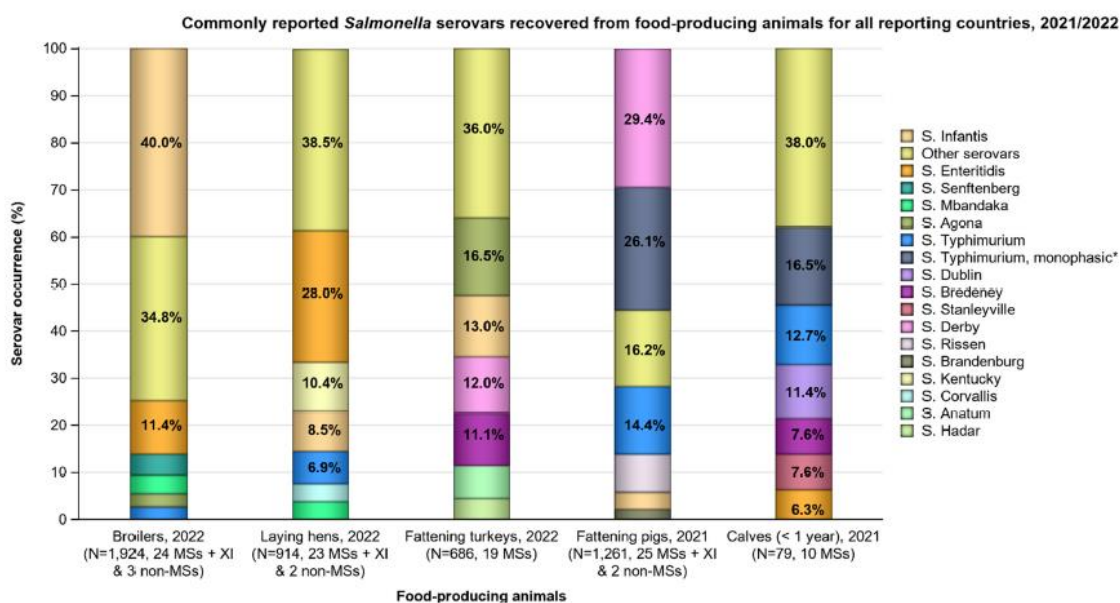
Първите пет серовара на *Salmonella*, придобити в Европейския съюз, участващи в човешки инфекции, са разпределени както следва: *S. Enteritidis* (67,3%), *S. Typhimurium* (13,1%), монофазен *S. Typhimurium* (1,4,[5],12: i:-) (4,3%), *S. Infantis* (2,3%) и *S. Derby* (0,89%).

През 2022 г. 0,16% от 99 341 тествани проби от „готови за консумация“ храни, докладвани от 25 ДЧ, положителни за *Salmonella* са основно проби от категории „месо и месни продукти от бройлери“ (1,4%; N = 584) и „подправки и билки“ (1,1%; N = 1309). От 521 917 тествани проби от „неготови за консумация“ храни, докладвани от 28 ДЧ, 2,1% са положителни, като най-високите нива на замърсяване са открити в категория „месо и месни продукти от бройлери“ (5,1%; N = 99 022) и „месо и месни продукти от пуйки“ (3,3%; N = 13 867).

При изследване на взетите проби съгласно критериите за хигиена на процеса на кланичните трупове в кланицата съгласно Регламент (ЕО) № 2073/2005 най-висок дял на положителни за *Salmonella* проби са установени сред тези, събрани от компетентните органи при пуйки (14%), бройлери (11,8%), свине (2,7%), говеда (0,96%) и овце (0,75%).

За бройлерите и пуйките за угояване разпространението на *Salmonella* spp. сред стадата на ниво ЕС, докладвано от бизнес операторите в хранително вкусовата промишленост, е значително по-ниско от това, докладвано от компетентните органи. Няма значителни промени в докладваното разпространение на *Salmonella* spp. сред стадата домашни птици в Европейския съюз през годините, нито за *Salmonella* spp. нито за целеви серовари на *Salmonella*. Единственото изключение е за пуйките за разплод, за които се наблюдава значително увеличение на оцененото *Salmonella* spp. разпространение сред стадата, което е отбелязано през 2022 г. в сравнение с 2016 г., когато достига най-ниската стойност, наблюдавана през целия период на изследване (2010-2022 г.).

Най-често докладвани серовари *Salmonella* spp. при различните видове продуктивни животни за 2021/2022 г.:



Източник: Годишен доклад за зоонозите, зоонозните причинители и АМР за 2022 г., <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2023.8442>

S. Enteritidis е най-често съобщаваният серовар при кокошки носачки и вторият най-често съобщаван при бройлери. *S. Infantis* е основният серовар, изолиран от

бройлери, и се класира сред четирите най-често срещани серовари за всички разглеждани хранителни матрици от животински произход. Най-често срещаните серовари, изолирани от свине са монофазен вариант на *S. Typhimurium* и *S. Typhimurium*. Сероварите, които най-често се съобщават при говеда са *S. Typhimurium* и *S. Dublin*.

Ключови статистики, ЕС, за периода 2018–2022 г.

Като цяло броят на докладваните случаи на салмонелоза при хора е по-висок, отколкото през 2021 г., докато процентът на уведомяване е стабилен. Броят на докладваните случаи на салмонелоза при хора, придобити в ЕС (т.е. домашно придобити инфекции и инфекции при пътуване в рамките на ЕС) и броят на случаите, свързани с огнища, са били по-ниски през 2022 г., отколкото през 2021 г., докато общият брой на хранителните взривове от *Salmonella* spp. е по-висок през 2022 г., отколкото през 2021 г.

Обобщена таблица с данни за *Salmonella* spp. изолати от хора, различни хранителни матрици и животни за периода 2018 – 2022г.:

	2022 ^a	2021 ^a	2020	2019 ^b	2018 ^b	Data source
Humans						
Total number of confirmed cases	65,208	60,169	52,690	87,907	91,858	ECDC
Total number of confirmed cases/100,000 population (notification rate)	15.3	15.3	12.1	17.5	17.6	ECDC
Number of reporting MSs	27	27	27	28	28	ECDC
Infection acquired in the EU	40,643	43,720	38,247	58,157	59,763	ECDC
Infection acquired outside the EU	3219	925	973	6343	6376	ECDC
Unknown travel status or unknown country of infection	21,346	15,524	13,470	23,407	25,719	ECDC
Number of outbreak-related cases	6632	6755	3686	10,240	11,631	EFSA
Total number of outbreaks	1014	773	694	1284	1588	EFSA
Food^c						
Meat and meat products						
Number of sampling units	951,590	977,446	557,341	552,590	433,197	EFSA
Number of reporting MSs	28	28	26	28	28	EFSA
Milk and milk products						
Number of sampling units	68,740	43,907	38,492	46,797	44,078	EFSA
Number of reporting MSs	24	25	24	25	24	EFSA
Fish and fishery products						
Number of sampling units	22,797	14,882	16,486	13,974	17,075	EFSA
Number of reporting MSs	25	25	23	24	22	EFSA
Eggs and egg products						
Number of sampling units	19,105	14,696	11,579	12,093	10,611	EFSA
Number of reporting MSs	22	22	18	21	21	EFSA
Fruits and vegetables (and juices)						
Number of sampling units	16,920	12,485	17,222	17,068	10,889	EFSA
Number of reporting MSs	25	23	23	22	22	EFSA
Animals^d						
<i>Gallus gallus</i> (chickens)						
Number of sampling units	742,299	812,238	620,141	752,172	720,717	EFSA
Number of reporting MSs	28	28	26	27	27	EFSA
Turkeys						
Number of sampling units	65,637	70,869	63,473	65,950	68,009	EFSA
Number of reporting MSs	26	25	22	23	24	EFSA
Ducks and geese						
Number of sampling units	1187	3751	412	8700	9846	EFSA
Number of reporting MSs	6	10	6	9	6	EFSA
Pigs						
Number of sampling units	15,283	16,689	17,234	18,619	17,868	EFSA
Number of reporting MSs	15	15	10	14	14	EFSA
Cattle (bovine animals)						
Number of sampling units	22,904	26,061	28,363	86,871	30,302	EFSA
Number of reporting MSs	13	14	11	14	14	EFSA

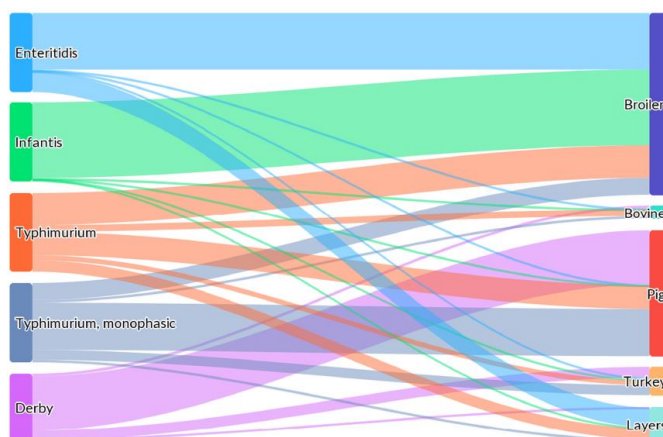
За периода 2018 - 2022г. България е докладвала 310 потвърдени случаи на салмонелоза при хора с ниво на докладване 4.5, като броят е леко завишен спрямо 2021г. и е по-малък спрямо предходните отчетни години.

В обобщение за 2022г., съгласно Регламент (ЕО) № 2073/2005, на ниво производство са изследвани в ЕС 17 559 проби от хранителни категории „мляко и млечни продукти“, „яйца и яйчни продукти“, „месо и месни продукти“ с докладвани и потвърдени 603 положителни проби от категориите кайма и месни заготовки от птиче месо, неготови за консумация месни продукти от птиче месо, месни продукти, предназначени за консумация сурови, прясно птиче месо и млечни продукти. На ниво дистрибуция и търговска мрежа са изследвани 30990 проби, като 727 са положителни в категории „сирена и млечни продукти“, „морски дарове“, „прясно птиче месо“ и „месни продукти от птиче месо, предназначени да минат топлинна обработка“, „кайма и месни заготовки“ от птиче месо.

В България на ниво първично производство са изследвани 2190 проби от трупове от свине преди разфасоване и охлаждане с 0 положителни за *Salmonella*, а на ниво дистрибуция и търговия са изследвани 375 проби от трупове на свине, отново без положителен резултат, за 2022 г. В България са изследвани на ниво първично производство 13 проби от трупове на бройлери без положителен резултат. На ниво първично производство са изследвани и 512 говежди трупове и 60 проби на етап дистрибуция и търговия без нито един положителен резултат. От сумарно изследвани 464 проби от овчи трупове нито една проба не е позитивирала нито на етап първично производство нито на етап дистрибуция и търговия. България не е докладвала положителни за салмонела проби от кланични трупове на пуйки, коне и кози. Също така няма позитивни птичи стада (бройлери, пуйки, кокошки) за нито един от основните циркулиращи серовари на салмонела. Единствено при кокошки носачки от 245 изследвани проби 4 са позитивирали без определяне на конкретния серовар.

В таблицата са представени основните серовари на *Salmonella* spp., циркулиращи в ЕС през периода 2020 – 2022г. При хора, основните изолати за 2022г. в ЕС, принадлежат към серовари: Enteritidis, Typhimurium, монофазен вариант на Typhimurium, Infantis, Derby, Coeln и други. При продуктивни животни основните циркулиращи серовари са представени на графиката на Sankey - Enteritidis, Infantis, Typhimurium, монофазен вариант на Typhimurium, Infantis и Derby при телета, бройлери, кокошки носачки, прасета и пуйки.

Serovar	2022		
	Cases	MSs	%
Enteritidis	25,737	25	54.6
Typhimurium	5694	25	12.1
Monophasic Typhimurium 1,4,[5],12:i:-	4906	14	10.4
Infantis	1093	25	2.3
Newport	522	20	1.1
Derby	513	20	1.1
Napoli	448	14	0.95
Agona	343	19	0.73
Chester	338	17	0.72
Coeln	333	19	0.71
Kentucky	314	17	0.67
Virchow	276	17	0.59
Stanley	238	17	0.51
Bovismorbificans	226	17	0.48
Braenderup	218	15	0.46
Mbandaka	205	14	0.44
Brandenburg	177	16	0.38
Hadar	173	17	0.37
Panama	167	11	0.35
Montevideo	163	15	0.35
Other	5038	-	10.7
Total^{a,b}	47,122	25	100



През 2022 - 2023 г. са докладвани още огнища на *Salmonella* spp. различни серовари, което потвърждава отново, че **този патоген трябва да бъде обстойно мониториран и наблюдаван, като се използват и по-новите молекулярни методи като пълния геномен секвентен анализ и новоразработен метод, наречен CRISPR SeroSeq.** Например трансгранично огнище на *Salmonella* Mbandaka ST413 продължава в ЕС/ЕИП и Обединеното кралство (UK) от септември 2021 г. насам. До 30 ноември 2022 г. са регистрирани 196 случая и са публикувани в съвместната бърза епидемиологична оценка от Европейския център за превенция и контрол на заболяванията (ECDC) и Европейския орган за безопасност на храните (EFSA) (https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ROA_S.%20Mbandaka_2022-33-42_281122_final.pdf). До 15 март 2024 г. са докладвани 300 случая (увеличение от 104 случая) в Естония (n=3), Финландия (n=98), Франция (n=16), Германия (n=2), Ирландия (n= 7), Холандия (n=1) и Обединеното кралство (n=173). Двадесет и три случая са хоспитализирани, шест случая са имали септицемия и един случай е починал в Обединеното кралство. През ноември 2022 г., когато е публикувана първата оценка, **готовите за консумация пилешки продукти и/или прясното пилешко месо са идентифицирани като вероятни преносители на инфекция** въз основа на проведени епидемиологични проучвания и разгледани клинични случаи във Финландия и Обединеното кралство. Последващите проучвания от органите за безопасност на храните в Естония, Финландия и Холандия и споделянето на данни от геномно секвениране на изолати от храни с EFSA през 2024 г. **като хранителна матрица на инфекциите са идентифицирани замразените пилешки гърди, приготвени на пара, произведени в Украйна.** Контаминираните партиди са внесени от страни извън ЕС от различни бизнес оператори и се разпространяват на пазарите на ЕС/ЕИП и Обединеното кралство. Срокът на годност на контаминираните замразени продукти от пилешко месо е изтекъл през ноември и декември 2023 г. Последните случаи са регистрирани във Финландия през октомври 2023 г. и в Обединеното кралство през февруари 2024 г. Ако се приеме, че идентифицираните замърсени партиди вече не са на пазара и като се има предвид сроковете на годност и приложените контролни мерки, вероятността от поява на нови инфекции с този щам от тези партиди е ниска. Въпреки прилагането на мерките за контрол обаче, **инфекции при хора продължават да се появяват през 2023 г. в ЕС/ЕИП и в началото на 2024 г. в Обединеното кралство, което предполага неоткрити пътища на експозиция, които изискват допълнително разследване и представляват продължаващ, макар и намален риск от нови инфекции.**

От 1 януари до 24 октомври 2023 г. са докладвани и **335 лабораторно потвърдени случая** на *Salmonella* Enteritidis ST11, принадлежащи към три отделни микробиологични групи, в 14 държави от ЕС/ЕИП, Обединеното кралство и Съединените щати, **засягащи всички възрастови групи.** Повечето пациенти съобщават за консумация на пилешко месо, включително пилешки шишчета. Девет случая в три държави са хоспитализирани и един случай в Австрия е починал, което подчертава **потенциала за тежки и фатални инфекции** от това огнище. След информацията за експозицията на храните и националните разследвания през 2023 г. органите за безопасност на храните в Австрия, Дания и Италия са изследвали 10 хранителни продукта (шест заразени със *Salmonella* Enteritidis ST11 клъстер 1 и/или клъстер 2), седем крайни производители в Полша и един в Австрия. Информацията от проведените епидемиологични проучвания разкри, че три проби от пилешки шишчета, замърсени със салмонела, са доставени от няколко полски бизнес оператора с храни. Търговската връзка на предполагаемия източник на инфекция предполага един или повече общи източник(а)/точка(и) на замърсяване в Австрия, Дания и Италия. След събирането на геномна информация, клъстерният анализ разкри наличието на щамове на епидемията в хранителната верига в множество европейски страни. Повечето положителни храни, от които са взети проби през 2022–2023 г. със споделени епидемиологични данни, произхождат от Полша. Като се има

предвид събраната информация, замърсените пилешки шишчета и пилешко месо са правдоподобни средства за проникване на инфекцията при човека, докладвани в тези три групи. При липсата на убедителни микробиологични доказателства и цялостна проследимост, ролята на идентифицираните крайни производители, техните доставчици на месо и възможното участие на други оператори в хранителната промишленост като източници на инфекциите не могат да бъдат потвърдени или изключени. **Необходими са по-обстойни изследвания за идентифициране на първопричината за замърсяването и източника на инфекции, което е от решаващо значение за бързото прилагане на целенасочен ефективен контрол и коригиращи мерки.** Тъй като източникът(ите) не са идентифицирани, има вероятност да се появят нови случаи при това продължително огнище в много страни. Оценката на риска може да бъде намерена на следния линк: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/three-clusters-salmonella-enteritidis-st11-infections-linked-chicken-meat-and>

На 2 септември 2021 г. Франция е съобщила за увеличение на инфекциите със *Salmonella Enteritidis* ST11. До 11 януари 2022 г. са докладвани 272 потвърдени случая в пет държави от ЕС/ЕИП и Обединеното кралство (UK): Дания (n=3), Франция (n=216), Холандия (n=12), Норвегия (n=7), Испания (n=22) и Обединеното кралство (n=12) през 2021 г. Регистрирани са два смъртни случая при възрастни мъже. Двадесет и пет случая са хоспитализирани. Повечето пациенти са съобщили за **консумация на яйца/яйчни продукти.** Яйцата са с **произход три испански ферми**, едната е с положителен тест за щам на огнището. Пресните яйца от фермите, свързани с огнището, са изтеглени от пазара и са пренасочени за влагане в термично обработени яйчни продукти. Това огнище от 2021 г. е свързано микробиологично с трансгранично огнище, докладвано от Нидерландия през 2019 г. (https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ROA_Salmonella-Enteritidis-ST11_2022_final.pdf)

От август 2022 г. до 12 юли 2023 г. са докладвани 92 случая на *Salmonella Senftenberg* в Австрия (5), Белгия (4), Чехия (4), Естония (1), Финландия (12), Франция (16), Германия (26), Ирландия (1), Холандия (5), Норвегия (1), Швеция (11), Обединеното кралство (4) и Съединените щати (2). Един пациент е починал от инфекцията. В Австрия, Германия и Франция **чери домати са идентифицирани като хранителна матрица, отговорна за инфекциите** и за която най-често се съобщава за консумация от пациентите. Генетичното сходство на изолатите на огнището при хора предполага вероятен общ източник(и), причиняващ продължително трансгранично огнище, причинено от храни, със случаи, периодически докладвани в 11 държави от ЕС/ЕИП, Обединеното кралство и САЩ за около 10 месеца. Замърсяването може да произхожда от ферми, отглеждани домати.

Не на последно място се доказва от огнище на **монофазен S. Typhimurium** от 15 юли 2022 г. в ЕС/ЕИП и Обединеното кралство, че хранителната матрица **шоколад и шоколадови изделия би могла да бъде също източник на салмонелоза.** При това огнище са идентифицирани 401 потвърдени (n=399) и вероятни (n=2) случая на монофазен *S. Typhimurium*, като случаи са идентифицирани и в Канада (n=4), Швейцария (n=49) и Съединените щати (n=1), с което общият брой на случаите достига 455 в световен мащаб. Това огнище е довело до **голям брой хоспитализации** (около 40%), като повечето от пациентите са деца под 10-годишна възраст и **някои случаи с тежки клинични симптоми като кървава диария.** Въз основа на епидемиологични и микробиологични изследвания специфични шоколадови продукти от белгийска шоколадова фабрика са идентифицирани като вероятни носители на патогена. Фабриката е била затворена и **изтеглянето на продукти е стартирано в световен мащаб**, като крайната цел е била да се предотврати консумацията на продукти,

потенциално замърсени със *Salmonella*. (целият доклад: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/15-july-update-monophasic-salmonella-typhimurium-outbreak-linked-chocolate-products>)

Всички тези доклади от епидемиологични проучвания, оценки на риска и годишния доклад за зоонозите за 2022г. показват **широкото разпространение на различни серовари *Salmonella*, които може да засегнат веригата за доставка на храни и/или по-ранни етапи в производствената верига. Може да има множество хетерогенни източници на *Salmonella* и тези огнища може да доведат до широко разпространение на този патоген и повишаване на риска от нови инфекции при хората, особено предвид предстоящия летен сезон. Поради това е важно да се насърчат междусекторните изследвания на замърсяванията със *Salmonella* в храните и първичното производство.**

Listeria monocytogenes

Листерияозата, причинена от *Listeria monocytogenes*, е **значимо в глобален мащаб хранително заболяване с висока смъртност (20% - 30%), особено засягащо уязвимите популации.** Основният подход за лечение на листериоза включва използването на **аминопеницилини самостоятелно или в комбинация с аминогликозиди.** Въпреки това, **постоянното повишаване на антимикробната резистентност (АМР) застрашава настоящите лечения.** Поради това глобалните системи за наблюдение, използващи задълбочени и точни методи, са от решаващо значение за разбирането на механизмите за АМР и следователно за ограничаването на разпространението на антимикробно резистентни щамове, за да се гарантира ефективността както на настоящите, така и на бъдещите лечения.

Листерияозата е **петата най-често съобщавана зооноза при хората в Европейския съюз и една от най-сериозните болести, предавани с храни,** под наблюдението на Европейския съюз. През 2022 г. 27 ДЧ са докладвали за **2738 потвърдени инвазивни случая на *L. monocytogenes* при хора.** Тези случаи са довели до **1330 хоспитализации и 286 смъртни случая в ЕС.** Степента на уведомяване в Европейския съюз е 0,62 случая на 100 000 души население, което е увеличение от 15,9% в сравнение с 2021 г. (0,53 случая на 100 000 души население) и най-високият процент и брой докладвани случаи от 2007 г. насам. Общата тенденция за листериозата не показва значително увеличение или намаление през периода 2018–2022 г.

Listeria in the EU, 2022

Human cases

2,738 Cases of illness

1,778 Infections acquired in the EU

12 Infections acquired outside the EU

948 Unknown travel status or unknown country of infection

Notification rate (per 100,000 population) 0.62

Trend (2018-2022)

Increasing
Decreasing
Stable

1,330 Hospitalisations

286 Deaths

ECDC data

Foodborne outbreaks and related cases

35 Foodborne outbreaks

17 Strong-evidence outbreaks

18 Weak-evidence outbreaks

296 Cases of illness

242 Hospitalisations

28 Deaths

Implicated food vehicles (Strong-evidence outbreaks)

Top food vehicles: Pig meat and products thereof (5 Outbreaks), Fish and fish products (4 Outbreaks), Mixed food (3 Outbreaks), Vegetables and juices and other products thereof (2 Outbreaks), Dairy products (other than cheeses) (2 Outbreaks)

2073/2005, остава нисък (< 0,1%) до много нисък (0,1%–1,0%) в 9 от 10 избрани „РТЕ“ категории храни. Най-високият процент положителни проби се наблюдава за категория „риба и рибни продукти“ (2,3%). В същия контекст, на етап първично производство, положителните проби за *L. monocytogenes* са повече в сравнение с тези на ниво разпространение и дистрибутиране за всички категории „готови за консумация“ храни, с изключение на категория „мляко и млечни продукти“. „, за които не е открита *Listeria* в нито един етап. Най-висок процент положителни проби в етап първично производство се наблюдава при „риба“ (2,6%), „рибни продукти“ (2,5%) и „месни продукти, различни от колбаси“ (2,5%).

Появата на *L. monocytogenes* дава индикация за определена степен на замърсяване в тези категории „готови за консумация“ храни. Резултатите варират в зависимост от категорията „готова за консумация“ храна, етапа на вземане на проби, броя на изследваните проби и броя на докладващите страни. Съобразно броя взети проби и всички оператори, взели проби по официален контрол или по самоконтрол, броя положителни проби остава като цяло нисък (< 0,1%) до много нисък (1%–10%) в тези категории. Като цяло най-голям брой положителни проби - от 2% до 7% се наблюдават за категории „риба и рибни продукти“, „месни продукти от говеждо или свинско“, „плодове и зеленчуци“ и „сирена от овче мляко“. При първичното производство процентът на положителните единици е много нисък при свинете (0,35%) и нисък при говедата (1,2%), които са животинските видове, от които са взети най-много проби в ЕС. Малкият брой ДЧ, докладващи данни, отразява липсата на минимални изисквания за хармонизирано вземане на проби и докладване при първичното производство.

За 2022г. при хора на ниво ЕС са докладвани 2738 случая, като повечето са придобити в рамките на ЕС. Регистрирани са 35 огнища на инфекция. Основните категории храни, които са изследвани са „месо и месни продукти“, „мляко и млечни продукти“, „риба и рибни продукти“ и други категории, готови за консумация храни. Броят проби, взети и изследвани за 2022г. е драстично по-висок от този за предходните 3 години (2021-2018г.). За 2022г. са изследвани основните категории продуктивни животни – говеда, овце и кози, прасета и други, като общия брой изследвани проби е 22370, с 2,9% позитивни единици – за *L.*

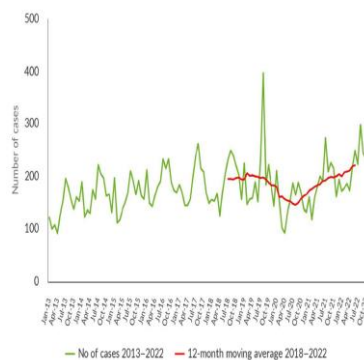
Общият процент смъртност сред заболелите в ЕС е висок (18,1%), по-висок от 2021 г. и 2020 г. (съответно 13,7% и 13,0%).

Общо 26 ДЧ са докладвали общо 312 849 взети проби от различни категории „готови за консумация“ храни от етапите на дистрибутиране или първично производство. Процентът на положителните за *L. monocytogenes* резултати при извършване на проверки за безопасност от компетентните органи съгласно Регламент №

monocytogenes - 440 положителни, *L. ivanovii* – 84 положителни, *L. innocua* – 8 положителни и за *Listeria spp.*- 122 положителни.

През 2022г. България е докладвала 5 положителни за *Listeria spp.* хора, което е спад в броя случаи спрямо предходния период 2018 - 2021г. За категория „риба и рибни продукти“, „сирена и млечни изделия“, „мляко и млечни продукти“, „месни продукти и колбаси“ и „други готови за консумация храни“ България също е докладвала данни. За човешка листериоза най-ниските нива на докладване са от България, Хърватия, Кипър, Гърция, Малта и Румъния ($\leq 0,20$ на 100 000).

	2022 ^a	2021 ^a	2020	2019 ^b	2018 ^b	Data source
Humans						
Total number of confirmed cases	2738	2365	1887	2621	2544	ECDC
Total number of confirmed cases/100,000 population (notification rates)	0.62	0.53	0.43	0.46	0.47	ECDC
Number of reporting MSs	27	27	27	28	28	ECDC
Infection acquired in the EU	1778	1546	1286	1816	1640	ECDC
Infection acquired outside the EU	12	5	5	14	8	ECDC
Unknown travel status or unknown country of infection	948	814	596	791	896	ECDC
Number of outbreak-related cases	296	104	120	349	159	EFSA
Total number of outbreaks	35	23	16	21	14	EFSA
Sampled major RTE food categories^c						
Meat and meat products						
Number of sampling units	135,148	107,198	40,291	64,971	58,060	EFSA
Number of reporting MSs	24	23	22	22	22	EFSA
Fish and fishery products						
Number of sampling units	25,009	29,783	11,212	13,366	14,031	EFSA
Number of reporting MSs	24	24	23	22	22	EFSA
Milk and milk products						
Number of sampling units	97,157	66,633	49,132	61,866	59,313	EFSA
Number of reporting MSs	24	23	23	23	23	EFSA
Products intended for infants or special medical purposes						
Number of sampling units	2672	2764	2394	2346	2433	EFSA
Number of reporting MSs	19	19	19	19	18	EFSA
Other products						
Number of sampling units	120,530	94,841	81,575	80,167	28,204	EFSA
Number of reporting MSs	25	23	24	24	23	EFSA

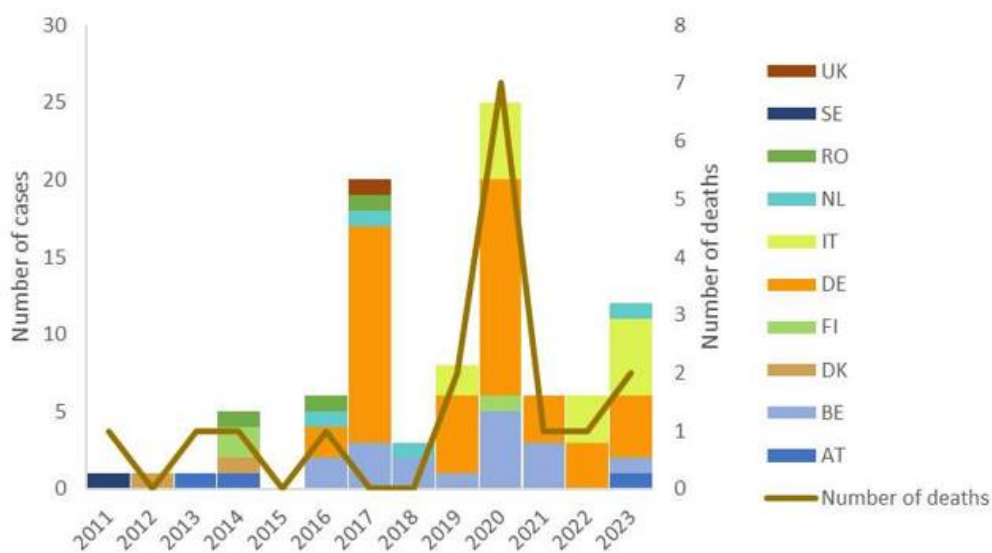


Източник: Годишен доклад за зоонозите, зоонозните причинители и АМР за 2022 г., <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2023.8442>

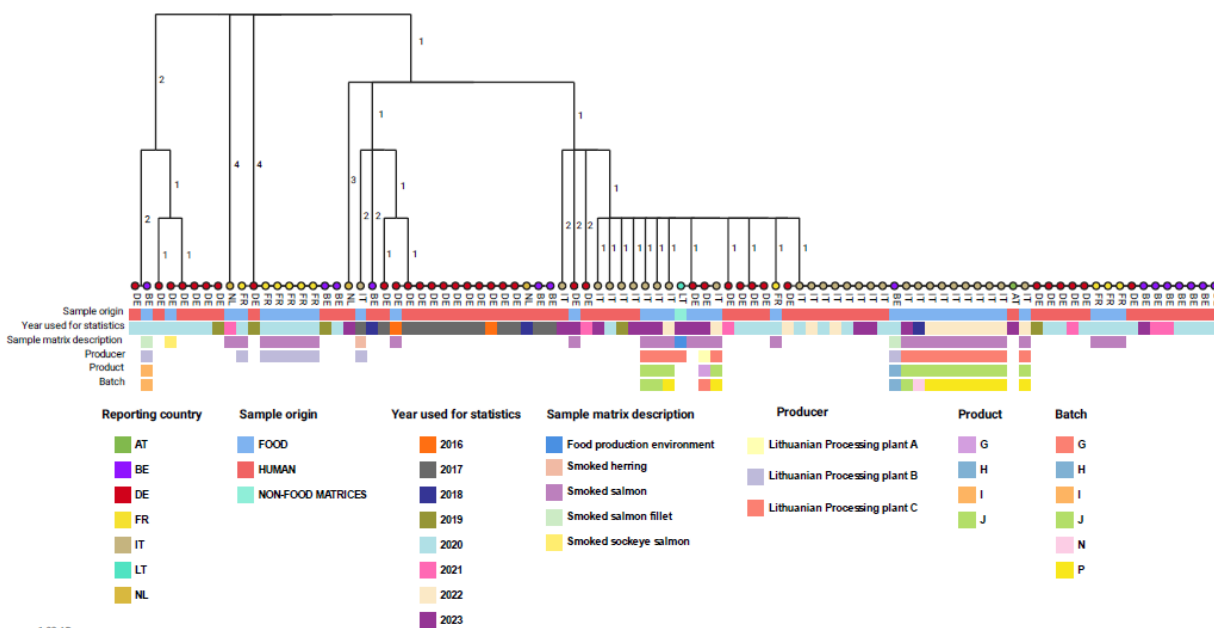
Наблюдава се, че разпространението на *Listeria spp.* макар и малко, не е пренебрежимо поради сериозността и тежестта на инфекциите, които предизвиква този патоген при хората и немалкото документирани фатални случаи.

Например в ЕС/ЕИП и Обединеното кралство през 2023 г. е установен геномен клъстер от *Listeria monocytogenes* секвенционен тип (ST) 155, серогрупа Па. Въз основа на геномното сходство клъстерът може да бъде разделен на три подклъстери, от които продължават да се докладват само случаи, дължащи се на подклъстер 1. Следователно подклъстер 1 е във фокуса на тази оценка, като 64 случая са докладвани в пет държави от ЕС/ЕИП между 2016 г. и 2023 г., от които 17 са били през 2022 г. и 2023 г. (един в Австрия, един в Белгия, осем в Италия, шест в Германия и един в Нидерландия). Той включва 10 смъртни случая между 2019 г. и 2023 г. Подклъстери 2 и 3 са исторически, като 30 случая са докладвани между 2011 г. и 2021 г. Въз основа на епидемиологичните проучвания при пациенти с листериоза готовите за консумация рибни продукти се оказват един от основните източници на инфекцията. Националните проучвания в областта на храните, проследимостта и геномните данни идентифицират 34 *L. monocytogenes* изолати от 12 рибни продукта и един изолат от предприятие за преработка на риба в рамките на подклъстер 1. Секвентният анализ показва взаимовръзка на две преработвателни предприятия в Литва с изолатите от огнището. През 2022—2023 г. замърсените рибни продукти от тези заводи са достигнали пазарите на дребно в Германия и Италия, но в другите три държави, докладващи

инфекции, няма информация за разпространението на продуктите. Повтарящото се откриване на щама от подкълъстер 1 от продавани запечатани RTE рибни продукти разкри устойчивостта на щама в преработвателно предприятие в продължение на осем години. В тази оценка на риска се демонстрира персистиращия характер на инфекциите с подкълъстер 1 „Omikron1“, който продължава да предизвиква тежки и фатални инфекции, докладвани през 2022 - 2023 г., като се засяга повече от една държава. **Необходимо е допълнително целенасочено разследване във веригата за производство на RTE риба и рибни продукти**, за да се определи точката(ите) на замърсяване. Прекъсването на производството на RTE рибни продукти в засегнатите преработвателни предприятия вероятно ще намали инфекциите, но докато се очаква да се появят всички източници и места на замърсяване, се очаква да възникнат нови случаи, особено сред уязвимите хора (имуносупресирани пациенти, бременни жени, деца и пациенти на възраст над 75 години). Цялата оценка може да бъде намерена на следния линк: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/prolonged-multi-country-cluster-listeria-monocytogenes-st155-infections>



Брой потвърдени случаи на листериоза и докладвани смъртни случаи в кълъстера Omikron1 по държави към 05.12.2023 г.



Данни от проведен cgMLST анализ на *L. monocytogenes* ST155 изолати и различни матрици, които са изследвани, по държави към 28.11.2023 г.

Обширно епидемиологично проучване в Германия, включително случаи, причинени от клъстера „Omikron1“, посочи **контаминираните продукти от пушена и консервирана сьомга като криещи сериозен риск за инфекции с *Listeria* при хората.** За тази оценка на риска е налична ограничена подробна информация за експозицията: при осем от 11 изследвани случая през 2022-2023 г. пациентите са потвърдили консумация на RTE рибни продукти (сьомга) в рамките на 14-30 дни преди заболяването. Един от тях е италиански случай на менингит през юли 2023 г., съобщаващ за консумация на продукти от сьомга преди заболяване. Количественото моделиране, извършено от EFSA, предполага, че **около 90% от инвазивните човешки *L. monocytogenes* инфекции са причинени от консумация на RTE храна, съдържаща > 2 000 CFU/g, и една трета от случаите се дължат на *Listeria* при консумация на конкретни продукти.** Растежът на *Listeria* при ниски температури показва, че дори първоначално ниско ниво на замърсяване преди охлаждане може да представлява риск от инфекции, особено за имуносупресирани и възрастни хора. Като цяло националните проучвания и анализът на геномни данни са разкрили 54 изолата *L. monocytogenes*, групирани с двата референтни генома на огнището на „Omikron1“ от 31 рибни продукта (34 изолата от 12 рибни продукта в рамките на подгрупа 1) и три изолата, групирани с двата референтни генома на „Omikron1“ на огнище от преработвателно предприятие за риба (един в рамките на подклъстер 1). Епидемиологични и микробиологични данни от изследвани хранителни проби и проби от производствената среда разкриват **циркуляция на епидемични щамове на „Omikron1“ в някои предприятия за преработка на риба през годините 2015-2023.**

Идентифицирането на произходът на замърсяването ще позволи прилагането на целенасочени контролни мерки и смекчаващи действия. Освен това по-нататъшни усилия трябва да бъдат положени за целенасочено вземане на проби от производството на рибни продукти и производствените обекти, за да се идентифицира(т) точката(ите) на замърсяване. **Прекъсването на производството в засегнатите преработвателни предприятия вероятно ще намали вероятността от инфекции, но се очаква да се появят нови случаи в страните от ЕС/ЕИП, особено сред уязвимите лица (имуносупресирани и възрастни хора), докато всички източници и места на замърсяване не бъдат отстранени, ограничени и контролирани.** Като цяло, спазването на принципите на HACCP (Анализ на опасността, критични контролни точки), добрите хигиенни практики и добрите практики на производителя в рамките на цялата верига за производство и доставка на храни може да намали риска от замърсяване. Осигуряването на подходящи температури на съхранение, правилното боравене и въздържането от консумация на храна след изтичане на срока на годност може допълнително да намали риска от инфекция с *L. monocytogenes*.

Selected Multistate Outbreaks

2024

- [Queso Fresco and Cotija Cheese](#) - Listeriosis

2023

- [Peaches, Nectarines, and Plums](#) - Listeriosis
- [Ice Cream](#) - Listeriosis
- [Leafy Greens](#) - Listeriosis

2022

- [Enoki Mushrooms](#) - Listeriosis
- [Deli Meat and Cheese](#) - Listeriosis
- [Brie and Camembert Cheese](#) - Listeriosis
- [Ice Cream](#) - Listeriosis

2021

- [Dole Packaged Salads](#) - Listeriosis
- [Fresh Express Packaged Salads](#) - Listeriosis
- [Fully Cooked Chicken](#) - Listeriosis
- [Queso Fresco](#) - Listeriosis

Други докладвани огнища на листериоза в световен мащаб основно са **предизвикани от консумация на сурови, непастеризирани млека и сирена, сладолед, сурови или преработени зеленчуци и плодове, сурови или недостатъчно топлинно обработено птиче месо, колбаси, хот-дог, деликатеси и сурова или пушена риба и други морски дарове.** *L. monocytogenes* също е открит в сурова храна за домашни любимци в САЩ. Допълнителна информация за минали огнища на листериоза са налични на следния линк:

<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>. Истинският брой заболели при тези огнища вероятно е бил по-висок от докладвания брой и епидемиите може да не са били

ограничени до териториите на САЩ с известни заболявания. Това е така, защото някои хора

се възстановяват без медицинска намеса и не се изследват за *Listeria*. Така този патоген може да продължава да се разпространява и чрез производството и чрез дистрибуцията на все повече храни. При липсата и на докладвани геномни данни или пък минималния им брой не може да се направи анализ на разпространението на този патоген, да не говорим за първоизточника на инфекциите или предприемане на адекватни и навременни мерки за ограничаване на циркулацията на *L. monocytogenes*.

Съвсем наскоро докладвано през 2024 г. е огнище на *L. monocytogenes* ST1607, свързано с консумацията на рибни продукти. Предстои да бъде извършена оценка на риска, като ще бъдат използвани геномни данни, налични в системата WGS. Представителни изолати на избухналия взрив от хранителни заболявания са споделени от Дания в Epi-Pulse Event 2023-FWD-00003. Идентификаторът на клъстера на ECDC е 2023-08.LIST.60. Събитието е публикувано в нотификация в RASFF портала № 2022.7482, 2023.4705, 2024.2029.

Антимикробна резистентност на *Salmonella* и *Listeria monocytogenes* съгласно годишния доклад на ЕОБХ и ECDC за зоонозите, зоонозните причинители и антимикробната резистентност

Антимикробната резистентност (АМР) представлява значително предизвикателство за общественото здраве както в Европа, така и в други части на света, което представлява сериозна здравна и икономическа тежест и заплаха за здравето на животните и производството на храни от животински произход. Основният двигател за повишаване на нивата на АМР е консумацията на антимикробни средства (АМС) както при хората, така и при животните.

Системата на Европейския съюз за мониторинг и събиране на информация относно зоонозите, основана на Директива 2003/99/ЕО, задължава ДЧ на ЕС да събират данни за появата на зоонози, зоонозни агенти, антимикробна резистентност, животински популации и епидемии, причинени от храни. Обобщеният годишен доклад на ЕС относно зоонозни агенти и АМР при зоонозни и индикаторни бактерии от хора, животни и храни, е достъпен онлайн: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2023.8442> .

През 2021—2022 г. данни за антимикробната резистентност (АМР) при зоонозните бактерии и индикаторните бактерии са предоставени от 27 ДЧ на ЕС, Обединеното кралство (Северна Ирландия) и четири държави, които са извън ЕС. През 2021 г. е въведено ново законодателство, свързано с хармонизирания мониторинг и докладване на АМР при продуктивни животни и полученото от тях месо, което изисква от държавите членки да вземат проби от вносното прясно месо на граничните контролни пунктове и пробите да бъдат анализирани за наличие на индикаторни коменсални *E. Coli*, разширен спектър ESBL/AmpC/CP - продуциращи *E. Coli* и *Salmonella spp.* В хармонизираните панели на антимикробните средства са добавени и нови вещества, включително амикацин за *Salmonella spp.* и *E. coli* и хлорамфеникол и ертапенем за *Campylobacter spp.* Освен това, считано от 2021 г., пълното геномно секвениране (WGS) е признато като алтернативен метод на допълнително генотипно изследване на *Salmonella* и индикаторни *E. coli* изолати, резистентни към цефалоспорици с разширен спектър и/или карбапенеми, както и предполагаеми изолати, продуциращи ESBL-/AmpC-/CP *E. coli* от специфичния мониторинг.

Salmonella spp. изолатите от случаи при хора през 2022 г. показват високи нива на резистентност към ампицилин, сулфонамиди и тетрациклини, докато резистентността към трето поколение цефалоспорици като цяло е много ниска до ниска от 1,4% и 1,2% съответно за цефотаксим и цефтазидим. Статистически значим спад в нивата на резистентността на човешките салмонелни изолати към ампицилин и тетрациклин е

наблюдаван съответно в 15 и 12 държави през периода 2013 - 2022 г. Това е особено **явно при серовар *S. Typhimurium*, характерен за свине и телета**. Що се отнася до **цефотаксим**, седем държави членки са отчели **значителни низходящи тенденции** в сравнение с четири държави членки, които отчитат нарастващи тенденции. От 2022 г. насам се наблюдава **умерена поява на резистентност към цiproфлорксацин (18,7%) при човешки изолати**. При *S. Kentucky* (72,7%) обаче се наблюдава **изключително висок процент на резистентни изолати**, а за *S. Enteritidis* са наблюдавани **нарастващи тенденции в резистентността към цiproфлорксацин** в 12 държави през периода 2013 - 2022 г., като **този серовар се изолира предимно от домашни птици**. За *Salmonella* spp. и индикаторни коменсални *E. coli*, изолати от продуктивни животни и кланични трупове на домашни птици през 2021 - 2022 г. **резистентността към ампицилин, тетрациклини и сулфонамиди варира от умерена до много висока в повечето държави членки**. Резистентност към трето поколение **цефалоспорини (цефотаксим и цефтазидим)** е докладвана в **ниски нива за *Salmonella* spp.** изолати от стада говеда, **бройлери и пуйки**, и при много ниски нива - в стадата от **кокошки носачки и свинете за угояване**. Тези констатации съвпадат с тези, наблюдавани за човешките изолати на *Salmonella*. Докладвани са обаче **много високи нива на резистентност към цефалоспорини от трето поколение при вносни пресни бройлери и пуешко месо, взети на граничните контролни пунктове**. Резистентността към **флуорохинолони (цiproфлорксацин и налидиксова киселина)** е **висока до много висока сред изолатите на *Salmonella* spp. и индикаторните коменсални *E. coli*, изолирани от бройлери, пуйки за угояване и кланични трупове/месо от домашни птици през 2022 г., както и ниски или в умерени нива при изолати от свине и телета през 2021 г.** Резистентността към **амикацин** — новото вещество, включено в хармонизирания панел от 2021 г. насам, е **била много ниска сред *E. coli* от всичките четири животински популации и при изолати на *Salmonella* spp. от всички животински популации, с изключение на изолатите от говеда на възраст под 1 година, за които не е установена резистентност**. Резистентността към **колистин не е често срещана сред изолатите на *Salmonella* spp. и *E. coli*, изолирани от продуктивни животни и кланични трупове на домашни птици, въпреки че е наблюдавана умерена резистентност при някои сероварови на *Salmonella* (*S. Enteritidis*) и изолати на *Salmonella* от говеда на възраст под 1 година**. **Комбинираната резистентност към цiproфлорксацин и цефотаксим, категоризирани като критично важни антимикуробни средства от най-висок приоритет е много ниска при *Salmonella* изолатите от хора и редки или много ниски при *Salmonella* изолати от почти всички категории животни и месо от тях, с изключение на бройлери и говеда на възраст под 1 година, където са открити ниски нива**. Въпреки това, **някои серовари на салмонела от домашни птици, като *S. Kentucky* от бройлери и *S. Infantis* от пуйки, имат сравнително повишени нива на комбинирана резистентност към цiproфлорксацин и цефотаксим**. Същото се наблюдава и при тези серовари, изолирани от хора. Мониторингът включва и оценка на нивата на предполагаемите ESBL-/AmpC-/CP- продуциращи *Salmonella* spp. от човешки случаи, продуктивни животни, и вносно прясно месо; както и индикаторните коменсални *E. coli* изолати от продуктивни животни и месо от тях. И двата ключови показателя за резултатите показват, че през последните години е отбелязан **обнадеждаващ напредък в намаляването на АМР при продуктивните животни в няколко държави членки на ЕС**.

Освен това съществуват важни различия между и в рамките на популациите и държавите членки. Независимо от това, **честото излагане на бактериалната биота както при хора, така и при животни на антимикуробни агенти може да доведе до развитие на АМР чрез благоприятстване на селекцията на резистентни бактериални клонове, независимо дали те са патогенни, коменсални или екологични бактерии**. Това може с течение на времето да промени популационната структура на микробните общности със сериозни последици за здравето на хората и животните.

Антимикробно-резистентните бактерии, изолирани от продуктивни животни, могат да се разпространят при хора чрез поглъщане или при боравене с храна, замърсена със зоонотични бактерии като *Campylobacter*, *Salmonella* или *Escherichia coli* (*E. coli*), при директен контакт с животни или рядко, от замърсяване на околната среда. Инфекциите с антимикробно резистентни бактерии могат да доведат до неуспешно лечение или до необходимост от антимикробни средства от втора линия за терапия. **Коменсалната бактериална флора може също така да образува резервоар от резистентни гени, които могат да се прехвърлят между бактериални видове, включително организми, способни да причинят заболяване при хора и животни (EFSA, 2008).**

Европейската комисия прие план за действие за справяне с АМР на 29 юни 2017 г. Планът за действие се основава на подхода „Едно здраве“, който е насочен към резистентността на бактериите както от хора, така и от животни. Действията на ЕС са съсредоточени върху областите с най-висока добавена стойност за държавите членки, като насърчаване на разумната употреба на антимикробни средства чрез антимикробно управление (AMS), подобряване на междусекторната работа, подобряване на превенцията и контрола на инфекциите (IPC) и консолидиране наблюдение на АМР и антимикробна употреба (AMC). Мониторингът на АМР при зоонозни и коменсални бактериални изолати от продуктивни животни и храни включва специфично и непрекъснато събиране, анализ и докладване на данни. Той дава възможност за разбиране на развитието и разпространението на резистентност, проследяване на времеви тенденции в появата и разпространението на АМР, идентифициране на възникващи или специфични модели на резистентност, предоставя подходящи данни за оценка на риска и помага за оценка на текущите прилагани мерки в борбата с АМР. Обобщеният доклад на ЕС (EUSR) относно АМР включва данни, свързани с появата на АМР при изолати от хора, животни и храни. EUSR за АМР е изготвен в сътрудничество между EFSA и ECDC с помощта на второстепенни изпълнители към EFSA. При изготвянето на доклада са проведени консултации с държавите членки на ЕС, Европейската асоциация за свободна търговия (ЕАСТ), Европейската комисия и съответната референтна лаборатория на ЕС за антимикробна резистентност (EURL-AR).

Данните за АМР, събрани от държавите членки на ЕС и компилирани в EUSR относно АМР, се използват и за извършване на по-обстойни анализи, като например Съвместния доклад за потреблението на антимикробни средства и АМР при животни, храни и хора – Съвместен междуведомствен анализ на потреблението на антимикробни средства и резистентността (JIACRA), изготвян редовно от ECDC, EFSA и ЕМА съгласно подхода One Health (2015, 2017, 2021, 2024) (ECDC, EFSA и ЕМА, 2024). Докладът на JIACRA предоставя анализ на възможната връзка между AMC и АМР при хора и продуктивни животни, като се фокусира върху комбинации от антимикробни средства и бактериални видове, считани за важни за общественото здраве.

Четвъртият съвместен междуведомствен доклад, включващ анализ на консумацията на антимикробни агенти и появата на антимикробна резистентност при бактериални изолати от хора и продуктивни животни, който обхваща периода 2019 - 2021 г. Освен това за първи път то включва съвместен анализ на тенденциите в потреблението и резистентността при хората и животните през периода 2014 - 2021 г. Настоящият доклад предоставя интегриран анализ на връзките между AMC (*antimicrobial consumption* – потребление на антимикробни средства) при хората и продуктивните животни и появата на АМР в бактериалните изолати съответно от хора и продуктивни животни, както и връзката между AMC и АМР при продуктивни животни и АМР при бактериални човешки изолати. Данните произхождат от **пет различни мрежи за наблюдение/мониторинг и обхващат държавите членки на ЕС, две държави от Европейското икономическо пространство (ЕИП) (Исландия и Норвегия) и Швейцария**

(само за данни за продуктивни животни). Докладът обхваща **седем антими­кробни групи** (карбапенеми, цефалоспори­ни от трето и четвърто поколение, флуорохинолони и други хинолони, аминопеницилини, полимиксини, макролиди и тетрациклини). Той се фокусира върху резистентността към тези антими­кробни средства на *Escherichia coli* и *Campylobacter* spp. В допълнение, резистентността към карбапенемите в *Klebsiella pneumoniae* е включена поради неговото специфично значение за хората. За разлика от предишните доклади на ЛАСРА и като се има предвид ограниченият брой изолати на салмонела на някои серовари в животинския сектор и връзката на АМР моделите със специфични серовари, анализът на резистентността на *Salmonella* spp. от хора и животни не е приоритизиран.

Проби за микробиологични изпитвания при хора се вземат от клинично болни индивиди в здравни заведения, докато проби от продуктивни животни се вземат от здрави животни при клане. Видовете продуктивни животни, които са изследвани включват бройлери, пуйки, говеда на възраст под 1 година и свине. Освен това данните за антими­кробната резистентност на изолатите от националните програми за контрол на *Salmonella* са включени в анализа на резистентността на *Salmonella* spp. изолати от животни и хора. Някои анализи, изследващи нивата на АМР в бактериални изолати от продуктивни животни, включват комбинирани данни от две последователни години, тъй като различните животински видове се наблюдават съответно в четни и нечетни години. За сравнението между АМС при хора и продуктивни животни, данните за АМС при хора, изразени като допустими дневни дози (DDD) на 1000 жители на ден, са преобразувани в mg активно антими­кробно вещество, изразено на kg оценена биомаса. За да се даде възможност за анализ на връзките между АМС и АМР съответно при свинете и домашните птици, са използвани данни за продажбите на антими­кробни средства.

Чрез поредица от анализи са проучени връзките между избрани групи антими­кробни средства и АМР в избрани бактериални видове при хората и при продуктивните животни, както и потенциалните взаимовръзки между двете величини. Целият доклад е наличен на следния линк: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2024.8589>

Пет първични ключови индикатора за АМС и АМР, разработени от ECDC, EFSA и EMA (*ECDC, EFSA, EMA, 2017*), са анализирани, като за хората основните показатели включват общата консумация на антими­кробни средства за системна употреба, изразена като DDD на 1000 жители на ден, дела на метицилин-резистентния *Staphylococcus aureus* (MRSA) и дела на *Escherichia coli*, резистентни към трето поколение цефалоспори­ни. За продуктивните животни, основните показатели включват общите продажби на антими­кробни средства, изразени като mg на популационна единица (PCU), и изчисления спрямо популацията дял на индикаторната коменсална *E. coli* от бройлери, пуйки за угояване, прасета за угояване и телета (тегло е равно на PCU), които са напълно чувствителни на предварително определен панел от антими­кробни средства. Резултатите са за периода 2014–2021 г..

През 2021 г. изчислената спрямо населението на ЕС/ЕИП средна АМС, изразена в mg активно вещество на kg, е оценена на 125,0 mg/kg при хората (28 държави, референтна граница 44,3 - 160,1) и 92,6 mg/kg при продуктивни животни (29 държави, диапазон 2,5 - 296,5). Както за хората, така и за продуктивните животни, и съобразно данните на отделните държави за АМС, все още има няколко държави със значително по-висок АМС от средната стойност. От 2014 г. насам се наблюдава **статистически значимо намаление на общия размер на АМС при продуктивните животни, докато общият размер на АМС при хората е относително стабилен.**

Констатациите от този четвърти доклад на ЛАСРА потвърждават връзката между АМС и АМР и предполагат, че по-нататъшните мерки за намаляване на АМС както при хората, така

и при продуктивните животни биха оказали благоприятно въздействие върху появата на АМР при бактериални изолати както от хора, така и от продуктивни животни. Данните от 2019 г. до 2021 г. **потвърждават връзката между консумацията на определени групи антимикробни средства и появата на АМР при тези групи антимикробни средства в бактериите както от хора, така и от продуктивни животни.** В някои случаи АМР при бактериите от хора също се свързва с АМР при бактерии от продуктивни животни особено при бактерии, които причиняват предимно инфекции, предавани чрез храната.

Изводът е, че наблюдаваните високи нива на АМС и АМР, които все още се докладват в няколко държави от ЕС/ЕИП, сочат, че **разумната употреба на антимикробни средства, както и профилактиката и контролът на инфекциите трябва да бъдат допълнително засилени. Необходими са непрекъснати и координирани действия, за да се постигне намаляване с 20% на консумацията на антимикробни средства при хората до 2030 г. (в сравнение с нивата от 2019 г.) и намаляване с 50% на АМС при отглежданите за производство на храни животни до 2030 г. (в сравнение с нивата от 2018 г.),** както е препоръчано от ЕС и заложено съответно в стратегията на Европейската комисия „От фермата до трапезата“. Намаляването на АМС както при хората, така и при продуктивните животни, необходимо за постигането на тези цели, както и въздействието върху АМР, ще продължат да се наблюдават от агенциите на ЕС в рамките на специалните програми за надзор. **Координираният отговор във всички сектори е от съществено значение и би могъл да бъде постигнат чрез устойчиво изпълнение на националните планове за действие въз основа на подхода „Едно здраве“,** включително оперативни елементи, елементи за мониторинг и оценка. Агенциите на ЕС продължават да работят за по-нататъшно хармонизиране и интегриране на наблюдението на АМС и на АМР в различните сектори, за да се разберат по-добре взаимовръзките между АМС и АМР. **България има разработена Национална програма за действие срещу АМР 2024 – 2027 г., но тя все още не е одобрена и не се прилага, а отговорните институции полагат индивидуални усилия за борба срещу АМР и ограничаване на АМС, организират информационни кампании съвместно със СЗО и сигнализират по един или друг начин проблема с АМР.**

Основни констатации от доклада на JIACRA по антимикробни групи

Карбапенеми

Карбапенемите не са разрешени за употреба при продуктивни животни в ЕС и поради това в настоящия доклад е анализирана само консумацията на карбапенеми при хора. Към днешна дата **резистентността към карбапенем при животински изолати *E. coli* е изключително рядка.** Установена е статистически значима положителна връзка между консумацията на карбапенеми при хората и резистентността към карбапенем в човешки инвазивни изолати *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* за всички години (2019 - 2021 г.). Тъй като карбапенеми не могат да се използват за животни, не е извършен анализ.

На национално равнище повече държави (11/25) са имали **статистически значимо увеличение на потреблението на карбапенеми от човека** между 2014 г. и 2021 г., отколкото намаление (2/25). Въпреки това спадът в много държави е малко вероятен поради ниското потребление в началото на периода на наблюдение. Шест от 25 държави са имали повишена резистентност към карбапенем при инвазивни *E. coli* от хора между 2014 и 2021 г.

Цефалоспорини от трето и четвърто поколение

През 2021 г. оценената спрямо населението на ЕС/ЕИП **средна консумация на цефалоспорини от трето и четвърто поколение е 5,1 mg/kg биомаса при хората и 0,2 mg/kg биомаса при продуктивни животни.** Анализите показват, че при хората има статистически

значими положителни взаимовръзки между консумацията на цефалоспорини от трето и четвърто поколение и резистентността към цефалоспорини от трето поколение при инвазивни изолати *E. coli* за всички години (2019 - 2021 г.). По същия начин при продуктивните животни при анализ въз основа на периодите 2018 - 2019 г., 2019 - 2020 г. и 2020 - 2021 г. се наблюдава статистически значима връзка между консумацията на цефалоспорини от трето и четвърто поколение и разпространението на беталактамаза продуцираща и разширен спектър (ESBL) и/или AmpC беталактамаза продуцираща *E. coli*.

В анализа на модела на резистентност към трето поколение цефалоспорини при инвазивни *E. coli* изолати от хора, се поддържа значителна взаимовръзка с консумацията на трето и четвърто поколение цефалоспорини при хората. В повечето държави потреблението не се е променило значително в периода 2014 - 2021 г. при продуктивните животни (17/27 държави) и при хората (18/25 държави).

При хората, сред страните със значителна промяна в потреблението на трето и четвърто поколение цефалоспорини, повече държави показват увеличение, отколкото намаление (5 спрямо 1 държави). Резистентността към трето поколение цефалоспорини при инвазивни *E. coli* изолати от хора не показва значителна промяна в повечето страни. Въпреки това има няколко държави, които показват статистически значимо увеличение или намаление. При продуктивните животни се наблюдава значително намаляване на консумацията на цефалоспорини от трето и четвърто поколение в седем държави, докато в три държави потреблението се е увеличило. Значително намаляване на резистентността към трето поколение цефалоспорини при *E. coli* е наблюдавано в 14 страни. В три от тези страни консумацията и резистентността на цефалоспорин от трето и четвърто поколение показват съпътстваща значително намаляваща тенденция. Само в една държава е наблюдавано едновременно значително увеличение на консумацията и резистентността на цефалоспорин от трето и четвърто поколение при продуктивни животни.

Връзката между консумацията на цефалоспорини от трето и четвърто поколение при хората и появата на резистентност към трето поколение цефалоспорини на *Salmonella spp.* изолати не е статистически значима за 2019 г. и 2020 г., и е значима за 2021 г. За да се проучат възможните връзки между консумацията на цефалоспорини от трето и четвърто поколение и резистентността към цефалоспорини, SIMR (summary indicator of microbiological resistance) на цефотаксим в *Salmonella spp.* за изолати от продуктивни животни (бройлери, пуйки, свине и телета, от които са взети проби при клане), е сравнен с консумацията на цефалоспорини от трето и четвърто поколение при всички видове продуктивни животни (изразени в mg на kg приблизителна биомаса) за 2-годишните интервали 2018 - 2019 г., 2019 - 2020 г. и 2020 - 2021 г. (средно потребление през съответните години) на национално равнище. Не е имало значима взаимовръзка между антимикробната резистентност и потреблението на антимикробни средства и за трите периода при всички видове продуктивни животни. Наблюдавана е статистически значима положителна корелация между потреблението на цефалоспорини от трето и четвърто поколение при свине и резистентността на *Salmonella spp.* За 2020 г. и 2021 г. е установена статистически значима положителна връзка между резистентността на *Salmonella spp.* при хората и продуктивните животни, а за 2019 г. - не е наблюдавана. Резистентността към трето поколение цефалоспорини при *Salmonella spp.* изолати от хора е имала статистически значима положителна асоциация с нивото на резистентност към трето поколение цефалоспорини на *Salmonella spp.* изолати от бройлери и пуйки през 2020 г. и при свине през 2021 г., но не и през 2019 г. Не е установена статистически значима връзка между консумацията на цефалоспорини от трето и четвърто поколение при продуктивни

животни и резистентността към трето поколение цефалоспорини при изолати *Salmonella* spp. от хора през всичките 3 години.

Флуорохинолони

През 2021 г. изчислената спрямо населението на ЕС/ЕИП средна консумация на флуорохинолони и други хинолони е 6,3 mg/kg биомаса при хората и 2,9 mg/kg биомаса при продуктивни животни. Статистически значима положителна взаимовръзка е наблюдавана между консумацията на флуорохинолони и други хинолони при хора и потреблението на тези антимикробни средства при продуктивни животни през 2021 г., т.е. държавите с висока консумация при хора също имат тенденция да имат висока консумация при продуктивни животни. Анализите показват, че при хората има статистически значими положителни връзки между консумацията на флуорохинолони и други хинолони и резистентността към флуорохинолони при инвазивни *E. coli* за всички години (2019 - 2021 г.). По същия начин при продуктивните животни са установени статистически значими положителни връзки между консумацията на флуорохинолони и други хинолони и резистентността към флуорохинолони в индикаторни *E. coli* за всички периоди от време (2018 - 2019 г., 2019 - 2020 г. и 2020 - 2021 г.).

За *Campylobacter jejuni* анализът показва, че консумацията на флуорохинолони и други хинолони при хора е значимо свързана с резистентността към флуорохинолони при изолати от хора през 2 от трите изследвани години. По същия начин, консумацията на флуорохинолони при продуктивни животни, се свързва с резистентността на флуорохинолони при човешки изолати *C. jejuni*. Резистентността към флуорохинолони при *C. jejuni* от пуйки и бройлери също е пряко свързана с резистентността към флуорохинолони при *C. jejuni* човешки изолати. При домашни птици потреблението на флуорохинолони и други хинолони е свързана с резистентност към флуорохинолони при *C. jejuni*. Моделът за анализ потвърждава пряката връзка между консумацията на флуорохинолони и други хинолони при домашни птици с резистентност в *C. jejuni* изолати от домашни птици, което от своя страна е свързано и с появата на резистентност към флуорохинолони в *C. jejuni* изолати от хора. За *Campylobacter coli* анализът показва, че консумацията на флуорохинолони и други хинолони при хора е била значително свързана с резистентност към флуорохинолони при изолати от хора само през 2021 г. Консумацията на флуорохинолони при прасета е значително свързана с резистентността на флуорохинолони при *C. coli* от свине. В последния анализ единствената асоциация, която остава значителна, е консумацията на флуорохинолони при свинете и резистентността, установена в изолати от свине.

С течение на времето статистически значимо намаляване на консумацията на флуорохинолони и други хинолони е наблюдавано на равнище ЕС/ЕИП както при хората, така и при продуктивните животни между 2014 г. и 2021 г. Нито една държава не е показала значително увеличение на потреблението на флуорохинолони и други хинолони при хората, а 18 държави са показали значително намаляване на консумацията на тези антимикробни средства между 2014 г. и 2021 г. В седем от последните страни е наблюдавано едновременно намаляване на резистентността към флуорохинолон при инвазивни *E. coli* при хора. При продуктивните животни, 13 държави са показали значително намаляване на консумацията на флуорохинолони и други хинолони, а само една държава е отчетла увеличение през същия период от време, но това не е свързано със съпътстващо повишаване на резистентността. Четири държави са наблюдавали едновременно значително намаляване както на употребата на тези антимикробни средства, така и на резистентността към флуорохинолони при индикаторни *E. coli*.

Връзката между консумацията на флуорохинолони и други хинолони при хората и появата на резистентност към флуорохинолони и други хинолони на *Salmonella* spp. изолати не е била значима за нито една от годините 2019 - 2021 г.

Обобщеният индикатор за антимикробна резистентност (SIMR) към ципрофлоксацин при *Salmonella* също се използва за оценка на възможните връзки между консумацията на флуорохинолони и други хинолони при продуктивни животни и резистентността към флуорохинолони на *Salmonella* изолати от продуктивни животни. Категорията „продуктивни животни“ в SIMR включва бройлери, пуйки, свине и телета. През 2019 - 2020 г., 2020 - 2021 г. и през 2018 - 2019 г. са наблюдавани статистически значими положителни връзки между резистентността към ципрофлоксацин при *Salmonella* spp. и флуорохинолони и други хинолони при изолати от продуктивни животни.

Прогнозната консумация на флуорохинолони и други хинолони при домашни птици и свине, изразена като DDDvet/kg биомаса, е сравнена с резистентността към ципрофлоксацин при *Salmonella* spp. изолати от домашни птици (бройлери и пуйки) през 2020 г. и от свине за 2019 г. и 2021 г. Значителна корелация е открита само за свине за 2019 г. Установена е значителна положителна връзка между SIMR към флуорохинолони при изолатите от продуктивни животни и резистентността на *Salmonella* човешки изолати през 2020 г. и 2021 г.

Данните за поява на резистентност към флуорохинолони при *Salmonella* човешки изолати (2019 - 2021 г.) са сравнени с поява на резистентност към флуорохинолони при *Salmonella* изолати от бройлери и пуйки (2020 г.) и при свине (2019 г. и 2021 г.). Открити са доказателства за статистически значима взаимовръзка за изследваните комбинации при прасета, бройлери и пуйки. Връзката между общата консумация на флуорохинолони и други хинолони при продуктивни животни и резистентност на човешки изолати *Salmonella* флуорохинолон и други хинолонови е незначителна за 2021 г.

При използване на определени модели като PLS-PM е изчислена значима взаимовръзка между ефекта от консумацията на флуорохинолони и други хинолони при продуктивни животни (домашни птици и свине) и резистентността при продуктивни животни, както и между ефекта на резистентността при продуктивни животни върху резистентността при хората.

Полимиксини

През 2021 г. изчислената спрямо населението на ЕС/ЕИП средна консумация на полимиксини (колистин) е оценена на 0,7 mg/kg биомаса при хората и 2,5 mg/kg биомаса при продуктивни животни. Потреблението на полимиксини при продуктивни животни показва значителна корелация с резистентността към полимиксини в индикаторни *E. coli* изолати от продуктивни животни за периодите 2018 - 2019 г. и 2019 - 2020 г. Когато се анализира отделно за домашни птици и свине, взаимовръзката е статистически значима за домашните птици за 2020 г., докато при свинете тя е статистически значима през 2019 г., но не и през 2021 г. Тъй като не са налични данни за резистентност към полимиксини за бактериални изолати от хора, за настоящия доклад не могат да бъдат извършени съответни анализи. От 2014 г. до 2021 г. общото потребление на полимиксини при продуктивни животни, в ЕС/ЕИП е намаляло значително, докато при хората се е увеличило.

При продуктивните животни, по-голям брой държави отчитат статистически значимо намаление на количеството полимиксини, отколкото увеличение (9 спрямо 0). По същия начин повече страни отчитат значително намаляване на резистентността (четири), отколкото увеличение (една). В три държави се наблюдава едновременно значително намаляване на

консумацията на полимиксини и на резистентността към полимиксин при индикаторни *E. coli* животински изолати. В много страни нивата на резистентност на полимиксини (колистин) в изолатите на *E. coli* от продуктивни животни, са останали ниски през този период.

За *Salmonella* spp. не е установена значителна връзка между потреблението на полимиксини при продуктивни животни и резистентността към колистин в *Salmonella* spp. изолати от продуктивни животни за който и да е от периодите (2018 - 2019 г., 2019 - 2020 г. и 2020 - 2021 г.). Като цяло **резистентността към колистин сред изолатите *Salmonella* е ниска при продуктивните животни с изключение на телетата**. Във всички животински групи повечето отделни държави отчитат никакви или много ниски нива на резистентност към колистин при *Salmonella* spp. Не е установена значителна връзка между консумацията на полимиксини и резистентността към колистин при *Salmonella* spp. изолати от свине (2019 г., 2021 г.) или домашни птици (2020 г.).

Аминопеницилини

През 2021 г. изчислената спрямо населението на ЕС/ЕИП **средна консумация на аминопеницилини е 64,1 mg/kg биомаса при хората и 25,8 mg/kg биомаса при продуктивни животни**. Наблюдавана е **статистически значима положителна връзка между консумацията на аминопеницилини при хората и продуктивните животни за 2021 г.**, т.е. държавите с висока консумация сред хората също имат тенденция да имат високо потребление при продуктивните животни и обратно. Анализите показват, че при продуктивните животни има **статистически значими положителни връзки между консумацията на аминопеницилини и резистентността към ампицилин в индикаторни *E. coli* за всички периоди от време (2018 - 2019 г., 2019 - 2020 г. и 2020 - 2021 г.)**. По подобен начин е наблюдавана **статистически значима положителна връзка между резистентността към ампицилин при индикаторни *E. coli* изолати от продуктивни животни и резистентността към ампицилин при инвазивни *E. coli* от хора** през всички години. Освен това са наблюдавани статистически значими положителни връзки между консумацията на аминопеницилини при продуктивни животни и при хора, и резистентността към аминопеницилини при инвазивни *E. coli* изолати от хора.

В по-обстояен анализ се запазва само статистически значимата положителна взаимовръзка на консумацията на аминопеницилини при изолати индикаторни *E. coli* от продуктивни животни с резистентност към аминопеницилин, което от своя страна е свързано с резистентност към аминопеницилин при инвазивни *E. coli* изолати от хора. Между 2014 г. и 2021 г. общото потребление на аминопеницилини в ЕС/ЕИП е намаляло значително при хората. Такава тенденция не се наблюдава при продуктивните животни. На национално равнище се наблюдава **статистически значимо намаляване на консумацията на аминопеницилини при хората в 18 държави** между 2014 г. и 2021 г. Потреблението в нито една държава не се е увеличило. През същия период резистентността към аминопеницилин при инвазивни *E. coli* човешки изолати също намалява в 17 страни. През периода 2014 - 2021 г. в тринадесет държави се наблюдава едновременно намаляване на консумацията на аминопеницилин и на аминопеницилиновата резистентност в *E. coli*.

При продуктивните животни, повече държави отбелязват спад в потреблението на аминопеницилини през периода 2014 - 2021 г. (10 спрямо 4 държави). По същия начин, повече страни отбелязват значително намаление на резистентността към аминопеницилини при индикаторни *E. coli* (7 срещу 4). Четири държави са наблюдавали едновременно значително намаление, а една държава е докладвала значително увеличение на консумацията на аминопеницилин и резистентността към аминопеницилин при *E. coli* изолати от продуктивни животни.

При *Salmonella* spp. няма статистически значима връзка между консумацията на аминопеницилини и резистентността при *Salmonella* spp. изолати от хора през 2019 г., 2020 г. и 2021 г.

Няма статистически значима връзка между потреблението на аминопеницилини при продуктивни животни и резистентността към ампицилин на изолатите *Salmonella* spp. от продуктивните животни. През 2019 г. е установена значителна връзка между SIMR за *Salmonella* spp. изолати от продуктивни животни и изолати *Salmonella* от хора, но не и през останалите 2 години.

Установена е значима връзка между резистентността на изолатите *Salmonella* spp. от пуйки към аминопеницилин през 2020 г. и изолатите от хора. Всички други асоциации са незначителни. Установена е статистически значима връзка между потреблението на аминопеницилини при продуктивни животни и резистентността към аминопеницилини при изолати *Salmonella* spp. от хора за 2019 г. и 2020 г.

Макролиди

През 2021 г. изчислената спрямо населението на ЕС/ЕИП **средна консумация на макролиди е 6,2 mg/kg биомаса при хората и 7,8 mg/kg при продуктивни животни.** Наблюдавана е **статистически значима положителна връзка между консумацията на макролиди при хората и продуктивните животни**, т.е. държавите с по-висока консумация при хората също имат по-висока консумация при продуктивните животни и обратно. Анализите показват, че при продуктивните животни, през 2021 г. са наблюдавани статистически значими положителни взаимовръзки между консумацията на макролиди при свинете и появата на макролидна резистентност на *C. coli* от свине. По-обстоен анализ запазва статистически значимата положителна връзка между консумацията на макролиди при продуктивни животни и макролидната резистентност при *C. coli* от прасета, което от своя страна корелира с макролидна резистентност при *C. coli* от хора. Между 2014 г. и 2021 г. общото потребление на макролиди в ЕС/ЕИП е намаляло както при хората, така и при продуктивните животни. Тъй като резистентността на *E. coli* към макролиди не е проучена, в този доклад, анализ на тенденциите не е извършен.

Тетрациклини

През 2021 г. изчислената спрямо населението на ЕС/ЕИП **средна консумация на тетрациклини е 1,9 mg/kg биомаса при хората и 23,6 mg/kg при продуктивни животни.** Анализите показват, че **при продуктивни животни са наблюдавани статистически значими положителни взаимовръзки между консумацията на тетрациклини и тетрациклиновата резистентност в индикаторни *E. coli*.** Освен това са установени положителни връзки между очакваната консумация на тетрациклини при домашните птици и резистентността на *E. coli* и *C. jejuni* от домашни птици към тетрациклини, както и между прогнозното потребление на тетрациклини при свинете и резистентността на *E. coli* и *C. coli* изолати от прасета към тетрациклини. За 2020 г. е установена статистически значима положителна връзка между резистентността на тетрациклин при *C. jejuni* от бройлери и от пуйки и резистентност към тетрациклин при *C. jejuni* от хора. **Статистически значими взаимовръзки също са установени между потреблението на тетрациклин при продуктивни животни и резистентността към тетрациклин при *C. jejuni* от хора за всички години (2019 - 2021 г.).**

При мултистъпков анализ резистентността на тетрациклин при *C. jejuni* от хора се свързва с тетрациклинова резистентност при *C. jejuni* от домашни птици. За *C. coli* не може да се направи оценка на значими взаимовръзки. За инвазивни *E. coli* не е извършен подробен

анализ, поради липса на достатъчно данни. Между 2014 г. и 2021 г. общото потребление на тетрациклини в ЕС/ЕИП не се е променило значително при хората, но е намаляло значително при продуктивните животни. На национално равнище консумацията на тетрациклин при продуктивни животни, е намаляла в 18 държави и се е увеличила в две държави. По същия начин резистентността към тетрациклин в индикаторни *E. Coli*, от продуктивни животни, намалява в 18 държави и се увеличава само в една държава. В 14 държави е наблюдавано съпътстващо статистически значимо намаление както на консумацията на тетрациклин, така и на тетрациклиновата резистентност на *E. coli* от продуктивни животни, докато нито една държава не е показала едновременно увеличение както на консумацията на тетрациклин, така и на резистентността към тетрациклин.

При *Salmonella* spp. не са открити доказателства за статистически значима връзка между общата консумация на тетрациклини (в Общността и болниците) и появата на тетрациклинова резистентност на изолати *Salmonella* spp. от хора за периода 2019 - 2021 г.

За да се проучат възможните връзки между консумацията на тетрациклини и тетрациклиновата резистентност, SIMR към тетрациклини в *Salmonella* spp. изолати от продуктивни животни е сравнен с потреблението на тетрациклини при продуктивни животни (изразена в mg на kg биомаса) за 2-годишните интервали 2018 - 2019 г., 2019 - 2020 г. и 2020 - 2021 г. (средна консумация през съответните години) на национално равнище. Категорията „продуктивни животни“ включва бройлери, пуйки, свине и телета. През всички разглеждани 2-годишни интервали са наблюдавани статистически значими положителни връзки между резистентността към тетрациклин при *Salmonella* spp. изолати от продуктивни животни и потреблението на тетрациклин при продуктивни животни. Въпреки че положителните асоциации са статистически значими, трябва да се отбележи, че данните за *Salmonella* spp. са изключително малко и драстично се различават и не може да се идентифицира ясен модел на взаимовръзка. При *Salmonella* spp. изолати от свине (2019 г., 2021 г.) или домашни птици не е установена значителна връзка между потреблението на тетрациклини и резистентността към тетрациклини (2020 г.).

През 2019 г. е установена значителна взаимовръзка между SIMR за *Salmonella* spp. изолати от продуктивни животни и изолати *Salmonella* от хора, но през другите 2 години не е наблюдавана значима връзка. Също така данните за поява на резистентност към тетрациклин на *Salmonella* spp. човешки изолати (2019 - 2021 г.) са сравнени с тетрациклиновата резистентност на *Salmonella* spp. изолати от бройлери и пуйки (2020 г.), както и от свине (2019 г. и 2021 г.). Не са открити доказателства за статистически значима връзка за всички изпитвани комбинации.

Значителна положителна връзка е наблюдавана през 2021 г. между потреблението на тетрациклини при продуктивни животни и резистентността на човешките изолати салмонела, но не и през 2019 г. и 2020 г.

Предишни доклади на JACRA също са разглеждали *Salmonella* spp. поради значението ѝ като зоонозен патоген, предаван чрез храни, но данните за антиминобната резистентност за *Salmonella* spp. имат особености и ограничена наличност на ниво серовар и поради тези причини връзките между АМС и появата на АМР при *Salmonella* spp. са по-трудни за оценка, отколкото за другите бактериални патогени (напр. *E. coli* и *Campylobacter*), разгледани в настоящия доклад.

Антиминобна резистентност при *Salmonella* spp. според годишния доклад за зоонозните, зоонозните причинители и антиминобната резистентност на EFSA, ECDC и EMA

Броят на докладваните *Salmonella* spp. човешки изолати варират значително между 29-те докладващи държави от ЕС/ЕИП, често отразяващи разликите в размера на популацията: шест държави съобщават за < 100 човешки изолати, докато шест държави съобщават за повече от 1000 изолати. **Обща резистентност към ампицилин, сулфонамиди и тетрациклини се наблюдава във високи нива при човешки *Salmonella* spp. изолати през 2022 г. и варира от умерено до много високо при изолати от продуктивни животни и вносно птиче месо, с изключение на кокошките носачки, където са докладвани ниски нива на резистентност. През периода 2013 - 2022 г. се наблюдават намаляващи статистически значими тенденции в резистентността към ампицилин и тетрациклини при изолатите от хора, съответно в 15 и 12 държави, основно дължащи се на намаляващата резистентност на *Salmonella* Typhimurium, серовар, обикновено изолиран от прасета и говеда под 1 годишна възраст. Общата резистентност към флуорохинолони (ципрофлоксацин) се наблюдава при много високи нива сред изолати от бройлери (55,5%) и стада от пуйки за угояване (57,9%) и при високо ниво при кокошки носачки (24,7%) през 2022 г. и при умерени нива при изолати *Salmonella* от прасета за угояване (10,1%) и говеда на възраст под 1 година (12,7%) от данните, докладвани през 2021 г. В изолатите на *Salmonella* от хора, докладвани през 2022 г., общата резистентност към цiproфлoксацин е 18,7%, като наблюдаваните най-ниски нива в резистентността на монофазен *S. Typhimurium* са 9,6% и високи до изключително високи нива в *S. Infantis* (40,1%) и *S. Kentucky* (72,7%). Изключително висока резистентност към цiproфлoксацин също се съобщава в изолати *S. Kentucky* от бройлери (84,2%), кокошки носачки (82,1%) и пуйки за угояване (100%). При *S. Enteritidis*, най-честият серовар на *Salmonella*, изолиран от хора, резистентността към цiproфлoксацин е 22,8%. Тенденциите в резистентността при *Salmonella* изолати от хора, изчислени за 2013–2022 г., показват статистически значимо нарастване към цiproфлoксацин в девет страни и намаляващи тенденции в три, като увеличението е най-забележимо при *S. Enteritidis* (12 държави с нарастващи тенденции), но също и при *S. Typhimurium* и неговия монофазен вариант и в *S. Infantis*.**

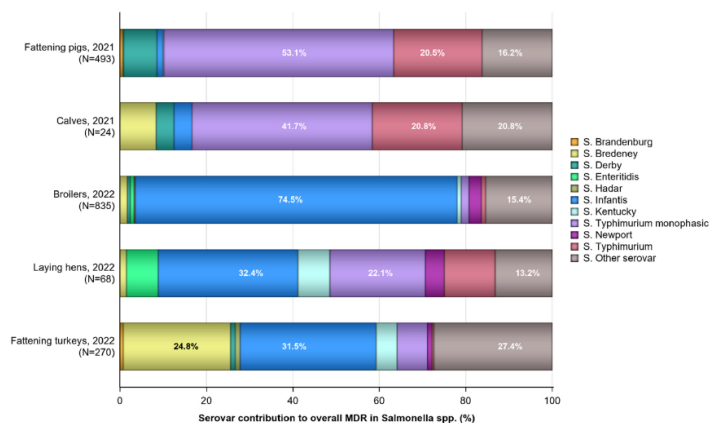
Резистентността към амикацин, новото вещество, включено в хармонизирания панел от 2021 г., е много ниска във всички животински популации с изключение на *Salmonella* spp. изолати от говеда под 1-годишна възраст, при които не е открита резистентност.

Цялостната резистентност към цефалоспорици от трето поколение е отбелязана на много ниски нива при изолати *Salmonella* от хора през 2022 г. (средно 1,4% резистентност към цефтазидим и 1,2% към цефотаксим), на много ниско ниво при кокошки носачки (0,2% резистентност към цефотаксим и цефтазидим) и прасета (0,9% резистентност към цефотаксим и цефтазидим) и при ниски нива в стада бройлери (1,4% резистентност към цефотаксим и 1,3% към цефтазидим), стада от пуйки (2,2% резистентност към цефотаксим и цефтазидим) и говеда под 1-годишна възраст (2,6% резистентност към цефотаксим и 1,3% към цефтазидим). Следователно, **общият дял на предполагаемите ESBL-/AmpC-продуциращи *Salmonella* spp. на ниво държава членка като цяло е много ниско или ниско през 2021 г. и 2022 г. сред всички популации от продуктивни животни, и много ниска при човешки изолати, въпреки че се наблюдава по-висока резистентност при специфични серовари на *Salmonella*.**

През 2021 г. и 2022 г. **няма *Salmonella* spp. изолати от животински/месен произход, които да са микробиологично устойчиви на меропенем.** Въпреки това, за разлика от 2021 г., когато не е докладвана резистентност към меропенем при *Salmonella* spp. изолати от хора, през 2022 г. **появата на резистентност към меропенем е рядка (< 0,1%),** като три държави съобщават за пет (от които четири са потвърдени) резистентни изолати.

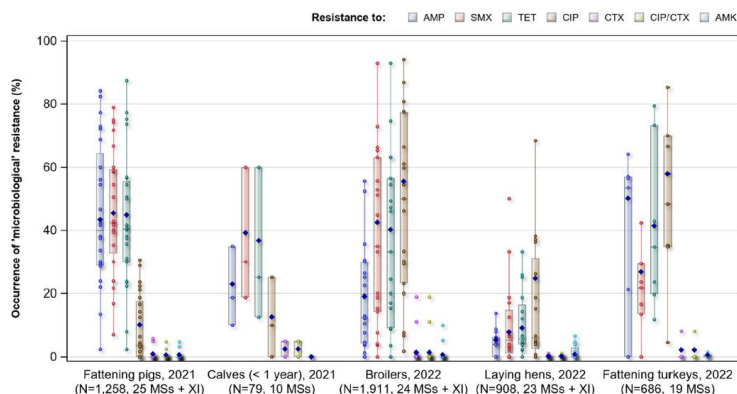
Като цяло комбинираната резистентност към флуорохинолони и цефалоспорини е много ниска ($\leq 1,0\%$) при изолатите *Salmonella* както от хора, така и от продуктивни животни, но по-висока при определени серовари на *Salmonella*, достигайки високи нива в изолати от *S. Kentucky* от бройлери (21,1%) и умерени нива в изолатите на *S. Infantis* от пуйки (16,9%). Съответните нива на *Salmonella* при хора са умерени при *S. Kentucky* (12,2%) и ниски при *S. Infantis* (5,9%).

Мултилекарствената резистентност (MDR) е като цяло висока (22,1%) сред *Salmonella* spp., изолати от хора в ЕС, вариращи от ниски нива сред *S. Enteritidis* (2,4%) до много високи сред *S. Kentucky* (63,7%) и монофазен *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:- (68,2%). По подобен начин, MDR се наблюдава при високи нива в *Salmonella* spp. изолати от бройлери и пуйки през 2022 г. (съответно 43,6% и 39,4%), и от прасета за угояване (39,1%) и говеда под 1-годишна възраст (30,4%) през 2021 г. *Salmonella* spp. изолати от кокошки носачки показват значително по-ниско ниво на MDR (7,5%). На ниво серовар, появата на MDR е сходна в човешките и животинските популации, с изключение на *S. Kentucky*, който средно показва по-висока поява на MDR при хора и при пуйки, отколкото при изолатите от други животни.

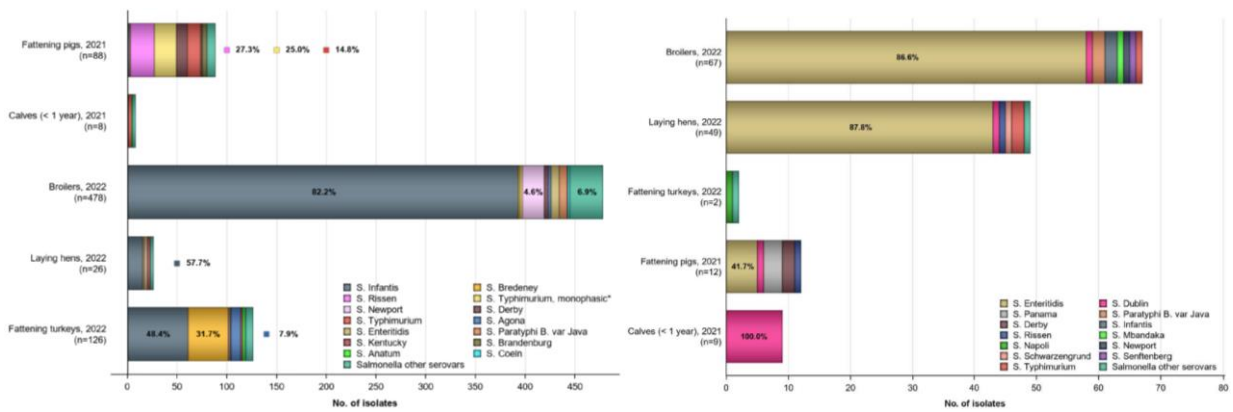


Процент изолати от най-често срещаните серовари на *Salmonella* spp. от продуктивни животни, проявяващи мултилекарствена резистентност

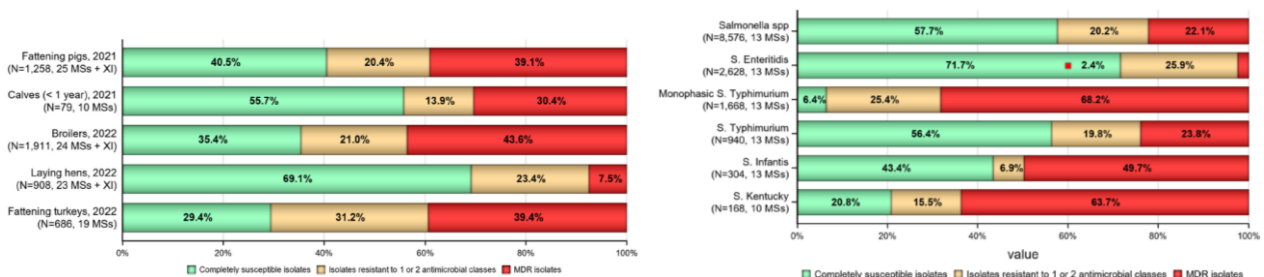
Като цяло през 2022 г. пълната чувствителност (CS) при *Salmonella* spp. изолати от хора се наблюдава при 57,7% от тестваните изолати. От данните за животни CS е висока за бройлери (35,4%) и пуйки (29,4%) и е установена на много високо ниво при кокошки носачки (69,1%). За данните от 2021 г. CS е висок при свине (40,5%) и много висок при говеда под 1-годишна възраст (55,7%). На ниво серовар *S. Enteritidis* има най-високи нива на CS както при хора, така и при всички видове продуктивни животни.



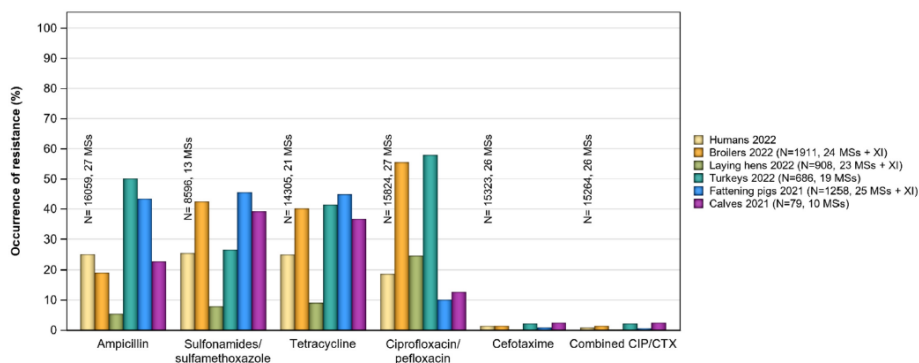
Резистентност към критично важни антимикробни средства при изолати *Salmonella* spp. от продуктивни животни за периода 2021 – 2022 г.



Брой тигециклин резистентни и колистин резистентни изолати от различни серовари на *Salmonella spp.* от продуктивни животни за периода 2021 – 2022 г.



Мултирезистентни и напълно чувствителни изолати *Salmonella spp.* от продуктивни животни и от хора за периода 2021 – 2022 г.



Поява на резистентност към избрани антимикробни средства на изолати *Salmonella spp.* от хора и продуктивни животни, по държави на ЕС/ЕИП за периода 2021 – 2022 г.

Антимикробна резистентност при *Listeria monocytogenes*

Тъй като в обхвата на годишния доклад за зоонозите, зоонозните причинители и антимикробната резистентност не са включени данни за нивата на резистентността при *L. Monocytogenes*, затова в този обзор са използвани данни от научната литература.

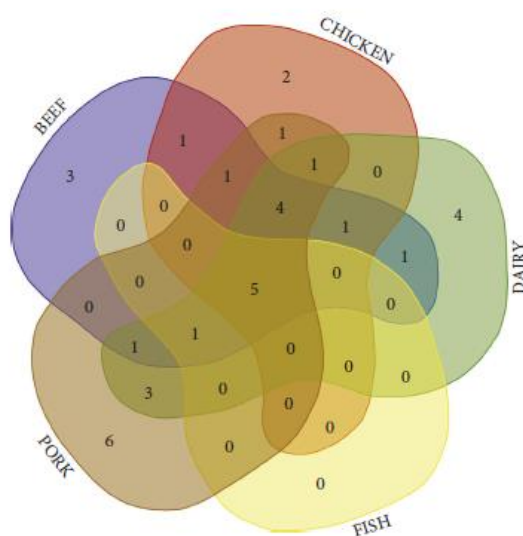
В световно признатото списание *The Lancet Regional Health Europe, Moura et. al.* са използвали масиви от данни от проведено секвениране, съчетани с фенотипна AMP оценка на *L. monocytogenes*, изолирани от клинични (n = 2908) и хранителни (n = 2431) проби във Франция и отвъд морските територии. Данните показват, че **няма увеличение на нивата на AMP и всички изолати (100%) показват чувствителност към ампицилин и амоксицилин, антимикробни средства от първа линия за лечение на листериоза.** Освен това авторите илюстрират висока точност (>99%) на целогеномното секвениране (WGS) при прогнозирането на AMP, заедно със свързаните генетични елементи като транспозони, профаги или плаزمиди. Освен това проучването показва, че докато придобитата

резистентност е рядкост (2,23%), тя е по-разпространена в изолатите от храни (3,74%), отколкото сред клиничните изолати (0,98%). По-специално, изолатите, носещи гените *bcrABC* и *emrC*, кодиращи резистентността към бензалкониев хлорид, показват по-високо ниво при придобитата резистентност (20,20% спрямо 7,20%).

Интересното е, че тези данни предоставят доказателства за ефикасност на настоящите лечения на листериозата. Въпреки това, последните световни проучвания показват увеличение на АМР, особено по отношение на аминопеницилините. Поради това високата точност, наблюдавана при прогнозирането на АМР, подчертава потенциалната ползност на WGS за рутинното наблюдение на АМР в *L. monocytogenes*. Досега WGS има висока точност при прогнозирането на АМР в патогенни причинители, изолирани от храни. *Nguyen et al.* са показали, че МІС може да се предвиди със средна точност от 95 %, в рамките на \pm 12-кратно разреждане. Високото разпространение на придобитата резистентност в изолатите от храни и в изолатите, носещи гените *bcrABC* и *emrC* повдига въпроси относно факторите, които влияят върху придобиването на гени, кодиращи антимикуробна резистентност (ARG), особено в изолатите от храни, а не в клиничните изолати. Освен използването на антимикуробни агенти във ветеринарните практики и производството на храни от животински произход, широкото използване на дезинфектанти може да допринесе за развитието на резистентност дори след забраната на употребата на антибиотици. Това подчертава потенциала за придобиване на ARG чрез механизми за съвместна и кръстосана резистентност при употреба на дезинфектанти, при наличие на замърсители на околната среда или при трансфер от различни вектори като бактериофаги.

В обстойно проучване на тема *Antimicrobial Resistance of Listeria monocytogenes from Animal Foods to First- and Second-Line Drugs in the Treatment of Listeriosis from 2008 to 2021: A Systematic Review and Meta-Analysis* на *Jaqueline Oliveira Dos Reis, Bruno Serpa Vieira, Adelino Cunha Neto, Vinicius Silva Castro, and Eduardo Eustaquio de Souza Figueiredo* са разгледани различни проучвания, свързани с резистентността при изолати *Listeria monocytogenes* от животни, хранителни матрици и други източници. За сравнение спрямо *Salmonella* spp. за анализ на нивата на резистентност са използвани отделни проучвания тъй като не е задължително в мониторинга на зоонозните патогени да се изследват нивата на АМР при листериите. Разгледани са 16 проучвания, които отговарят на всички критерии за допустимост и са включени в този мета-анализ. Проучванията обхващат общо 1152 изолата на *L. monocytogenes* от различни животински хранителни продукти (n = 572), производствена среда (n = 553) и живи животни (n = 27). Включените проучвания са в различни части на света: Южна Америка (n = 5), Европа (n = 4), Азия (n = 3), Африка (n = 2) и Северна Америка (n = 2). Проучванията от Европа обхващат най-голям брой изолати *L. monocytogenes* (n = 356), докато тези от Азия са най-малко количество (n = 128). Дискдифузия е най-използваният метод за тестване на антимикуробна чувствителност при *L. monocytogenes*. Общо 35 антимикуробни средства са оценени в целия набор от данни, 11 от тях класифицирани като лекарства от първа линия (амикацин, амоксицилин, ампицилин, гентамицин, канамицин, оксацилин, пеницилин, стрептомицин, сулфаметоксазол, сулфонамиди и триметоприм). Антимикуробните средства, тествани при по-голям брой изолати, са тетрациклин (800 изолата на *L. monocytogenes* в 10 различни проучвания) и клиндамицин (749 изолата *L. monocytogenes* в 8 различни проучвания). Амоксицилин, бензилпеницилин, цефаклор, цефепим, цефокситин, кларитромицин, енрофлоксацин, фусидин, имипенем, нитрофурантоин, сулфаметоксазол, сулфонамиди и ванкомицин са тествани при най-малък брой изолати (по-малко от 50 изолата *L. monocytogenes* всеки), с изключение на сулфонамидите, всички те са оценени само в едно проучване. Пълна липса на антимикуробна резистентност в проучвания (всички изолати на *L. monocytogenes*, изследвани като

чувствителни) е наблюдавана само към линезолид, оксазолидинон, анализиран в две различни проучвания в общо 238 изолата *L. monocytogenes* от производствени вериги за пилешко и говеждо месо. Използването на линезолид при лечението на листериоза обаче понастоящем е незначително. От данни от другите разгледани проучвания се заключава наличие на обща антимикробна резистентност (всички изолати на *L. monocytogenes* са тествани за резистентност) за амоксицилин (14 изолата на *L. monocytogenes*), бензилпеницилин (25 *L. monocytogenes* изолати), цефокситин (6 *L. Monocytogenes* изолати), фузидова киселина (25 *L. monocytogenes* изолати), имипенем (25 изолата на *L. monocytogenes*), сулфаметоксазол (15 изолати на *L. monocytogenes*) и ванкомицин (3 *L. monocytogenes* изолати). Всички тези лекарства са тествани в само едно проучване всяко. Фигурата по-долу показва разпределението на антимикробната резистентност (един или повече изолати *L. monocytogenes* са тествани за резистентност) между всички тествани изолати от производствените вериги за животински продукти. Изолатите от производствените вериги за свине и мляко са с по-високи нива на резистентност към повече от едно антимикробно средство ($n = 23$ и 21 , съответно). Изолатите на *L. monocytogenes* от риба и рибни продукти показват по-ниски нива на резистентност към по-малък брой антимикробни средства ($n = 6$). В този обзор са идентифицирани изолати *L. monocytogenes*, резистентни към пет и повече антибиотични средства (ампицилин, клиндамицин, еритромицин, тетрациклин и триметоприм), които са изолирани на всички етапи от производството - от животински изолати до изолати от хранителни продукти. Ампицилин и триметоприм се считат за лекарства от първа линия за лечение на листериоза.



Проучването посочва, че рискът от антимикробна резистентност при изолатите *L. monocytogenes* е по-висок ($p < 0,01$) за първа, отколкото за втора линия антимикробни средства - беше оценен по-висок риск с 25%. Не са получени значителни разлики в риска за антимикробната резистентност в изолати *L. monocytogenes* от Африка ($p = 0,07$), Азия ($p = 0,11$), Европа ($p = 0,77$) и Южна Америка ($p = 0,24$). Оценен е риска от развитие и разпространение на АМР за изолати *L. monocytogenes* от говеждо, пилешко и свинско и млечни продукти, както и при изолати от живи животни, така и в хранителните продукти от тях. Общо 10 антимикробни средства са тествани в проучвания в Северна Америка - три от тях (оксацилин, триметоприм и сулфаметоксазол) се считат за лекарства от първа линия за лечение на листериоза. С приблизително 4% по-високо разпространение на антимикробна резистентност към антимикробни средства от първа линия е наблюдавано в Африка. Липса на антимикробна резистентност се наблюдава при повечето изолати от Африка, но не при всички.

В същия научен преглед също е изследвана взаимовръзката на профила на антимикробна резистентност на *L. monocytogenes* с производствените практики и други характеристики, свързани с животинската производствена верига. Резултатите от прегледа на научната литература показва, че няма доказателства в подкрепа на тази взаимовръзка. Като цяло в литературата няма доказателства, че разпространение на антимикробна резистентност при *Listeria monocytogenes* изолирани от животински храни е по-висока за първа линия антимикробни средства от втора линия. Тази ситуация обаче е различна в Съединените щати, като с 25% по-високо е разпространението на резистентността към лекарства от първа линия. Освен това няма доказателства, че веригата за производство на животински продукти или други източници на изолация на *Listeria monocytogenes* влияят върху профила на антимикробна резистентност на този патоген. Важно е обаче да се подчертае, че поради малкия брой проучвания върху резистентността на *L. Monocytogenes* към антимикробни средства при риби и рибни продукти, нивата на антимикробна резистентност в производствената верига може да бъдат подценени. Следователно се насърчават по-нататъшни изследвания на изолати от риби и рибни продукти и нивата на AMP, за да се постигне по-реалистичен сценарий относно резистентността на *L. Monocytogenes*, които да дадат основание за предприемане на по-сериозни мерки за мониторинг, превенция и контрол на *L. Monocytogenes*, в изпълнение на *One Health* подхода, залагащ на взаимовръзката между ветеринарна медицина, хуманна медицина, животновъдство и околната среда.

В подкрепа на горесцитираното проучване на списание *Lancet*, в проучване на тема „*Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes: an observational study in France*“ на авторски колектив *Alexandra Moura, Alexandre Leclercq, Guillaume Vales, Nathalie Tessaud-Rita, H el ene Bracq-Dieye, Pierre Thouvenot, Yoann Madec, Caroline Charlier, and Marc Lecuit* е демонстрирана необходимостта от широкомащабни проучвания за изясняване нивата на антимикробната резистентност на хранителния патоген *Listeria monocytogenes* (Lm) и ефективността на възможностите за лечение на листериоза. Изследвани са моделите на антимикробна резистентност в Lm с течение на времето и са оценени взаимовръзките генотип-фенотип. Анализирани са 5339 Lm изолата (2908 клинични и 2431 хранителни изолати), събрани във Франция и прилежащите територии, между 2012 г. и 2019 г. Извършено е и секвениране на целия геном за всички изолати и профили на антимикробна резистентност. Антимикробната чувствителност към 22 антимикробни средства е определена за всички клинични изолати и в хранителни изолати с придобити резистентни гени. Всички тествани изолати са резистентни към най-малко 3 различни класа антимикробни средства, в съответствие с присъщите за Lm характеристики. Придобитата антимикробна резистентност при Lm е рядка (2,23% изолати) и е по-разпространена в хранителните изолати (главно линия II) в сравнение с клиничните изолати (главно линия I) (3,74% спрямо 0,98%, $p < 0,0001$) и при устойчиви на дезинфектанти и стресови фактори изолати (напр. *bcrABC*, 20,20% спрямо 7,20%, $p < 0,0001$), което предполага коселективна резистентност на изолатите от предприятията за производство на храни. Придобитата антимикробна резистентност може да бъде предвидена от геномното секвениране с висока точност (>99%), с изключение резистентността към ципрофлоксацин. Придобитите антимикробни фенотипове са към тетрациклини (най-вече поради *tetM*), триметоприм (*dfrD*), линкозамиди (*lnuG*), макролиди (*ermB*, *mphB*) и фениколи (*fexA*). Lm е естествено резистентен към определени антимикробни средства, като трето поколение цефалоспорини (напр. цефотаксим и цефтриаксон), монобактами (азтреонам) и оксацилини, основно поради липсата на подходящи пеницилин-свързващи протеини (PBP). Този патоген също така демонстрира присъща резистентност към първо поколение хинолони (налидиксова киселина),

фосфомицин и сулфонамиди, поради наличието на резистентни гени в основния му геном. Понякога се съобщава за придобита резистентност в Lm в резултат на придобиване на ген чрез хоризонтален генен трансфер от ентерококи-стрептококи или мутации в основни гени (M. F. Vicente, F. Baquero, J. C. Pérez-Diaz, *Conjugative acquisition and expression of antibiotic resistance determinants in Listeria spp.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 21, Issue 3, March 1988, Pages 309–318, <https://doi.org/10.1093/jac/21.3.309>). По-конкретно, придобитата резистентност в Lm се дължи на придобиването на гени, кодиращи резистентност (*tetM/tetS*), гени (*tetK/tetL*), придаващи резистентност към тетрациклин, алтернативни дихидрофолат редуктази (*dfrD/dfrG*), които заобикалят инхибиторния ефект на триметоприм, 23S рибозомни РНК метилтрансферази (*ermB*), които блокират свързването на еритромицин, и хлорамфеникол ацетилтрансферази (*catA*), които инактивират хлорамфеникол чрез добавяне на ацилова група. Освен това се съобщава също за мутации в Lm основни гени, които водят до намален афинитет на антимикробните средства към техния целеви ензим, което води до резистентност към цiproфлоксацин (*gyrAB/parC/lde* мутации), рифампицин (*rpoD*) или стрептомицин (*rrn*). Въпреки че секвенирането на целия геном се превърна в широко приет и рутинен инструмент за наблюдение на Lm, приложението му за прогнозиране на фенотипна антимикробна чувствителност не е доказано в изолати на Lm.

Acquired genotype ^a (%) N = 5339	No. isolates (%) N = 3290	No. genotypes (%) N = 3290	Genomic location or genetic context	Diameter of inhibition halo (mm)	MIC (µg/ml)	Source ^b (no. isolates)	Sublineage (Clonal Complex)	
							Lineage I	Lineage II
<i>aacA4</i> (<i>aac</i> (6')-Ib3)	49 (0.92%)	34 (1.03%)	Prophage	GEN: 21.3–28.6; KAN:20.5–26.5; STR: 13.9–17.6	n.d.	H (4), F (45)	SL3(CC3), SL5(CC5), SL9(CC9), SL31(CC31), SL312(CC31)	
<i>aphA</i> (<i>aph</i> (3')-IIIa)	10 (0.19%)	4 (0.12%)	Plasmid-borne transposon	GEN: 25.5–30.6; KAN:24.1–26.6; STR: 15.8–19.4	n.d.	F (10)	–	SL313(CC31)
<i>dfrD</i> , <i>lnuG</i> , <i>mphB</i>	1 (0.02%)	1 (0.03%)	Plasmid	TMP: 6.0; CLI: 13.7; ERY: 30.8	TMP: >32; CLI: 1.5; ERY: 0.25	F (1)	–	SL325(CC31)
<i>ermB</i>	5 (0.09%)	5 (0.15%)	Inc18 plasmid	ERY: 6.0–32.4	ERY: 0.125–>256	H (1), F (4)	SL4(CC4), SL386(CC388), SL5(CC5)	–
<i>fexA</i>	3 (0.06%)	2 (0.06%)	Chromosomal recombinase XerC	CHL: 10.7–25.0	CHL: 4–32	F (3)	–	SL14(CC14), SL415(CC415)
<i>tetM</i>	41 (0.77%)	23 (0.70%)	Transposon Tn916	TET: 6.0–31.0	TET: 0.125–64	H (19), F (22)	SL1(CC1), SL4(CC4), SL5(CC5), SL59(CC59)	SL399(CC14), SL18(CC18), SL199(CC199), SL20(CC20), SL7(CC7), SL16(CC8), SL9(CC9), SL91(CC14), SL11(CC11), SL325(CC31)
<i>tetM</i> , <i>tetL</i>	10 (0.19%)	2 (0.06%)	Transposon Tn916	TET: 6.0–10.2	TET: 48–64	H (5), F (5)	–	SL14(CC14)
<i>tetM</i> , <i>tetK</i>	1 (0.02%)	1 (0.03%)	Transposon Tn916	TET: 13	TET: 32	H (1)	SL5(CC5)	–

^aGene traits of antibiotic resistance towards aminoglycosides (*aacA4*, *aphA*), folate inhibitors (*dfrD*), lincosamides (*lnuG*), macrolides (*ermB*, *mphB*), phenicols (*fexA*), tetracyclines (*tetM*, *tetL*, *tetK*). ^bSource: H, human; F, food.

Доказани генотипове на антимикробна резистентност и свързаните фенотипове на изолати Listeria monocytogenes

Въпреки силните страни, подчертани в това проучване, **трябва да се обърне внимание на сложността на механизмите на бактериална адаптация към стресови фактори на околната среда, включително антимикробни средства**, като зависи от различни фактори (напр. време на контакт със стресови фактори). Следователно са **необходими по-задълбочени проучвания, обхващащи изолати за дълъг период от време, препоръчително е да се прогнозира ARG чрез WGS**, освен това са **необходими предишни задълбочени познания за резистентните генотипи и механизмите, водещи до резистентността към различни антимикробни средства**. Трето, **трябва да се анализират повече изолати от различни територии, за да се предостави точна информация за възможното предаване на AMP генотипове**.

Като се има предвид необходимостта от по-всеобхватни глобални стратегии за справяне с широкото разпространение на *L. monocytogenes* в страни и континенти, повлияно от обширните международни пътувания и търговия с храни, има належаща необходимост от ефективни мерки и ефективни, навременни и точни диагностични подходи. WGS демонстрира своята ефективност при предоставянето на точна информация относно основните генотипове, циркулиращи в хранителни и клинични проби, генотипна резистентност, показваща високо съответствие с фенотипна резистентност, и различните механизми, чрез които бактериите могат да придобият резистентни гени, като хоризонтален генен трансфер, геномни мутации, ко- и кръстосана резистентност. Освен това нарастващият брой налични геномни последователности в световен мащаб налага създаването на интегрирана база данни за международно наблюдение на *L. monocytogenes*. Тази база данни, базирана на данни от WGS и допълнена от представляващи интерес епидемиологични характеристики, ще се стреми да обедини или свърже съществуващите национални мрежи в по-представителна база данни. Тази база данни има потенциала да улесни споделянето, анализа и сравнението на данни от различни страни, да проследи пътя на разпространение на резистентни щамове *L. monocytogenes* и да разбере механизмите, чрез които те развиват и придобиват AMP в международен контекст. Освен това има нужда от установяване на междублабораторни тестове за потвърждаване на критичните нива на резистентност, разработване на методи и подходи за контрол на качеството за по-точни анализи и прилагане на хармонизирани методи за възпроизводими експерименти по целия свят.

Тъй като секвенирането на целия геном започна да заменя методите за фенотипно типизиране в националните референтни лаборатории, ECDC даде възможност за докладване на резистентност, изследвана чрез целогеномно секвениране от 2020 г. насам, а от 2023 г. ECDC насърчава страните да докладват необработените последователности на ECDC, за да позволят хармонизирана интерпретация на AST. ECDC е предоставила схеми за външна оценка на качеството (EQA) чрез договорна лаборатория за подпомагане на лаборатории в прилагането на препоръчаните методи за изследване и антимикуробни средства и получаване на висококачествени резултати от AST. Допълнителни дейности за изграждане на лабораторен капацитет, включително обучение на персонала, EQA схеми за WGS и мрежови дейности се предоставят чрез финансираня от HaDEA проект FWD AMR RefLabCap през 2021–2024 г.

От 2021 г. секвенирането на целия геном (WGS) е разрешено като алтернативен метод на конвенционалното фенотипно изследване за изолати ESBL-/AmpC-/CP-продуциращи *E. Coli*, за индикаторни комменсални *E. coli* и *Salmonella* spp. изолати, показващи резистентност към цефалоспорини с разширен спектър и карбапенеми. WGS също се препоръчва за изолати *Campylobacter*, показващи високи нива на фенотипна резистентност към еритромицин. WGS се извършва за момента само на доброволна основа; въпреки това са наложени специфични изисквания за прилагане на техниката WGS, за да се гарантира сравнимост на данните (EFSA, 2020 г.). Доброволното докладване на WGS данни от 2021 г. нататък за ESBL-/AmpC-/CP-продуциращи *E. coli* и изолати на *Salmonella*, както и включване на други важни за човешкото здраве патогени като *Listeria monocytogenes* ще улесни разбирането на потенциалния принос на продуктивните животни и производните им храни за тежестта и нивата на AMP при хората (EFSA, 2019).

С постоянно развиващите се биотехнологии се създават все повече и по-бързи, надеждни и прецизни методи в диагностиката на патогенните причинители, които надминават по предимства освен конвенционалните методи, също и WGS. Крайната цел на разработването на тези диагностични методи е да се получи една по-цялостна, по-информативна и по-точна „картина“ на патогенните причинители, изучаване на

разнообразните им механизми за приспособяване и оцеляване, охарактеризиране на факторите, гените и нивата на антимикробна резистентност, които всички цели ще спомогнат навременното и правилно вземане на решения и мерки за справяне с огнищата от хранителни заболявания, епидемиите и вътреболничните инфекции.

Нови методи за диагностика на *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes*

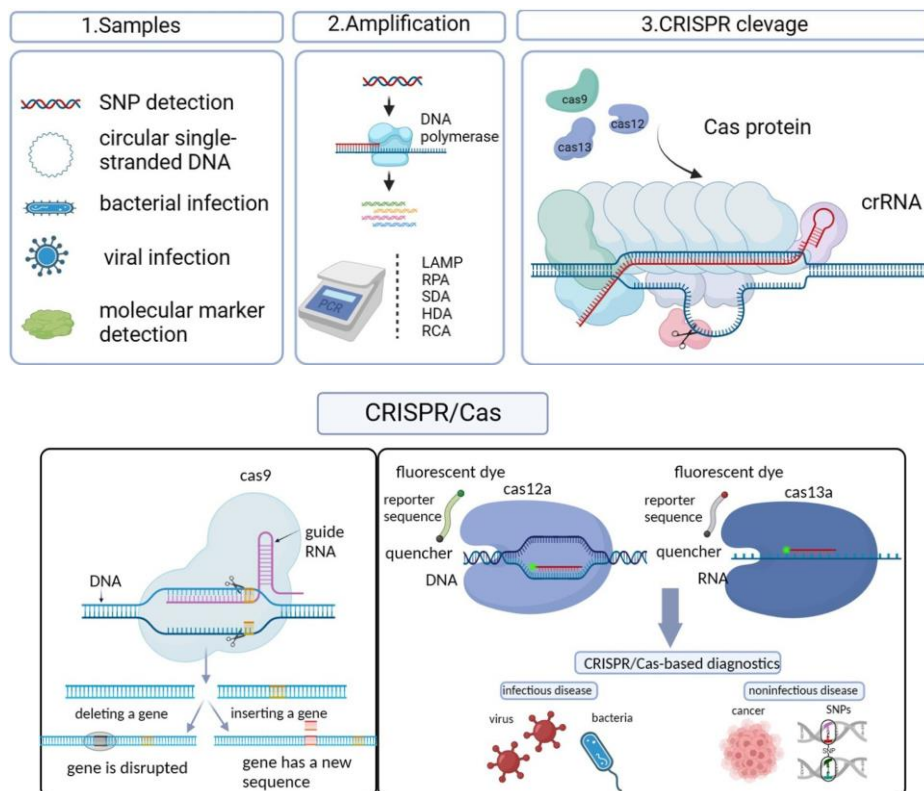
С все по-нарастващото разпространение на патогени като *Listeria monocytogenes* и *Salmonella* различни серовари не са достатъчни само класически методи в диагностиката. Методи като **култивиране на специфични клетъчни среди на бактериални патогени или имунологичните методи** са широко признати като „златен стандарт“ за откриване и доказване на патогени. Тези методи обаче **имат недостатъци: времеемки, трудоемки и неефективни**, които качества **значително възпрепятстват широкото им използване в клиниката**. Имунологичното откриване има известни предимства пред клетъчното култивиране по отношение на скоростта, простотата и специфичността при откриването на патогенни микроорганизми, но се изисква дълъг период от време за подготовка на антитела и има доста ниска чувствителност на откриване. Технологиите за откриване на нуклеинова киселина, за разлика от гореспоменатите методи, могат едновременно да отговорят на изискванията за точност, бързина и чувствителност за откриване на патогени, като по този начин показват превъзходство в осигуряването на безопасността на хората.

Тестовите с **намножаване на конкретни фрагменти от бактериалната нуклеинова киселина (*Nucleic acid amplification tests* - NAATs)** са най-широко използваната технология за детекция и доказване на бактериална нуклеинова киселина и са се превърнали в **незаменими инструменти**. Откакто **полимеразната верижна реакция (PCR)** стана широко използван метод в диагностиката и други области още през далечната 1980 г. (*Seemayer, 1990*), този инструмент **постоянно претърпява обновяване и усъвършенстване** като сега вече освен **PCR в комбинация се извършва или целогеномно секвениране или се прилага технологията *Clustered Regularly Interspaced Short Prepeats (CRISPR)-Cas*** в областта на откриването на патогени, която **предоставя бързина, надеждност, информативност, точност и прецизност на диагностиката**.

CRISPR - SeroSeq като инструмент за разкриване на различни серовари на *Salmonella* spp.

Точното откриване на всички серовари *Salmonella*, налични в една проба, е **важно условие в програмите за наблюдение мониторинг и контрол**. Настоящите протоколи за детекция са ограничени до откриване на преобладаващ серовар, а липсва идентификация на по-малко представени в пробата серовари. Алтернативен метод, наречен **CRISPR-SeroSeq**, **серотипизиране чрез секвениране на амплифицирани CRISPR спейсъри**, е използван за откриване на множество серовари в проба без необходимост от етап на клетъчно култивиране.

Основният принцип на този метод е представен на схемите от проучване на тема „*Combination of nucleic acid amplification and CRISPR/Cas technology in pathogen detection*“ на авторски колектив *Dandan Zeng, Jinlong Jiao and Tianlu Mo*:



Като част от придобитата имунна система при прокариотите, системата CRISPR/Cas защитава организма гостоприемник срещу нахлуването на екзогенни генетични елементи чрез унищожаване на чужда плазмидна или фагова ДНК и този процес е съсредоточен върху CRISPR последователности и Cas протеини (Paul and Montoya, 2020). По-конкретно, CRISPR последователността първо се транскрибира и обработва в къса crRNA, която насочва разпознаването на целевата ДНК. Cas протеините, известни като ендонуклеази, след това свързват crRNA, за да образуват РНК-протеинов комплекс. След по-нататъшно свързване с целевата ДНК под „ръководството“ на crRNA, cas протеините след това отрязват целевата ДНК, създавайки лууп/прекъсване в генната последователност. Поправката на ген чрез хомоложна рекомбинация или нехомоложно крайно свързване позволява редактиране на ген (Paul, Montoya, 2020; Liu et al., 2022).

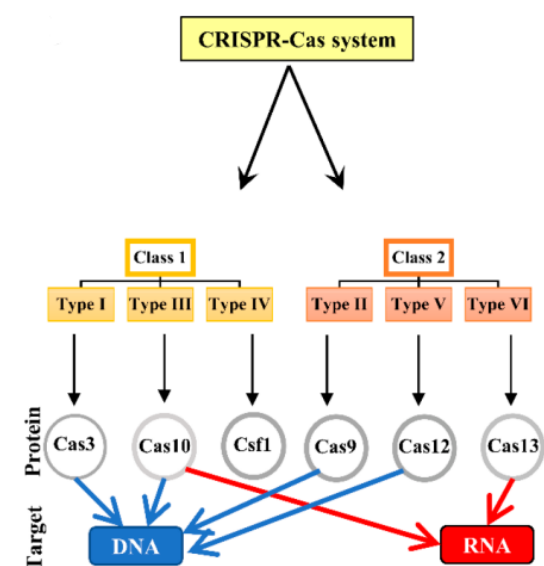


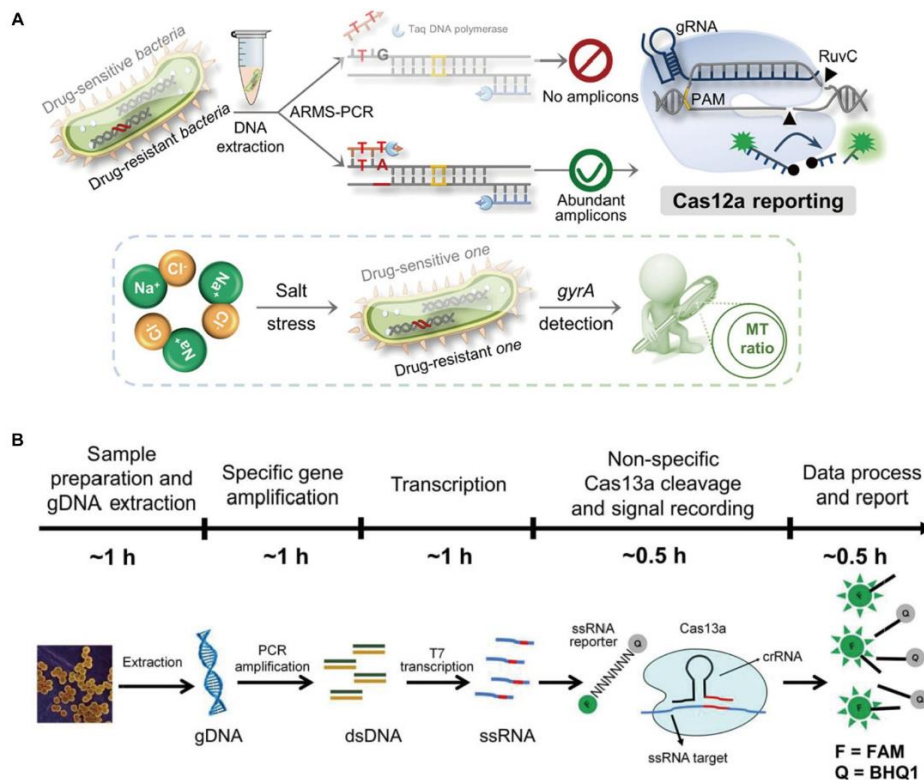
Схема на по-известните cas протеини и системата CRISPR-cas, класификацията им според афинитета им към ДНК или РНК

Групираните къси палиндромни повтори (CRISPR) - свързани с cas системи се наблюдават естествено в 45% от бактериалните геноми (Grissa et al., 2007), включително и в генома на *Salmonella*. Доказано е, че системите CRISPR-Cas осигуряват адаптивен имунен отговор на бактериите към бактериофаги и плаزمиди (Bhaya et al., 2011; Wiedenheft et al., 2012). Те включват три основни характеристики: набор от cas гени, лидерна последователност и CRISPR масив. CRISPR масивът или спейсърният масив е съставен от директни повтарящи се последователности, които са разпределени с уникални спейсърни последователности, които обикновено са получени от мобилни генетични елементи като бактериофаги и плазмиди (Barrangou et al., 2007; Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005; Pourcel

et al., 2005). Богатата на А-Т лидерна последователност се намира нагоре по веригата на всеки масив и се смята, че функционира като промотор (*Jansen et al.*, 2002; *Pul et al.*, 2010). **Спейсерният масив се транскрибира и обработва в малки CRISPR РНК (crRNA)**, всяка от които се състои от спейсера, ограден/фланкиран от части от повторите. **В комбинация с някои cas протеини, crRNA е насочена към комплементарни нуклеинови киселини**, като например нахлувайки в генома на фага, което води до **деградация на таргетната ДНК** (*Garneau et al.*, 2010). Системите CRISPR-Cas се адаптират чрез придобиване на нови спейсъри в проксималния край на лидерната последователност (*Barrangou et al.*, 2007), осигурявайки полярност на масива с по-стари спейсърни последователности, разположени в дисталния край на лидерната последователност, и по-нови спейсъри, които са най-близо до водещите последователности (*Horvath et al.*, 2008; *Pourcel et al.*, 2005). Сродните спейсърни последователности в целевата нуклеинова киселина се наричат протоспейсъри. Отличителни белези на адаптивен имунен локус включват запазени *cas* гени, лидерни последователности и CRISPR масиви, които се различават между отделни, но тясно свързани бактериални изолати поради скорошно придобиване на спейсър.

Wang et al. (2023) са разработили метод, който може да открие наличието на терминатори в трансгенни растения, използвайки комбинация от PCR и CRISPR/Cas12a техники. Методът може да се използва за идентифициране на нивата на целевия ген за около 50 минути. *Yang et al.* (2022) интегрира системата CRISPR/Cas за амплификация на мутантната система qPCR (ARMS-qPCR) за откриване на единичен нуклеотиден полиморфизъм (SNP) в *Salmonella enterica*. Резултатите от прилагане на новоразработения метод показват, че той може да се използва за анализиране на различните гени, които участват в резистентността на бактериални патогени като *Salmonella* към лекарства (*Yang, H., Yang, S., Xia, X., Deng, R., Gao, H., and Dong, Y.* (2022). *Sensitive detection of a single-nucleotide polymorphism in foodborne pathogens using Crispr/Cas12a-signaling Arms-Pcr*. *J. Agric. Food Chem.* 70, 8451–8457. doi: 10.1021/acs.jafc.2c03304).

Cas13a протеинът проявява РНКазна активност, която може да бъде активирана чрез crRNA-медирано разпознаване на целева РНК. Тази функция позволява **комбинаторно използване на *cas13a* активност и изотермална амплификация**. Поради програмируемостта на crRNA последователността и спин-оф ефекта на протеина *cas13a*, *Zhou et al.* (2020) са разработили базиран на CRISPR/Cas13a диагностичен метод за директно откриване на *Staphylococcus aureus* (CCB) след PCR амплификация с висока селективност. Резултатите показват, че CCB анализът е в състояние успешно да докаже целева геномна ДНК (gDNA) до 10^0 Am с LOD от 1 cfu/mL, а динамичният диапазон на откриване на *S. aureus* е $10^0 \sim 10^7$ cfu/mL.



Схематично представяне на анализа ARMS за разграничаване на видовете *Salmonella enterica* с разделителна способност - единичен нуклеотид и изследване на устойчивостта на резистентни на лекарства *S. enterica* към солеви стрес (Yang et al., 2022); (B) диагностика на *Staphylococcus aureus* чрез CCB (Zhou et al., 2020).

Въпреки широкото приложение на PCR техниките, а в последните години и в комбинация с CRISPR/Cas техниката за молекулярно откриване, необходимостта от етап на термичен цикъл по време на PCR значително възпрепятства използването му за откриване на конкретен локус в реално време. Изотермичната амплификация на нуклеинова киселина е заобиколила необходимостта от прецизен термичен цикъл при конвенционалния PCR и следователно може да завърши процеса на амплификация за по-кратко време, като същевременно поддържа висока ефективност, чувствителност и точност. **Основните изотермични технологии за амплификация включват главно: *Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)*, *Recombinase Polymerase Amplification (RPA)*, *Strand Displacement Amplification (SDA)*, *Helicase Dependent Amplification (HDA)*, *Rolling Circle Amplification (RCA)*, *Hybridization Chain Reaction (HCR)* и др.** Като се имат предвид присъщите ограничения на изотермичната амплификация, **системата CRISPR/Cas може да служи като високоспецифичен метод за идентифициране на нуклеинови последователности, а комбинираното използване на изотермична амплификация и CRISPR/Cas техники може значително подобряват точността на резултатите от теста.**

LAMP-CRISPR

Технологията LAMP в комбинация с CRISPR/Cas9 е пригодена така, че да се синтезират вътрешни праймери в независими от целта региони, така че продуктът на LAMP да съдържа *in-situ* локус на съседен мотив (PAM) за CRISPR/Cas9 за разпознаване и разцепване. Базиран на LAMP-CRISPR/Cas12a биосензор е разработен и използван от Lee and Oh, 2023 за откриване на *Salmonella* с LOD от $1,22 \times 10^0$ CFU/mL. Също така Wang et. al., 2021 комбинира RT-LAMP с Cas12a за откриване на SARS-CoV-2 и е доказано, че една молекула може да бъде открита за 45 минути, което показва кратко време за откриване, висока чувствителност и съпоставимост на резултатите. Този експериментален метод

работи с висока производителност и ефективност и за проби от отпадни води. *Li et al., 2022* проучват **LAMP-базиран CRISPR/Cas12a метод (ICB-LAMP-CRISPR/Cas12a)** с усъвършенстван **Immunocapture Magnetic Beads (ICB)** за бързо визуализиране и откриване на *Campylobacter jejuni*. Резултатите сочат, че *Campylobacter jejuni* може да бъде открит до **8 CFU/mL**. Методът **RT-LAMP-CRISPR-Cas13a**, разработен от *Ortiz-Cartagena et al. 2022* не изисква екстракция на РНК и може да се използва за откриване на вируси SARS-CoV-2 в назофарингеални проби със **100% специфичност и 83% чувствителност**.

RPA-CRISPR

RPA е нов метод за термостатична амплификация, разработен от *Piepenburg et al., 2006*, като е използвана протеинова рекомбинация и поправка на протеини, участващи в синтеза на клетъчна ДНК. От създаването си преди повече от 10 години, **RPA се използва широко при изследване на бактерии, гъби, паразити, вируси, гени за резистентност към лекарства и други**. В сравнение с традиционната PCR технология, диапазонът на откриване на тази технология е при **37°C - 42°C**, необходимата концентрация на пробата е ниска, може да бъдат амплифицирани само **1-10 ДНК копия за 10 минути**, но могат да се амплифицират множество различни цели, включително РНК, miRNA, ssDNA и dsDNA. RPA реакциите могат да бъдат открити чрез флуоресценция в реално време, гел електрофореза, хемилуминисценция и други методи. *Xiong et al., 2021* е използвал комбинация от **RT-RPA и CRISPR/Cas9** за диагностика на SARS-CoV-2. Анализът на 64 клинични проби показва, че чувствителността е **100%**, а специфичността е **97,14%**. *Liu et al., 2021* използва метода **RPA-Cas12a-FS** за откриване на патогени в храните. Екипът на *Tian et al., 2021* комбинират техниката **RPA-Cas12a** с имуноанализ, като по този начин показват метод за бързо откриване на *L. monocytogenes*. В допълнение, те са разработили метод за едновременното откриване на четири патогенни бактерии с висока чувствителност и специфичност, която може да достигне **10 CFU/mL**. Бъдещото развитие на тази технология има голям потенциал и може да се приложи за бързо откриване на патогени, пренасяни с храни, което е от голямо значение за осигуряване на безопасността на храните. Екипът на *Zhou et al. 2023* съчетава технологията **RPA и CRISPR**, за да обезпечи бързо и рентабилно откриване на множество HPV подтипове, като технологията може да открие HPV16 и HPV18 за по-малко от 30 минути с висока специфичност и чувствителност.

SDA-CRISPR

SDA е иновативна методология за амплификация със значителен потенциал за множество видове биосензори, включващи колориметрия, флуоресценция и хемилуминесценция (*Wang et al., 2022*). Например комбинирането на флуоресцентно откриване в реално време с SDA осигурява ултрачувствително откриване на охратоксин А с LOD от **0,01 ng/mL** (*Guo et al., 2022*). *Zhou et al., 2018* използват метод, наречен **CRISPR-Cas9-активиран ендонуклеаза-медиран сигнално-усилен ДНК анализ (наричан CRISDA)**, който ефективно амплифицира и открива двойноверижна ДНК (dsDNA) и с висока чувствителност. Изследователите *Wang et al. (2022)* са разработили колориметрична сензорна платформа, която комбинира SDA с CRISPR/Cas12a за откриване на серумен простатен специфичен антиген (PSA). Платформата е в състояние да прави разлика между кръвни проби от пациенти с рак на простатата, пациенти с други видове рак и здрави индивиди. PSA позволява на SDA да произвежда ампликони, които се разпознават от системата CRISPR-Cas12a и ще медиират разцепването на транс ssDNA на съседната лигирана ДНК, като по този начин активират златните наночастици (AuNPs), които сигнализират сондата и отчитането е колориметрично с LOD от **0,03 ng/mL**. *Gong et al. (2021)* съобщават за метод **CRISPR-Cas12a**, в комбинация с SDA, за колориметричен анализ на вирусни нуклеинови киселини (например вируса на хепатит В). *Chi et al. (2022)* комбинира SDA с

Cas14 за откриване на циркулиращи miРНК, биомаркер на холангиокарцином с чувствителност до 680 fM в рамките на 1 час.

HDA-CRISPR

HDA технологията симулира *in vivo* репликация на ДНК чрез използване на деконюгиращи ензими за разкриване на двойноверижната структура на ДНК, праймери за свързване към едностранната целева последователност, синтезиране на новата двойноверижна ДНК под действието на ДНК полимераза и повторение на стъпките на амплификация. **Термофилна ензим-зависима амплификация (tHDA) в комбинация с CRISPR/Cas12a специфично открива фактора на вирулентност *stx2* на *E. coli* O157:H7, елиминирайки фалшиво-положителните резултати, генерирани от праймерни димери, дължащи се на свързването на crRNA и Cas12a към мишената, и откриване на *E. coli* O157:H7 в храни до 10³ CFU/g (Kim et al., 2023).**

RCA-CRISPR

RCA е анализ на нуклеинова киселина, създаден, за да имитира естествения процес на репликация на кръгова микробна ДНК, действайки върху кръговата ДНК молекула, а малките циклични олигонуклеотиди действат като шаблони за ДНК или РНК полимеризи за генериране дълги и повтарящи се последователности (He et al., 2019). Qiu et al., 2018 изследват нов **RCA-CRISPR-split-HRP** метод, конструиран от синтетични биологични компоненти. Тази технология позволява **удобно откриване на miРНК с много висока чувствителност и специфичност в рамките на една нуклеобаза. Целият процес не отнема повече от 4 часа, лесен е за работа и не изисква голямо оборудване.** Abnous et al. (2021) комбинират **CRISPR-Cas12a, RCA и AuNP**, за да въведе аптамерен сензор за **високочувствително откриване на афлатоксин**. Добавянето на T4 ДНК лигаза и phi29 ДНК полимераза в присъствието на мишената води до инактивиране на системата за редактиране на ген CRISPR-Cas12a и образуването на по-големи едностранни ДНК структури на повърхността на AuNP.

HCR – CRISPR

Dirks and Pierce (2004) представят **HCR, вид изотермична и без ензими технология за амплификация на нуклеинова киселина. HCR набира популярност в биотехнологиите, съдебната медицина и откриването на инфекциозни заболявания.** HCR със своите уникални свойства на изотермична, без ензими и с висока ефективност амплификация се използва широко в биосензорите и биомедицинските сектори поради отличните си аналитични способности и широк потенциал за приложение (Zhou et al., 2021).

Системите CRISPR/Cas привлякоха вниманието на все повече екипи от учени и то не за разработка на генни редакции в различни целеви организми, а за **разработка на диагностични методи и точно, и с висока чувствителност и специфичност откриване на нуклеинови киселини.** Например базиран на **CRISPR/Cas12a биосензор със забележителна чувствителност е способен да открива синтетични ДНК мишени при граница на откриване от 3 pM и може също да открива плазмиди с едно копие.** Тези проучвания демонстрират високата точност на теста за HPV, постигайки съответно чувствителност от 88,89% и специфичност от 100% при практическо приложение, което показва неговата превъзходна точност. Xing et al., 2020 използва комбинация от **HCR амплификация и CRISPR-Cas12a, и са разработили теста apta-HCR-CRISPR за директно, високочувствително откриване на туморни протеини (TEV).** Qiao et al., 2023 създават метод за откриване без амплификация за *Salmonella* чрез магнитно разделяне на поливалентни аптамери на HCR с двойна функция със активна CRISPR/Cas12a система. В системата за откриване, двуфункционалните HCR поливалентни аптамери с висок афинитет

на свързване и специфичност първо са приготвени чрез сглобяване на няколко специфични за *Salmonella* аптамери върху дългите HCR продукти. В допълнение към повишената чувствителност и специфичност на теста **HCR-Multiapt** също така съдържа много повтарящи се CRISPR-насочени ДНК единици в HCR, което може да задейства транс-срязващата активност на Cas12a в присъствието на целевите бактерии и така да се усилва бактериалния сигнал при отчитане. Този метод може да открие *Salmonella* в диапазон от $10^0 \sim 10^7$ CFU/mL с граница на откриване от 2 CFU/mL. Този метод, който притежава висока чувствителност, може ефективно да се използва за клинична диагностика. Системата CRISPR-Cas13a и последваща амплификация без ензими може да се използва в анализ за откриване на SARS-CoV-2.

Други техники за изотермична амплификация – CRISPR

В допълнение към горните широко използвани изотермични технологии за амплификация, има много изотермични технологии, които се изследват и подобряват постоянно. Ензимната рекомбиназна амплификация (ERA) е новоразработена технология, която разчита на рекомбиназа, получена от бактериофаги, може да заменя аминокиселини на специфични места, има добра скорост и специфичност на амплификация, като комбинацията ERA с Cas12a води до постигане на висока чувствителност на откриване на свински цирковирус (Zhang et al., 2021). Изотермалната амплификация на нуклеинова киселина в реално време (SAT) е комбинация от изотермална амплификация с отчитане на флуоресценция в реално време, като при дизайн на специфични праймери за целевата нуклеинова киселина на патогени, може бързо да детектира *Mycoplasma pneumoniae* с висока чувствителност и специфичност (Barreda-García et al., 2018; Li et al., 2019). Технологията NASBA усилва таргетната РНК при определени температурни условия чрез използване на едноверижна РНК като матрица за имитиране на механизма на репликация на ретровирусите *in vivo* чрез обратна транскриптаза, РНКазата H и T7 РНК полимераза, в комбинация със специфични прави и обратни праймери. T7RNA полимеразата разпознава ДНК промоторната последователност и я транскрибира в едноверижна РНК за следващия цикъл (Hønsvall u Robertson, 2017; Ju et al., 2021). Wang et al., 2021 използва технологията NASBA за диагностика на криптококова болест с LOD от 10 CFU/mL. Pardee et al., 2016 проектира специфичен сензор на база същата технология за откриване и доказване на Зика вирус, с резултат на директно откриване от 2,8 fM РНК на Зика вируса от заразен серум от *Rhesus macacus*. Резултатът може да се отчете и с невъоръжено око поради цветната реакция, намалявайки разходите за специфично оборудване. Новата технология за изотермична амплификация на нуклеинова киселина (Exo-NAT), в комбинация от екзонуклеаза и Bst ДНК полимераза, разработена от Ye et al. (2018), вече се използва за детекция на ротавируси, астровируси и аденовируси с до 100% специфичност и чувствителност. Други техники за детекция са: *Hairpins Mediated Amplification* (HMA), разработена от Hongbo et al. (2022) комбинира LFD за откриване на специфични продукти на амплификация и намаляване на сигнала на неспецифична олигонуклеотидна хибридизация; изотермична експоненциална амплификация (EXPAR) на мишени в буферни системи, съдържащи dNTP, праймери и шаблони за амплификация, като разчита на синергичното действие на никеаза и ДНК полимераза (Mok et al. , 2016; Reid et al., 2018); новаторска изотермична експоненциална реакционна стратегия, базирана на CRISPR/Cas9, за бързо и специфично за мястото откриване на нуклеинова киселина, като CRISPR/Cas9 с експоненциална амплификация генерира множество ДНК ампликони, които се откриват чрез флуоресцентен мониторинг в реално време; комбинация от изотермични NAAT и технологията CRISPR/Cas, създадени от Dueñas et al., 2022

Въпреки простотата, ниската цена и високата точност на новите CRISPR-Cas биосензори, **синергичното използване на базирани на CRISPR-Cas двойни системи за амплификация за бърза диагностика на патогени все още е рядко.**

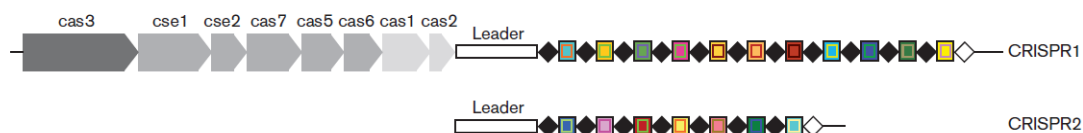
Откриването на технологията CRISPR/Cas предоставя **осъществима алтернатива на PCR технологията.** Междувременно **прилагането на системата CRISPR/Cas предоставя и нови идеи и методи за оптимизиране и подобряване на PCR технологията.** За да преодолее недостатъците на PCR, изследователите са проучили нови техники за молекулярно изследване чрез комбиниране на PCR технология с CRISPR/Cas технология и чрез по-нататъшно подобрене и оптимизиране технологията се използва широко в много области и има голямо въздействие (*Rakshit et al., 2022; Zhang et al., 2022; Cao et al., 2023; Meng et al., 2023; Tian et al., 2023*).

В проучване на тема „*Application of a CRISPR Sequence-Based Method for a Large-Scale Assessment of Salmonella Serovars in Ontario Poultry Production Environments*“ на авторски колектив *Matthew W. Quinn, Nicola F. Linton, Carlos G. Leon-Velarde, Shu Chen* методът **CRISPR-SeroSeq** успешно е открил **34 от най-често съобщаваните серовари на *Salmonella* в чисти култури и целеви серовари при 10^4 CFU/mL в 27 отрицателни за *Salmonella* проби от околна среда, обогатени след това с един от 15 различни серовара, плюс 2 допълнителни серовара при 1 log CFU/mL по-високо изобилие.** Когато методът е приложен към 442 естествено замърсени проби от околната среда, събрани от 192 птицеферми, са открити 25 различни серовара в 430 от пробите. В **73,1% от пробите са открити 2 до 7 серовара, с най-разпространени във фермите: *Salmonella* Kiambu (55,7%), *Salmonella* Infantis (48,4%), *Salmonella* Kentucky (27,1%), *Salmonella* Livingstone (26,6%) и *Salmonella* Mbandaka/Montevideo (23,4%).** Единични изолати от 384 проби също са анализирани с помощта на традиционен метод за серотипизиране и същият серовар, идентифициран чрез клетъчно култивиране, е открит от CRISPR-SeroSeq в 96,1% (369/384) от пробите, като при първите липсва откриване на допълнителни и понякога критични серовари. Данните от наблюдението, получени чрез **CRISPR-SeroSeq, разкриват значителна поява на *Salmonella* Kiambu и *Salmonella* Rissen в птицеферми в Онтарио.** Резултатите подчертават **ефективността на подхода CRISPR-SeroSeq при откриване на множество серовари на *Salmonella* в проби от средата за отглеждане на домашни птици, предоставяйки актуализирана информация за наблюдение на серовари на *Salmonella* в птицеферми в Онтарио.**

Методът CRISPR-SeroSeq представлява **алтернативен и иновативен молекулярен инструмент на традиционния метод за серотипиране, базиран на клетъчно култивиране, който може да открие множество серовари на *Salmonella* в проба и да предостави бързи резултати от серовари без необходимост от селективно набогатяване и клетъчно култивиране.** **Прилагането на този иновативен метод при рутинно наблюдение на салмонела в птицеферми и при разследвания на огнища може да улесни оценката на риска и може да спомогне вземането на навременни и адекватни мерки за справяне с разпространението на този патоген.** Прилагането на метода може да повиши **точността на текущата информация за разпространението на конкретен серовар.** Резултатите подчертават **ефективността на валидирания метод и необходимостта от мониторинг на серовари *Salmonella* в средата за отглеждане на домашни птици, за да се подобрят текущите програми за наблюдение.** Актуализираните данни от наблюдение предоставят навременна информация за появата на различни серовари на *Salmonella* в птицеферми в Онтарио и подкрепят оценката на риска от поява и циркулация на *Salmonella* и управлението на риска във фермите.

В друго проучване по темата „*Characterization and evolution of Salmonella CRISPR-Cas systems*“ на авторски колектив *Nikki Shariat, Ruth E. Timme, James B. Pettengill, Rodolphe*

Barrangou and Edward G. Dudley са изследвани групирани къси палиндромни повторения (CRISPR), свързани с *cas* системи, които се наблюдават естествено в 45% от бактериалните геноми, включително и в генома на *Salmonella*. *Salmonella* има два CRISPR локуса, CRISPR1 и CRISPR2, разделени от ~16 kb и които споделят една и съща консенсусна повтаряща се последователност (29nt); спейсърите са с дължина 32 nt. При *Salmonella* е доказано, че огромното мнозинство от CRISPR алелни полиморфизми в рамките на серовар възникват от делеция или дублиране на директни повтарящи се спейсърни последователности, а не от придобиване на нови спейсъри (*Fabre et al., 2012; Liu et al., 2011a; Shariat et al., 2013*). Има осем *cas* гена, *cas3*, *cse1*, *cse2*, *cas7*, *cas5*, *cas6*, *cas1* и *cas2*, които са характерни за тип I-E CRISPR-Cas система (*Makarova et al., 2011*). Към днешна дата CRISPR локусите от няколко изолата на *Salmonella* са анализирани с цел разработване на протоколи за подтипизиране или за по-добро разбиране на филогенезата на *Salmonella*. Използвайки комплекти от цели геноми, *Pettengill et al. (2014)* са предоставили обстоен поглед на **биологията на CRISPR-cas в *Salmonella* в 64 серовара**, показвайки **два различни профила на *cas* ген и голямо разнообразие в дължината на двата CRISPR масива между различните серовари**. Чрез използване на геномен анализ на секвенциите на няколко отделни изолата на четири клинично значими серовара на *Salmonella*: Enteritidis, Typhimurium, Newport и Heidelberg, целта е била да се получи по-задълбочено еволюционно разбиране на всички компоненти на системата *Salmonella* CRISPR-Cas. Данните от тези проучвания показват, че и двата *cas* оперона и лидерните последователности са добре запазени във всички серовари, както и масивите, по отношение на спейсърното съдържание и организация при *Salmonella*. Наблюдава се липса на придобиване на допълнителни спейсъри и малък брой протоспейсъри, идентифицирани в последователностите на бактериофаги и плазмиди, което предполага, че тези елементи не осигуряват имунна функция в *Salmonella*.



Схематично представени двата локуса на CRISPR-cas при *Salmonella*. На фигурата също са показани по продължение на веригата *cas* кодиращите локуси, като *cas 1* и *cas 2* кодиращите гени са универсални за всички CRISPR-cas системи; с шарени квадратчета са представени всички спейсърни последователности. Терминалните повтори са изобразени като прозрачни ромбове.

Основната цел на това проучване е да предостави задълбочен анализ на системата I-E CRISPR-Cas в *Salmonella*. Данните от проучването показват, че на ниво серовар всички CRISPR-Cas елементи са изключително запазени. Освен приликите между серовар Typhimurium и Heidelberg, сравнението на лидерни последователности и *cas* гени във всичките четири серовара подчертава високо ниво на консервативност. Това проучване представя някои нови прозрения за еволюцията на CRISPR последователностите в *Salmonella* изолатите по отношение на водещите последователности и организацията на директни повторения в рамките на масивите. Учените потвърждават, че нови спейсъри изглежда не са придобити от *Salmonella*, особено като се има предвид, че тези изолати са събрани за период от 5 години от различни места. В допълнение, е предоставен цялостен анализ на идентифицираните протоспейсъри. Идентифицирани са 129 отделни CRISPR масива, 61 за CRISPR1 и 68 за CRISPR2, общо и те съдържат **179 уникални последователности**. От гледна точка на определяне на серотипа, **идентифицирането на спейсъри, които са уникални за даден серовар, може да бъде полезно за проектиране на специфични за серовар анализи с висока производителност** (*Fabre et al., 2012*). Сравнението на *cas* генни последователности

между серовари показва, че има значителна консервативност. Например три *cas* гени са 100% идентични между серовар Туrphimurium и Heidelberg и два други, *cas1* и *cas7*, имат съответно един и два SNP разлика. За анализа са избрани геномни секвенции на серовар Туrphimurium като референтни; **няколко SNP се споделят между поне два от сероварите, например в *cas3*, *cas5*, *cas6* и *cas1*. При различните серовари (с изключение на серовар Heidelberg и Туrphimurium CRISPR2), спейсерният състав е различен.** Данните от проучването подкрепят хипотезата, че *Salmonella* се сдобиват в исторически план с мобилни генетични елементи и фагови последователности. В това проучване е осигурена цялостна характеристика на *Salmonella* CRISPR-Cas системата в четири преобладаващи клинични серовара. Откритията предполагат, че от имунна гледна точка, *Salmonella* CRISPR-Cas в един момент е била активна, но вече не е такава. Въпреки това, **запазването на техните компоненти, както между изолатите от един серовар, така и в различни серовари, показва, че тези локуси може да бъдат използвани като алтернатива на конвенционалните диагностични методи за *Salmonella*.** Също така е демонстрирано, че системите CRISPR-cas имат алтернативни функции например в образуването на биофилм от страна на бактериите като защитен механизъм, предизвикване на инфекция в разнообразни гостоприемници, симбиотична колонизация и др.

В скорошна поредица от уебинари на *Anitox* са обсъдени резултатите от скорошно проучване, публикувано в *Journal of Food Protection*, „Популационните анализи разкриват, че методът на предварително обогатяване и селективната среда за обогатяване влияят върху сероварите на *Salmonella*, изолирани от трупове на бройлери.“ Проучването изследва циркулиращите серотипове *Salmonella* при продуктивни животни, с акцент върху домашните птици, използвайки молекулярни маркери в *Salmonella*, наречени CRISPR, а техниката - „**CRISPR-SeroSeq**“ (серотипизиране чрез секвениране на CRISPR локуси). CRISPR-SeroSeq е базиран на инструмент за секвениране от следващо поколение на конкретни ампликони, който **позволява откриването на всички серотипове, присъстващи в смесена проба.** Техниката се съсредоточава върху идентифицирането на **CRISPR спейсъри, за да се определи кои серотипове *Salmonella* присъстват в пробата, и също така позволява да се преброи колко пъти се появява спейсъра в пробата, което помага да се определи относителната честота на серотипа в пробата.** CRISPR-SeroSeq е особено ефективен, защото е **чувствителен и по този начин може да открие много малки количества от конкретен серотип, което не би могло да бъде постигнато с помощта на конвенционални методи.** Гледайки напред, **CRISPR-SeroSeq отваря пътища за бъдещи изследвания, включително събиране на информация за това кога и къде се разпространяват конкретни серотипове и при какви условия оцеляват или механизмите им на приспособление.** В крайна сметка, по-доброто разбиране на динамиката на серотиповете на *Salmonella* ще има положително въздействие върху разработването на средства за преодоляване инвазивността и разпространението на *Salmonella* и подобряването безопасността на храните.



Също следва да се обърне специално внимание на механизмите на бактериална адаптация към стресови фактори на околната среда, включително към антимикробни средства, тъй като тя е сложна и зависи от различни фактори (напр. време на контакт със стресори).

Следователно, **проучване, обхващащо изолати за дълъг период от време, е по-подходящо и може да е полезно при вземане на по-точни решения.** Второ, **прогнозирането на ARG от WGS изисква повече усилия за разработване на точни и възпроизводими модели за машинно обучение, за да се анализират данните за секвениране в голям мащаб, освен това са необходими предишни задълбочени познания за генотипния AMP, за да се разработят ефективни модели.** Трето, следва да се анализират повече изолати от всякакви матрици, за да се предостави точна информация за възможното предаване на AMP генотиповете. Всички тези въпроси биха могли да бъдат разрешени посредством този обещаващ метод CRISPR-SeroSeq.

Въпреки че има над 2600 серотипа на *Salmonella*, по-малък брой обикновено се свързват с човешки заболявания. Конвенционалната идентификация, базирана на клетъчно култивиране, завършва с избирането на малък брой колонии. Това създава проблем, когато в една проба присъстват множество серотипове, тъй като има тенденция да се предпочитат най-разпространените серотипове, докато не се идентифицират други. Като се има предвид огромният брой серотипове и връзката на някои от тях с човешки заболявания, **способността за идентифициране на серотипове на *Salmonella*, присъстващи на различни етапи от процеса на производство на храни, е от решаващо значение за безопасността на храните и общественото здраве.** Оценката на пълния спектър от серотипове може да позволи проактивно откриване на огнища и ще улесни по-доброто проследяване и идентифициране на серотипове.

Повече информация по темата за новите диагностични методи за доказване на *Salmonella* spp. може да се намери в следните публикации:

- *Use of CRISPR-SeroSeq to detect multiple Salmonella serotypes in equine fecal samples* - Dr. Emily Herring, Dr. Nikki Shariat, Dr. Brandy Burgess
- *Use of CRISPR-SeroSeq to detect multiple Salmonella serotypes in equine fecal samples* - Dr. Emily Herring, Dr. Nikki Shariat, Dr. Brandy Burgess
- *Antimicrobial Resistance Hidden within Multiserovar Salmonella Populations* - Amy T. Sicheloff, a Naomi Ohta, Keri N. Norman, Guy H. Loneragan, Bo Norby, H. Morgan Scott, Nikki W. Shariat
- *Application of a CRISPR Sequence-Based Method for a Large-Scale Assessment of Salmonella Serovars in Ontario Poultry Production Environments* - Matthew W. Quinn, a Nicola F. Linton, a Carlos G. Leon-Velarde, a Shu Chen
- *CRISPR-based assay for the molecular identification of highly prevalent Salmonella serotypes* - Marie Bugarel, Joel Grout, Marie-Leone Vignaud, Guy H. Loneragan, Patrick Fach, Anne Brisabois
- *Characterization and evolution of Salmonella CRISPR-Cas systems* - Nikki Shariat, Ruth E. Timme, James B. Pettengill, Rodolphe Barrangou and Edward G. Dudley
- *Conserved CRISPR arrays in Salmonella enterica serovar Infantis can serve as qPCR targets to detect Infantis in mixed serovar populations* - A.K. Richards, B.A. Hopkins and N.W. Shariat
- *CRISPR - SeroSeq as a tool to reveal Salmonella Populations* - <https://www.anitox.com/news/crispr-seroseq-as-a-tool-to-reveal-salmonella-populations>
- *CRISPR helps scientists discover hidden salmonella in poultry* - <https://bio.news/health/crispr-helps-scientists-discover-hidden-salmonella-in-poultry/>
- *CRISPR Typing and Antibiotic Resistance Correlates with Polyphyletic Distribution in Human Isolates of Salmonella Kentucky* - Dorothy Vosik, Deepanker Tewari, Lisa Dettinger, Nkuchia M. M'ikanatha and Nikki W. Shariat
- <https://shariatlab.com/developing-novel-technologies-and-diagnostics/#CRISPR-SeroSeq>
- *Combination of nucleic acid amplification and CRISPR/Cas technology in pathogen detection* - Dandan Zeng, Jinlong Jiao and Tianlu Mo

- *CRISPR-Cas-based techniques for pathogen detection: Retrospect, recent advances, and future perspectives* - Tao Huang, Rui Zhang, Jinming Li
- *Application of a CRISPR Sequence-Based Method for a Large-Scale Assessment of Salmonella Serovars in Ontario Poultry Production Environments* - Matthew W. Quinn, Nicola F. Linton, Carlos G. Leon-Velarde, Shu Chen
- *Antimicrobial Resistance Hidden within Multiserovar Salmonella Populations* - Amy T. Siceloff, Naomi Ohta, Keri N. Norman, Guy H. Loneragan, Bo Norby, H. Morgan Scott, Nikki W. Shariat
- *The combination of CRISPR-MVLST and PFGE provides increased discriminatory power for differentiating human clinical isolates of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis* - Nikki Shariat, Michael J DiMarzio, Shuang Yin, Lisa Dettinger, Carol H Sandt, James R Lute, Rodolphe Barrangou, Edward G Dudley
- *High-Resolution Identification of Multiple Salmonella Serovars in a Single Sample by Using CRISPR-SeroSeq* - Cameron P. Thompson, Alexandra N. Doak, Naufa Amirani, Erin A. Schroeder, Justin Wright, Subhashinie Kariyawasam, Regina Lamendella, Nikki W. Shariat

Нови диагностични методи за доказване на *L. Monocytogenes* в различни матрици

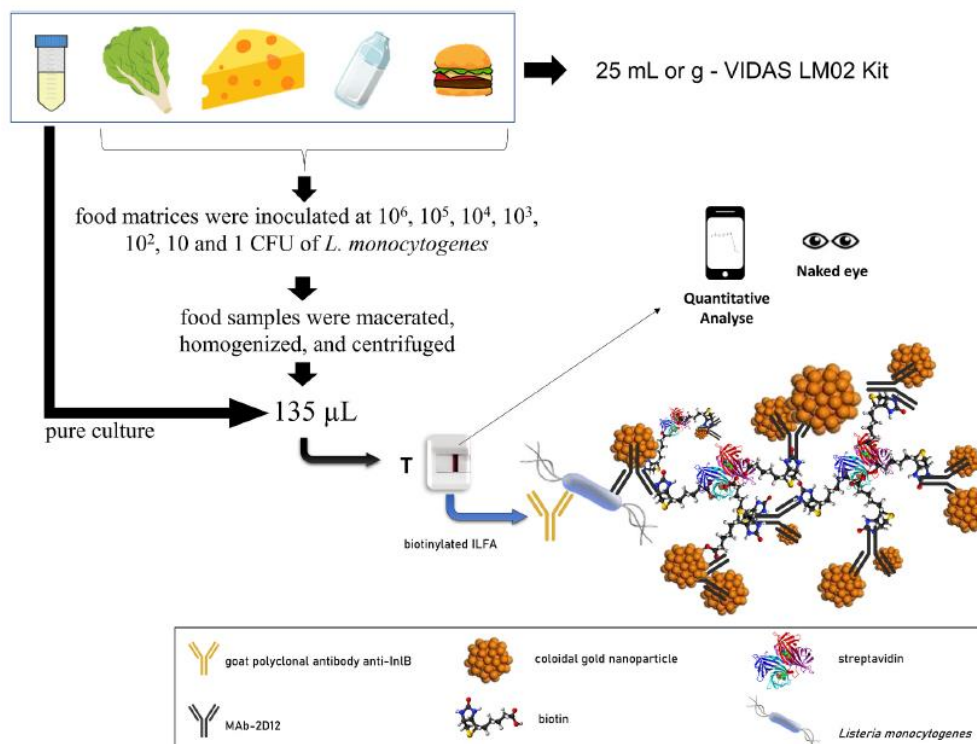
Друг немаловажен патоген, циркулиращ по цялата агрохранителна верига и криещ висок риск особено за някои групи от населението е *L. monocytogenes*, затова е важна и неговата диагностика и мониторинг. Като се има предвид необходимостта от всеобхватни глобални стратегии за справяне с широкото разпространение на *L. monocytogenes* в държавите и континентите, в съчетание с обширни международни пътувания и търговия с храни, съществува **належаща необходимост от ефективни мерки. WGS демонстрира своята ефективност при предоставянето на точна информация относно основните генотипове**, циркулиращи в храните и клиничните проби, генотипната резистентност, тясно свързана с фенотипната резистентност, и различните механизми, чрез които бактериите могат да придобият резистентни гени, като хоризонтален генен трансфер, геномни мутации, ко- и кръстосана резистентност, наред с други. Освен това все по-големият брой налични геномни последователности в световен мащаб **налага създаването на интегрирана база данни за международното наблюдение на *L. monocytogenes***. Тази база данни, основана на WGS и допълнена от епидемиологични характеристики, има за цел да обедини или свърже съществуващите национални мрежи в по-представителна база данни. Тази база данни има **потенциала да улесни споделянето, анализа и обмена на данни от различни държави, да проследи пътя на разпространение на резистентни щамове на *L. monocytogenes* и да разбере механизмите, чрез които те развиват и придобиват AMP в международен контекст**. Освен това е необходимо да се установят междулабораторни тестове и да се разработят качествени методики и подходи за по-точни анализи и да се приложат хармонизирани методи за възпроизводими експерименти по целия свят.

Също както и при *Salmonella* spp. методите в диагностиката са се развили и постепенно изместват класическите подходи. В съвсем ново проучване на тема „*Detection of Listeria monocytogenes using an immunochromatographic point of care test based on anti-internalin A and B antibodies and a nano-biotinylated detection complex*“ на авторски колектив Leonardo Lopes-Luz, Marcelo Mendonça, Matheus Bernardes Torres Fogaça, Djairo Pastor Saavedra, Brenda Garcia Bentivoglio-Silva, Fabricio Rochedo Conceição, Mariane Martins de Araújo Stefani, Andr'e Kipnis, Samira Bühner-S'ekula е демонстриран метода *Point of care test* (POCT), базиран на латерална имунохроматография. Този тест POCT комбинира **анти-интерналин А и В антитела и системата биотин-стрептавидин в нано-биотинилиран комплекс**. Новият метод е показал **граница на откриване (LOD): 10² CFU/mL в чисти култури на *L. monocytogenes*; 10² CFU/mL или/25 g в проби от контаминирано мляко, маруля, сирене**

моцарела, хамбургери. Количественият анализ показва LOD между 10^2 – 10 CFU/mL в чисти култури на *L. monocytogenes*. Прототипът показва 100% специфичност при тестване на чисти култури *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae* *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium* и *Klebsiella pneumoniae*. За разлика от наличните в търговската мрежа тестове, този прототип показва капацитет за откриване, по-близо до минималната инфекциозна доза *L. monocytogenes*. Следователно този метод представлява обещаващ кандидат - диагностичен метод, позволяващ бързо, с висока специфичност и чувствителност откриване на *L. monocytogenes* в хранителни матрици и в платформи за производство на храни.

	Our new biotinylated immunochromatographic lateral flow prototype	Commercially available tests
Limit of detection in pure culture (CFU/mL)	10 - 10^2	10^4 - 10^5
Limit of detection in 25 g or mL of food (CFU/mL)	10 - 10^2	10^4 - 10^5
Selective enrichment	None	Yes, 24-72h
Equipment-free	Yes	Yes
Sample pre-treatment	None	Not necessary
Targets	Internalin A and B	Not available
Simple and quick strategy?	Yes, biotin-streptavidin system – nano-biotinylated detection complex	No, selective enrichment

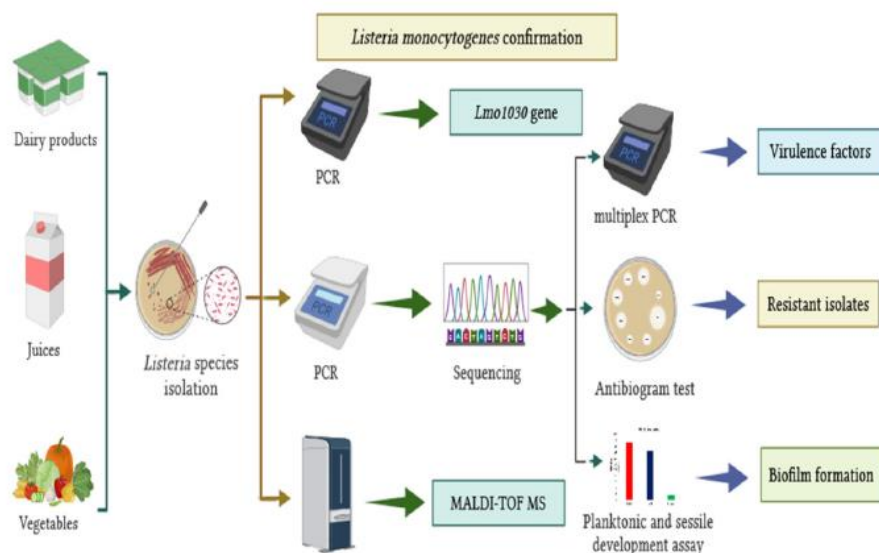
Схематично представен принципа на теста за детекция на *Listeria monocytogenes*:



В сравнение с молекулярните техники, имуноанализите се считат за по-малко чувствителни, въпреки това ILFA се считат за лесни за употреба и при полеви условия, осигуряват бързи резултати и са подходящи за използване при тестване на място (РОСТ)

(O'Farrell, 2009; Urusov et al., 2019). В хранително-вкусовата промишленост контролът на микробиологичното качество за наличие на *L. monocytogenes* представлява голямо предизвикателство. РОСТ за откриване на замърсяване с *L. monocytogenes* в различни хранителни матрици може значително да допринесе за предотвратяването на нови огнища на листериоза. В настоящото проучване използването на тест, базиран на нано-биотинилиран комплекс, състоящ се от анти-интерналин А и В антитела и системата биотин-стрептавидин, показва подобрена чувствителност спрямо предходни разработени тестове (LODs) както в чисти *L. monocytogenes* култури (от $5,9 \times 10^3$ – $1,5 \times 10^4$ до 10^2 CFU/mL) така и в експериментално замърсено мляко (от 1×10^5 до 10^2 CFU/mL). Също така, новият метод е успял да открие същите концентрации на три щама *L. monocytogenes* (между 10^9 и 10 CFU/mL), което предполага, че прототипът на този метод може да се използва в бъдеще за откриване на други щамове. Използването на смартфони за получаване на качествени изображения за количествено определяне на резултатите от имунохроматографските тестове също спомага за избягване скъпо оборудване за четене. В допълнение използването на AuNP увеличава максимално чувствителността на анализа. При тествани други хранителни матрици като марули, сирене моцарела и хамбургери, този нов метод е успял да открие *L. Monocytogenes* под 10^2 CFU/25 g. Предимство на този новоразработен метод е факта, че не е необходима предварителна стъпка на селективно набогатяване на пробата за откриване на *L. monocytogenes*. Резултатите от изследваните хранителни матрици показват капацитет на откриване на този патоген, близо до теоретичната минимална инфекциозна доза от <100 CFU/mL. Следователно този метод РОСТ представлява обещаващ кандидат за откриване на *L. monocytogenes*, съответстващ на регулаторните стандарти. Използването на системата биотин-стрептавидин не изисква никакво допълнително оборудване, тъй като 40 nm AuNP са конюгирани с молекули стрептавидин и стрептавидинът след това се свързва с молекули биотин, които преди това са били конюгирани с откриващите антитела (MAb-2D12) на *L. Monocytogenes*. Що се отнася до специфичността, новият метод не показва кръстосана реактивност с нито един друг вид бактерии, тествани в чиста култура (*Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae* *Salmonella* *Enteritidis*, *Salmonella* *Typhimurium* и *Klebsiella pneumoniae*), което предполага неговата висока специфичност за откриване на *L. monocytogenes*. Тъй като протеинът InlB се експресира само от видове *L. monocytogenes*, не се очаква кръстосана реактивност с други видове, принадлежащи към род *Listeria* или други видове, различни от *Listeria* (Cabanés et al., 2002).

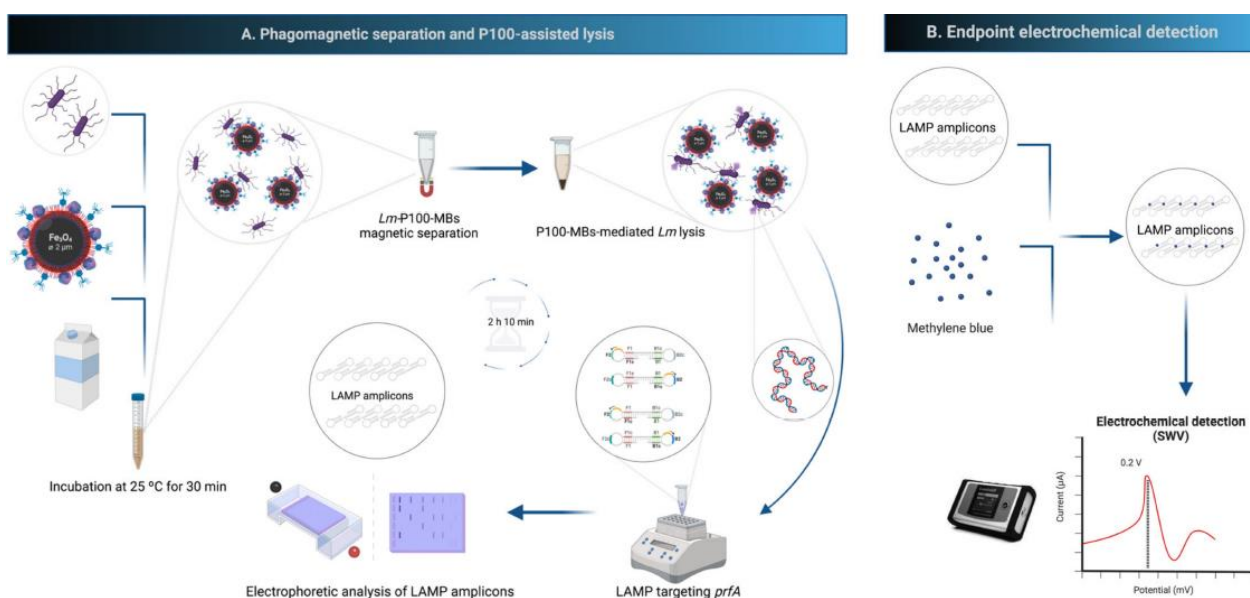
В друго съвсем ново оригинално проучване на тема „*Molecular detection of Listeria monocytogenes from different dairy and street food sources in North Karnataka, India*“ на авторски колектив Roshan Kumar Sharma, Sunil S. Jalalpure, Swati Pathak, Sachit Ganapathy, Mickaël Desvaux, Subarna Roy, Satisha Hegde е представена комбинация от методи, които с голяма достоверност доказват наличие на *Listeria monocytogenes* в различни хранителни матрици и улична храна.



В проучването е отбелязано, че комбинацията от 16 S rRNA генното секвениране и MALDI-TOF MS е показала висока възпроизводимост, ефективност, точност, специфичност и бързина на идентифициране на *L. Monocytogenes* особено преди да се пристъпи към характеризирането на гените на патогенност. В резултатите от проучването става ясно, че и двата изолата *L. monocytogenes*, които са изследвани с помощта на мултиплексен PCR, са имали всичките седем гена на вирулентност, а именно *inlA*, *inlB*, *prfA*, *iap*, *actA*, *plcB* и *hlyA*. Откриване на няколко гена за вирулентност в хранителни изолати *L. monocytogenes*, е докладвано преди това в проучвания от Китай, Иран и Египет, основно в млечни продукти. Както се разкрива от антибиограмата, два изолата *L. monocytogenes* показват антибиотична резистентност към налидиксинова киселина, ко-тримоксазол, клиндамицин, ампицилин, норфлоксацин, цефотаксим и азитромицин за L-74 и клиндамицин и азитромицин само за L-23 изолатите. Останалите изолати на *Listeria* са чувствителни към антибиотиците. *L. monocytogenes* обикновено се счита за чувствителен към повечето антибиотици, но някои други проучвания съобщават за резистентност на хранителни изолати *L. monocytogenes* към ванкомицин, пеницилин, гентамицин, амоксицилин, ампицилин, еритромицин, рифампицин, хлорамфеникол, левофлоксацин, азитромицин, окситетрациклин и триметоприм-сулфаметоксазол, клиндамицин и срещу неомицин и тетрациклин. Основната причина за кръстосано замърсяване и контаминация на готовия продукт, е образуването на биофилм от *L. monocytogenes*. Все пак фактори като температура, рН, растежна среда, време, могат да повлияят на това колко бързо се образува биофилм. В това проучване и двата вида *L. monocytogenes* (L-23 и L-74) се отглеждат в ВНИ среда за различни периоди от време и различни рН скали и е показано, че алкалната среда (рН 8,6) води до най-голям растеж след 24 часа в сравнение с други тествани условия. Известно е, че ефектите на различни фактори върху развитието на биофилми варират в зависимост от щам и следователно създаването на подходящи програми за оценка на риска в хранителния сектор **изисква задълбочено разбиране на това как факторите на околната среда влияят върху образуването на биофилм при *L. monocytogenes* и техните регулиращи механизми, което от своя страна изисква надеждни, информативни, бързи и точни методи за диагностика.**

Освен необходимостта от повишаване на стандарта на хигиенните мерки в производствените предприятия, това проучване подчертава значението на наблюдението на тези пренасяни от храните патогени, за да се ограничи рискът от заразяване и инфекция и в крайна сметка да се запази човешкото здраве, особено за рисковите групи хора, включително бременни жени, деца, възрастни хора и хора с отслабен имунитет.

Друг пример за иновативен метод за детекция на *Listeria monocytogenes* е описан в проучване на тема: „Development of a Novel Phagomagnetic-Assisted Isothermal DNA Amplification System for Endpoint Electrochemical Detection of *Listeria monocytogenes*“ на авторски колектив *Cláudia Maciel, Nádia F. D. Silva, Paula Teixeira and Júlia M. C. S. Magalhães*. Както стана ясно до момента, **прилаганите конвенционални техники за откриване на *Listeria monocytogenes* са тромави или изискват скъпо непреносимо оборудване**, което възпрепятства тяхното транспортиране и навременното наблюдение. Настоящата разработка предлага **нова интегрирана система**, при която се прибегва до **loop-mediated isothermal amplification (LAMP)**, подпомагана от бактериофаг P100 – магнитна платформа (**bacteriophage P100 – magnetic platform**), съчетана с електрохимичен анализ на крайните точки (**endpoint electrochemical technique**), за бързо откриване на *L. monocytogenes*. Молибдофосфат базираната оптимизация на бактериалния фагомагнитен сепарационен протокол позволява определянето на оптималните параметри за изпълнение на методиката (pH 7, 25°C, 32 µg магнитни частици; 60,6% от специфичната ефективност на улавяне). **Новият метод LAMP, насочен към *prfA*, постига 100% специфичност към конкретен патоген, в случая *L. monocytogenes* („inclusivity“ за 61 *L. monocytogenes* изолати – терминът означава в какъв % от изследваните проби желаният патоген се изолира) и 100% чувствителност (към 42 нецелеви Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии – „exclusivity“ – терминът означава колко е чувствителен метода и какъв процент от конкретния патоген открива).** Като доказателство за ефективността на тази концепция, методът е **успешно валидиран в проби от пастьоризирано мляко, контаминирано експериментално с *L. monocytogenes***. Фагомагнитният подход успява в селективното улавяне на този бактериален патоген и ДНК от *Listeria*, което ефективно се амплифицира чрез LAMP. **Електрохимичното откриване на LAMP ампликоните се извършва за около 20 минути със забележителна аналитична чувствителност (1 CFU mL⁻¹).** Поради това този комбиниран подход представя **изключителна производителност и устойчивост, осигурявайки за 2,5 часа бърза, надеждна и точна диагностика и то с преносима техника** за откриване на този патоген дори и в полеви условия, на място.

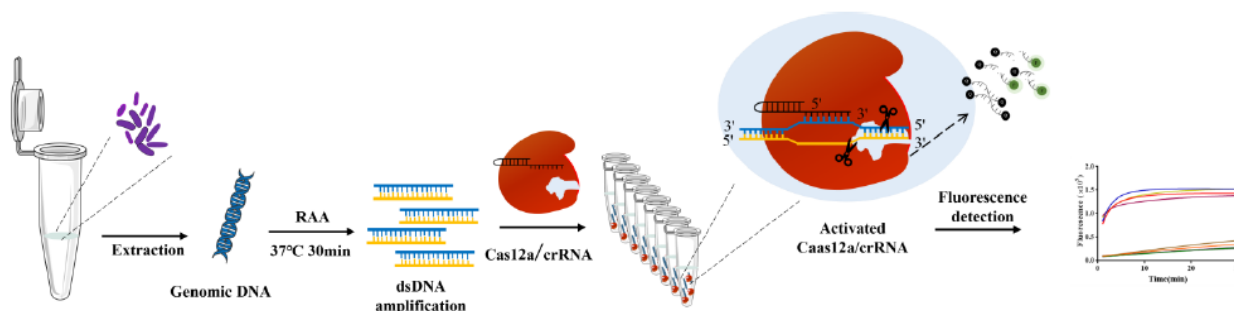


Проучване на „Combination of nucleic acid amplification and CRISPR/Cas technology in pathogen detection“ на *Dandan Zeng, Jinlong Jiao and Tianlu Mo* също предоставя алтернативен метод за доказване не само на *Salmonella* spp., а и *Listeria monocytogenes*. Въпреки широката употреба на PCR, поради неспецифичността на процеса на амплификация, изследователите са предложили **комбинация от технология за амплификация на нуклеинова киселина с**

новата технология CRISPR за откриване на тези патогени, която подобрява специфичността и достоверността на резултатите. Тази научна разработка обобщава резултатите от комбинацията на методи като амплификация на нуклеинови киселини с технологията CRISPR/Cas за откриване на патогени.

В проучване на тема: „*Rapid Nucleic Acid Detection of Listeria monocytogenes Based on RAA-CRISPR Cas12a System*“ на авторски колектив *Yujuan Yang, Xiangxiang Kong, Jielin Yang, Junxin Xue, Bing Niu and Qin Chen* са представени резултатите от приложението на новосъздадения метод RAA-CRISPR/Cas12a за детекция на *L. monocytogenes*. RAA-CRISPR/ Cas12a показва висока чувствителност и висока специфичност, с чувствителност от 350 CFU/mL и $5,4 \times 10^{-3}$ ng/ μ L за чиста бактериална култура и геномна ДНК и добра специфичност за 5 щамове на *Listeria spp.* и 14 щамове на други често срещани патогенни бактерии. *L. monocytogenes* може да бъде открит при първоначална концентрация от 2,3 CFU/25g в рамките на 2 часа и този метод може да се приложи за хранителни проби, които са експериментално замърсени с *L. Monocytogenes*. Резултатите от RAA-CRISPR/Cas12a могат да бъдат наблюдавани за 5 минути, докато амплификацията е завършена за 20–30 минути. Скоростта и чувствителността на RAA-CRISPR/Cas12a са значително по-високи от тези на стандартен метод. В заключение, системата RAA-CRISPR/Cas12a, създадена в това проучване, има голям потенциал за приложение при диагностицирането на патогени, пренасяни с храни.

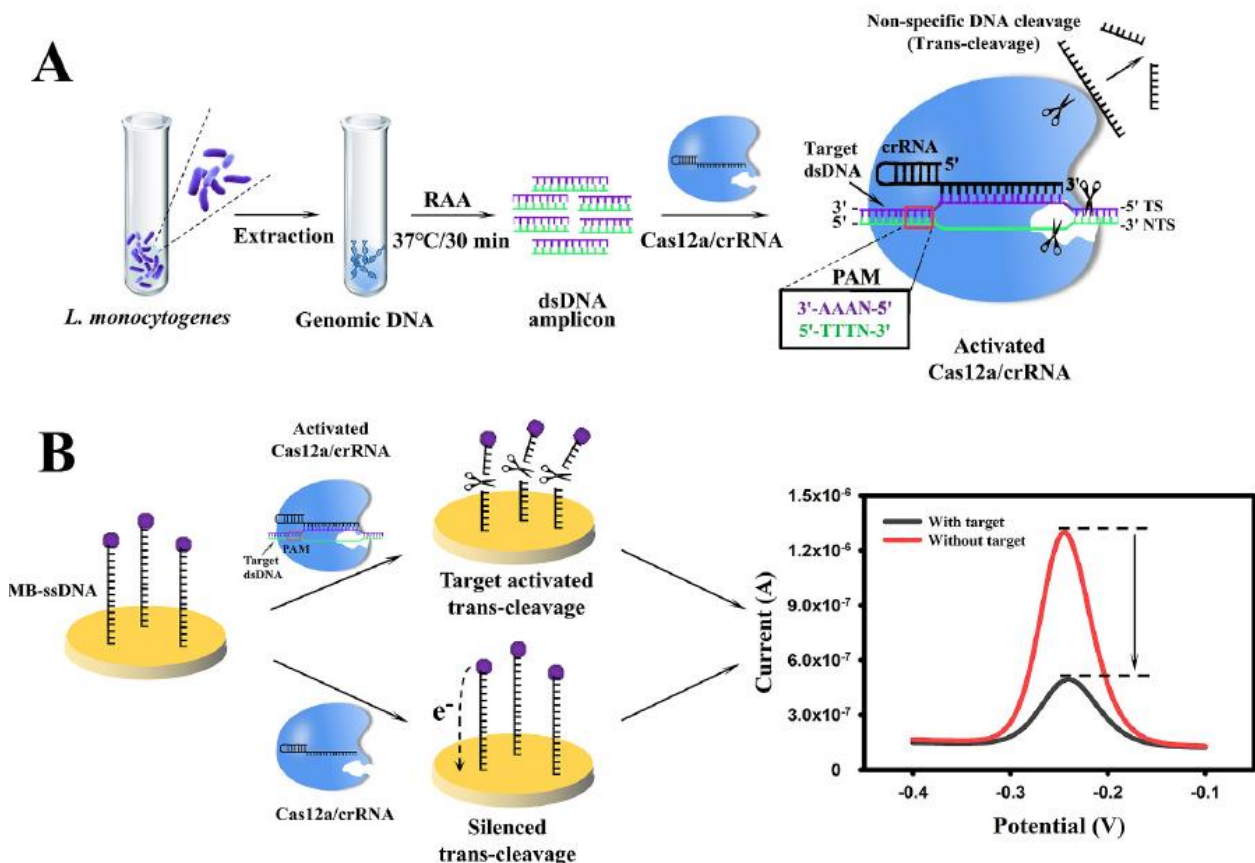
Схематично представен модела на метода RAA-CRISPR/Cas12a:



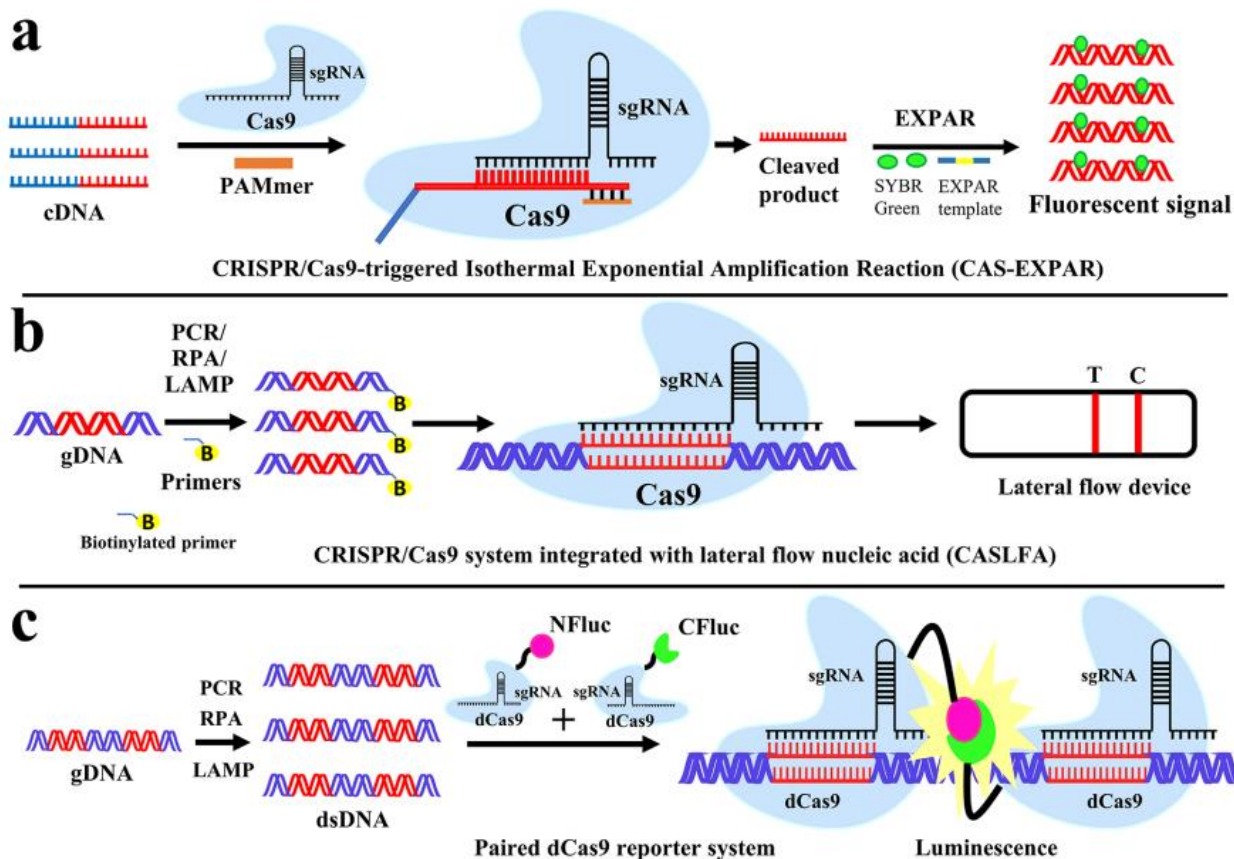
Системата CRISPR/Cas12a е използвана за откриване на *hly* (NC_003210.1) гена на *L. monocytogenes*, амплифициран чрез RAA, и е проведен тест за осъществимост на RAA праймери и компоненти на системата CRISPR/Cas12a. Както може да се види от резултатите от проучването, ssDNAFQ репортерът флуоресцира и се открива от системата, когато правилната целева ДНК и комплексът Cas12a/crRNA присъстват в системата за анализ, демонстрирайки, че системата RAA-CRISPR/Cas12a, конструирана в това изследване, може да се използва за откриване на *L. monocytogenes*. При изследване на чувствителността и специфичността на този иновативен метод, експериментално са заразени различни матрици с 14 често срещани патогенни бактерии, включително *L. monocytogenes*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* и др. Методът е специфичен и улавя наличие само на *L. Monocytogenes*, като показва S-тип крива на амплификация със значително усилен флуоресцентен сигнал, а резултатите от амплификацията на другите 14 често срещани патогенни бактерии не се различават от отрицателната контрола. Също така специфичността на метода е допълнително оценена до доказване на конкретен вид или род към род *Listeria* чрез RAA-CRISPR/Cas12a. Резултатите показват, че само 6 *L. monocytogenes* показват положителна амплификация, докато *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* и отрицателната контрола показват липса или нисък и стабилен флуоресцентен сигнал. Тези резултати показват ролята на базирания на RAA анализ CRISPR/Cas12a при разграничаването на *L. monocytogenes* от нецелевите видове. Като

крайна оценка и валидиране на този метод са изследвани истински проби от различни хранителни матрици: общо 28 реални проби. Всички избрани проби са тествани със системата RAA-CRISPR/Cas12a, като две положителни проби са открити при едър рогат добитък и обезмаслено мляко на прах, а останалите проби са отрицателни. Традиционният стандартен метод също е използван за откриването на листерия в същите 28 проби и резултатите напълно се припокриват с резултатите от RAA-CRISPR/Cas12a. Тези заключения водят до извода, че **установената платформа RAA-CRISPR/Cas12a може да се приложи за откриване на *L. monocytogenes* в действителни проби и да предостави нов метод за бърза диагностика.**

Върху този метод работи и екипът на *Fan Li, Qinghua Ye, Moutong Chen, Baoqing Zhou, Jumei Zhang, Rui Pang, Liang Xue, Juan Wang, Haiyan Zeng, Shi Wu, Youxiong Zhang, Yu Ding, Qingping Wu*, като резултатите са представени в проучване на тема: *”An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for Listeria monocytogenes detection“*. При оптимизирани условия **базираният на RAA E-CRISPR може да открие само 0,68 аМ геномна ДНК и 26 CFU/mL *L. monocytogenes* в чисти култури.** По-важното е, че базираният на RAA E-CRISPR позволява бързо и ултрачувствително откриване на *L. monocytogenes* в проби от *Flammulina velutipes*. Освен това **не е наблюдавана кръстосана реактивност** с други нецелеви бактерии. Тази система очевидно демонстрира, че е **проста, високочувствителна и точна платформа за откриване на *L. monocytogenes*.**



Не на последно място, друга *cas* система е включена в прецизната диагностика и доказване на *Listeria monocytogenes*. Разработката е представена в проучване на тема *„CRISPR/Cas-Based Biosensor As a New Age Detection Method for Pathogenic Bacteria“* на авторски колектив *Joydeep Chakraborty, Anis Ahmad Chaudhary, Salah-Ud-Din Khan, Hassan Ahmad Rudayni, Sayed Modinur Rahaman, and Hironmoy Sarkar*.



Схематично представен принципа на метода за доказване на бактериална ДНК и стъпките при доказване на *L. monocytogenes*

Listeria monocytogenes е един от най-вирулентните хранителни патогени и може да се намери в различни храни като мляко, млечни продукти, яйца, домашни птици и месо. FDA поддържа политика на нулева толерантност към *L. monocytogenes*, тъй като има ниска инфекциозна доза и висока смъртност. Бавната скорост на растеж на *L. monocytogenes* е предизвикателство за конвенционалните методи за откриване, базирани на клетъчно култивиране, които могат да отнемат до 7 дни. Задействаната от CRISPR/Cas9 реакция на изотермична експоненциална амплификация (CAS-EXPAR) базирана на детекция на *Listeria monocytogenes* е разработена от Huang et al. Тук хемолизин (hly) генът на *L. monocytogenes* е използван като целева последователност. Използва се целева-специфичната никинг активност на Cas9 и никинг ендонуклеаза (NEase)-медирана амплификация. От бактериите се изолира РНК и се генерира сДНК. cDNA са разцепвани от Cas9 с помощта на специфични sgRNA и PAM-мери. Тези продукти са подложени на EXPAR-медирана амплификация чрез EXPAR шаблони и без екзогенни праймери. Накрая, амплифицираните продукти са открити чрез флуоресценция с помощта на SYBR зелено. Този метод съчетава предимствата на Cas9/sgRNA сайт-специфично разцепване и EXPAR бърза амплификация. Този процес е много специфичен при разграничаване на еднонуклеотидно несъответствие. Препрограмируемата активност на разцепване на Cas9/sgRNA също е полезна за насочване към различни други патогени. Предимството на този метод е, че не изисква екзогенни праймери за амплификация. Следователно шансовете за неспецифична амплификация, последвана от фалшиво положителни реакции, са сведени до минимум. Съобщено е, че чувствителността на тази техника е 0,82 amol синтетична ssDNA, но при бактерии, тази техника е потвърдена с 1,25 и 2,5 µg обща РНК. Единствения минус на този метод е, че той може да има проблем с откриването на дълги цели, тъй като EXPAR не е ефективен за дълги ДНК или РНК последователности. Подобен метод за откриване на *L. monocytogenes* е разработен и от Wang et al. Тук също генът

hly е използван като мишена. Тази техника се нарича **хибридиращ анализ на базата на разплитане на ДНК за просто и лесно откриване с невъоръжено око на целта**. Геномна бактериална ДНК се подлага на амплификация (чрез PCR или всякаква изотермична реакция) с ген-специфични биотинилирани праймери. След това биотинилираните ампликони се инкубират с целева специфична sgRNA и dCas9, за да се образува комплекс (Cas9/sgRNA биотинилирани ампликони), без да се разцепват мишените. Този комплекс се свързва с AuNP-ДНК сонда (златна наночастица, свързана с комплементарна ДНК последователност на целевия ген/sgRNA) и се комбинира с имобилизиран стрептавидин в тестовата линия (Т). На тестовата линия (Т) се наблюдава цветна лента, генерирана от AuNP. Излишната несвързана AuNP-ДНК сонда ще образува на контролната линия (С). Съществуват два вида ДНК сонди, като тази, базирана на sgRNA сонда има предимство, че тя може да открие множество цели, тъй като тя е специфична за част от sgRNA, но не и за целевата ДНК. Това е прост и бърз метод за откриване на генетични цели с просто око. **Границата на откриване е докладвана при 150 копия на бактериалните мишени**. Както се съобщава в проучванията, този метод може да открие генната цел без почти никакви смущения на фоновия сигнал и може да бъде завършен въз основа на евтин и преносим комплект оборудване в рамките на 40 минути.

Заклучение:

Всички обсъдени по-горе методи, базирани на CRISPR/Cas или на други молекулярни инструменти и подходи за откриване на бактерии, се различават по свой собствен начин, използвайки различни Cas ензими и техники. Съгласно стандартите ASSURED на СЗО, всички **гореописани методи може да не отговарят напълно на всички стандарти**, като се вземе предвид факта, че някои може да са **по-достъпни**, а други може да са **по-чувствителни** или да имат **по-малко обемисто оборудване**, или да са **лесни за използване** в реално време. Например методите без амплификация, като DNA-FISH и E-Si-CRISPR, се нуждаят от **по-малко време и по-малко компоненти**, което ги прави **относително евтини**. Методи като CASLFA, APC-Cas, CIA, и CRISPR-MTB също могат да бъдат проведени, като се използва **рентабилната изотермична техника за амплификация**. CASLFA, CIA, и CRISPR/Cas12a-Powered Dual-Mode Biosensor предлагат **големи възможности за разчитане на резултатите с невъоръжено око**, което не изисква скъпо оборудване. Техниката APC-Cas също не се нуждае от бактериална изолация или екстракция на ДНК, което допринася за **ниската й цена**. Времето за изпълнение на методите, описани по-горе, **варира от 30 до 140 минути**. CRISPR-медирианият DNA-FISH за откриване на метицилин-резистентен *Staphylococcus aureus* (MRSA) има **най-краткото време на изпълнение от 30 минути**, тъй като е метод без амплификация. По отношение на аналитичната чувствителност на анализите CRISPR/Cas, **границата на откриване (LoD) се отчита в различни единици**: копия/mL, CFU/mL, молове и моларност. По-голямата част от методите отчитат LoD в CFU/mL, като **най-ниската отчетена LoD е 1 CFU/mL** както за метода с CRISPR-Cas12a биосензора, така и за CIA37. Съобщава се, че APC-Cas и CASLFA откриват 1 CFU и 150 копия. Между dCas9 и E-Si-CRISPR където и двата LoD са отчетени в моларна концентрация, най-ниската е за E-Si-CRISPR, която е до 3,5 fM. LoD на CAS-EXPAR се оценява на 0,82 amol. Изразяването на чувствителността с различни единици е подвеждащо и следователно е трудно да се сравняват различните методи. В случай на бактериална детекция и валидиране на различните новосъздадени методи е препоръчително ако чувствителността се отчита в стандартната единица, която е CFU/mL.

Методите, базирани на CRISPR, **намаляват необходимостта от голямо оборудване**, което е забележителна характеристика, която дава **значителни възможности за прилагане на място и в реално време**, особено за **контролиране на епидемични огнища в райони с**

ограничени ресурси. Системите CRISPR/Cas улесняват създаването на широк диапазон от сигнали за разчитане чрез флуоресценция до откриване с просто око. Методи, базирани на LFA, като CASLFA и CIA, може да имат по-голяма полза в диагностиката в реално време при болнични условия и с цел бързо поставяне на точна диагноза на пациента и предписване на адекватна терапевтична схема.

Въпреки че базираните на CRISPR/Cas технологии за откриване на патогени имат изключителна чувствителност и специфичност, все още има много възможности за бъдещ напредък и усъвършенстване. Поради бъдещото загриженост присъщо действие извън целта на системите CRISPR/cas, базираната на CRISPR диагностика трябва да заложи най-вече на подобряване на специфичността. Например, извън PAM-проксималните 5–12 bp зони, Cas9-медираното разцепване е много толерантно към несъответствия, и dCas9 извън целево свързване, което е произволно, които несъвършенства на тези системи могат да отслабят аналитичната специфичност и чувствителност. През последните няколко години са разработени варианти на Cas9 с намалено разцепване извън целта, като SpCas9-HF1, eSpCas9 (1.1), и HураCas9, като по този начин се предоставят потенциални бъдещи решения за ефекта извън целта на Cas9. Следователно, за Cas ензимите, бъдещите изследвания трябва да бъдат съсредоточени върху откриването на нуклеинова киселина с висока точност, за да се сведе до минимум нецелевото насочване. В бъдеще трябва да се разработи по-удобна за потребителя диагностика в една стъпка, която включва екстракция на нуклеинова киселина на патогена, предварителна амплификация, CRISPR/Cas-индуцирана реакция и отчитане на сигнала. Например вече има разработени няколко прости формата, като хартиени биосензори с визуално отчитане (NASBACC, SHERLOCK, DETECTR), за откриване на патогени без екстракция на нуклеинова киселина (HUDSON), и тестове в една епруветка, комбиниращ изотермична амплификация и Cas-медирана реакция, които могат да бъдат комбинирани за повече простота, достъпност и удобство за оператора. Трябва да се въведат повече подходи без оборудване за отчитане на сигнала, тъй като това може да облекчи използването им в полеви условия и с желан резултат в реално време. В момента базираната на CRISPR система за детекция трябва да се съхранява и доставя при хладилни условия, което също създава известно неудобство за много отдалечени райони. Системата за откриване NASBACC с лиофилизирани реагенти и системата SHERLOCK с лиофилизирани и хартиени реагенти показват възможност за дългосрочно съхранение и транспорт. Следователно трябва да се разработят повече стратегии за съхранение и транспортиране на реагентите и комплектите консумативи.

Въпреки изтъкнатите негативи на CRISPR/Cas-медираните системи за диагностика и откриване на конкретни патогенни бактерии, тези иновации в биотехнологиите предлагат много мощна и усъвършенствана алтернатива с висока специфичност и чувствителност на конвенционалните диагностични методи. Също така тези CRISPR/Cas техники имат голям потенциал за ранна диагностика и доказване на антибиотична резистентност при патогенните причинители, изолирани от хора, животни, храни и околна среда. При повечето от техниките, обсъдени по-горе за детекция и доказване на патогенни бактерии има различни техники за амплификация като PCR, LAMP, RCA и SDA, интегрирани заедно в комплекс със системата CRISPR/Cas.

Преди години само амплификацията и PCR бяха достатъчни за откриване, но поради високия процент на фалшиво положителни, разчитането само на амплифицирани фрагменти от генома за точно откриване на патогени стана ненадежно. Следователно целевата амплификация, последвана от CRISPR/Cas като биосензорно медирано откриване на патогенни бактерии, може да направи процеса по-стабилен, надежен, чувствителен и специфичен.

Изготвил:

Красимира Захариева,
Дирекция „ОРХВ“, ЦОРХВ
14.06.2024 г.

Използвана литература:

- *Use of CRISPR-SeroSeq to detect multiple Salmonella serotypes in equine fecal samples - Dr. Emily Herring, Dr. Nikki Shariat, Dr. Brandy Burgess*
- *Quinn, M.W., Linton, N.F., Leon-Velarde, C.G. and Chen, S., 2023. Application of a CRISPR sequence-based method for a large-scale assessment of Salmonella serovars in Ontario poultry production environments. Applied and Environmental Microbiology, 89(3), pp.e01923-22.*
- *Siceloff, A.T., Ohta, N., Norman, K.N., Loneragan, G.H., Norby, B., Scott, H.M. and Shariat, N.W., 2021. Antimicrobial resistance hidden within multiserovar Salmonella populations. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 65(6), pp.10-1128.*
- *Shariat, N., Snyder, W. and Dunn, L., CPS 2020 RFP FINAL PROJECT REPORT.*
- *Chakraborty, J., Chaudhary, A.A., Khan, S.U.D., Rudayni, H.A., Rahaman, S.M. and Sarkar, H., 2022. CRISPR/Cas-based biosensor as a new age detection method for pathogenic bacteria. ACS omega, 7(44), pp.39562-39573.*
- *Quinn, M.W., Linton, N.F., Leon-Velarde, C.G. and Chen, S., 2023. Application of a CRISPR sequence-based method for a large-scale assessment of Salmonella serovars in Ontario poultry production environments. Applied and Environmental Microbiology, 89(3), pp.e01923-22.*
- *Bugarel, M., den Bakker, H., Grout, J., Vignaud, M.L., Loneragan, G.H., Fach, P. and Brisabois, A., 2018. CRISPR-based assay for the molecular identification of highly prevalent Salmonella serotypes. Food Microbiology, 71, pp.8-16.*
- *Shariat, N., Timme, R.E., Pettengill, J.B., Barrangou, R. and Dudley, E.G., 2015. Characterization and evolution of Salmonella CRISPR-Cas systems. Microbiology, 161(2), pp.374-386.*
- *Richards, A.K., Hopkins, B.A. and Shariat, N.W., 2020. Conserved CRISPR arrays in Salmonella enterica serovar Infantis can serve as qPCR targets to detect Infantis in mixed serovar populations. Letters in Applied Microbiology, 71(2), pp.138-145.*
- <https://www.anitox.com/news/crispr-seroseq-as-a-tool-to-reveal-salmonella-populations>
- *Vosik, D., Tewari, D., Dettinger, L., M'ikanatha, N.M. and Shariat, N.W., 2018. CRISPR typing and antibiotic resistance correlates with polyphyletic distribution in human isolates of Salmonella Kentucky. Foodborne Pathogens and Disease, 15(2), pp.101-108.*
- <https://shariatlab.com/developing-novel-technologies-and-diagnostics/>
- *Zeng, D., Jiao, J. and Mo, T., 2024. Combination of nucleic acid amplification and CRISPR/Cas technology in pathogen detection. Frontiers in Microbiology, 15, p.1355234.*
- *Huang, T., Zhang, R. and Li, J., 2023. CRISPR-Cas-based techniques for pathogen detection: Retrospect, recent advances, and future perspectives. Journal of advanced research, 50, pp.69-82.*
- *Cox, N.A., Berrang, M.E., House, S.L., Medina, D., Cook, K.L. and Shariat, N.W., 2019. Population analyses reveal preenrichment method and selective enrichment media affect Salmonella serovars detected on broiler carcasses. Journal of food protection, 82(10), pp.1688-1696.*
- *Quinn, M.W., Linton, N.F., Leon-Velarde, C.G. and Chen, S., 2023. Application of a CRISPR sequence-based method for a large-scale assessment of Salmonella serovars in Ontario*

- poultry production environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(3), pp.e01923-22.
- Sicheloff, A.T., Ohta, N., Norman, K.N., Loneragan, G.H., Norby, B., Scott, H.M. and Shariat, N.W., 2021. Antimicrobial resistance hidden within multiserovar *Salmonella* populations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(6), pp.10-1128.
 - Shariat N, DiMarzio MJ, Yin S, Dettinger L, Sandt CH, Lute JR, Barrangou R, Dudley EG. The combination of CRISPR-MVLST and PFGE provides increased discriminatory power for differentiating human clinical isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. *Food Microbiol.* 2013 May;34(1):164-73. doi: 10.1016/j.fm.2012.11.012. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23498194.
 - Thompson, C.P., Doak, A.N., Amirani, N., Schroeder, E.A., Wright, J., Kariyawasam, S., Lamendella, R. and Shariat, N.W., 2018. High-resolution identification of multiple *Salmonella* serovars in a single sample by using CRISPR-SeroSeq. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(21), pp.e01859-18.
 - VIDEO: How CRISPR-SeroSeq could improve food safety in poultry - <https://www.wattagnet.com/poultry-future/new-technologies/article/15536561/video-how-crispr-seroseq-could-improve-food-safety-in-poultry>
 - WEBINAR: CRISPR-SeroSeq as a tool to reveal *Salmonella* populations
 - Prolonged multi-country cluster of *Listeria monocytogenes* ST155 infections linked to ready-to-eat fish products - <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-8538>
 - Lopes-Luz L, Mendonça M, Fogaça MB, Saavedra DP, Bentivoglio-Silva BG, Conceição FR, de Araújo Stefani MM, Kipnis A, Bühner-Sékula S. Detection of *Listeria monocytogenes* using an immunochromatographic point of care test based on anti-internalin A and B antibodies and a nano-biotinylated detection complex. *LWT.* 2023 Oct 1;188:115336.
 - Sharma, R.K., Jalalpure, S.S., Pathak, S., Ganapathy, S., Desvaux, M., Roy, S. and Hegde, S., 2024. Molecular detection of *Listeria monocytogenes* from different dairy and street food sources in North Karnataka, India. *Journal of Infection and Public Health.*
 - Maciel, C., Silva, N.F., Teixeira, P. and Magalhães, J.M., 2023. Development of a Novel Phagomagnetic-Assisted Isothermal DNA Amplification System for Endpoint Electrochemical Detection of *Listeria monocytogenes*. *Biosensors*, 13(4), p.464.
 - Yang, Y., Kong, X., Yang, J., Xue, J., Niu, B. and Chen, Q., 2024. Rapid Nucleic Acid Detection of *Listeria monocytogenes* Based on RAA-CRISPR Cas12a System. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(6), p.3477.
 - Li, F., Ye, Q., Chen, M., Zhou, B., Zhang, J., Pang, R., Xue, L., Wang, J., Zeng, H., Wu, S. and Zhang, Y., 2021. An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 179, p.113073.
 - Song, C., Wang, B., Wang, Y., Liu, J. and Wang, D., 2023. Detection of *Listeria monocytogenes* in food using the Proofman-LMTIA assay. *Molecules*, 28(14), p.5457.
 - Dos Reis, J.O., Vieira, B.S., Cunha Neto, A., Castro, V.S. and Figueiredo, E.E.D.S., 2022. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* from Animal Foods to First-and Second-Line Drugs in the Treatment of Listeriosis from 2008 to 2021: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2022(1), p.1351983.
 - Three clusters of *Salmonella* Enteritidis ST11 infections linked to chicken meat and chicken meat products - <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-8388>
 - Multi-country outbreak of *Salmonella* Mbandaka ST413 linked to consumption of chicken meat products in the EU/EEA and the UK – first update - <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-8749>

- Kayode, A.J. and Okoh, A.I., 2023. Antimicrobial-resistant *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Implications for food safety and risk assessment. *Foods*, 12(6), p.1346.
- *Listeriosis Annual Epidemiological Report for 2022* - https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/LIST_AER_2022_Report.pdf
- Panera-Martínez, S., Capita, R., García-Fernández, C. and Alonso-Calleja, C., 2023. Viability and Virulence of *Listeria monocytogenes* in Poultry. *Microorganisms*, 11(9), p.2232.
- Baquero, F., F. Lanza, V., Duval, M. and Coque, T.M., 2020. Ecogenetics of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Molecular microbiology*, 113(3), pp.570-579.
- *Listeria monocytogenes* DTU - Ladefoged, N., Andersen, J.K. and Schjørring, S., Espenhain, Laura; Takeuchi-Storm, Nao; Munch, Pernille Kold; Hansen, Lisbeth Truelstrup; Nielsen.
- Halbedel, S., Sperle, I., Lachmann, R., Kleta, S., Fischer, M.A., Wamp, S., Holzer, A., Lüth, S., Murr, L., Freitag, C. and Espenhain, L., 2023. Large multicountry outbreak of invasive *Listeriosis* by a *listeria monocytogenes* ST394 clone linked to smoked rainbow trout, 2020 to 2021. *Microbiology Spectrum*, 11(3), pp.e03520-22.
- Markovich, Y., Palacios-Gorba, C., Gomis, J., Gómez-Martín, Á., Ortolá, S. and Quereda, J.J., 2024. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in Spain. *Veterinary Microbiology*, 293, p.110086.
- Moura, A., Leclercq, A., Vales, G., Tessaud-Rita, N., Bracq-Dieye, H., Thouvenot, P., Madec, Y., Charlier, C. and Lecuit, M., 2024. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes*: an observational study in France. *The Lancet Regional Health–Europe*, 37.
- Ed-Dra, A., 2024. Antimicrobial resistance dynamics of *Listeria monocytogenes* in France: where we are and what we need?. *The Lancet Regional Health–Europe*, 37.
- Vicente, M.F., Baquero, F. and Pérez-Díaz, J.C., 1988. Conjugative acquisition and expression of antibiotic resistance determinants in *Listeria* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 21(3), pp.309-318.
- **TRENDS AND SOURCES OF ZONOSSES AND ZONOTIC AGENTS IN FOODSTUFFS, ANIMALS AND FEEDINGSTUFFS including information on foodborne outbreaks, antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria and some pathogenic microbiological agents – Bulgaria 2022**
- **17th ERA-NET JPIAMR-ACTION “Interventions Moving forward to Promote ACTION to counteract the emergence and spread of bacterial and fungal resistance and to improve treatments”**
- **REGIONAL GUIDELINES FOR THE MONITORING AND SURVEILLANCE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE, USE AND RESIDUES IN FOOD AND AGRICULTURE VOLUME 5 - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH Bangkok, 2023**
- **OECD Health Policy Studies, Embracing a One Health Framework to Fight Antimicrobial Resistance** - <https://www.oecd.org/els/embracing-a-one-health-framework-to-fight-antimicrobial-resistance-ce44c755-en.htm>
- Siceloff, A.T., et al. (2022) Regional Salmonella Differences in United States Broiler Production from 2016 to 2020 and the Contribution of Multiserovar Populations to Salmonella Surveillance. *Applied and Environmental Microbiology*. doi.org/10.1128/aem.00204-22.
- **Roadmap of Actions of the European Partnership on One Health Antimicrobial Resistance (OHAMR) 2025-2032**
- **The European Union One Health 2022 Zoonoses Report - European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)** - <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/8442>

- *Antimicrobial consumption and resistance in bacteria from humans and food-producing animals - Fourth joint inter-agency report on integrated analysis of antimicrobial agent consumption and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA JIACRA IV – 2019–2021 - <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/8589>*
- *The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2021–2022 - European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) - <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/8583>*