https://doi.org/10.31631/2073-3046-2023-22-6-108-123

Гетерогенность антибиотикорезистентных изолятов *Listeria monocytogenes*, выделенных из пищевой продукции в Москве

Ю. В. Михайлова, А. Д. Молчанов*, А. А. Шеленков, М. А. Тюменцева, К. С. Карбышев, А. И. Тюменцев, А. Е. Егорова, Н. Г. Куликова, И. Н. Манзенюк, В. Г. Акимкин

Центральный научно-исследовательский институт Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Резюме

Актуальность. *Listeria monocytogenes – повсеместно распространенная бактерия, возбудитель листериоза. Это широко распространенная инфекционная болезнь, которая в настоящее время наносит большой ущерб животноводству и является серьезной угрозой здоровью людей.* ***Цель.*** *Проанализировать популяционную структуру и оценить патогенный потенциал изолятов Listeria monocytogenes, выделенных на территории РФ.* ***Материалы и методы.*** *Всего из продуктов питания было выделено 79 изолятов листерий. Их видовую идентификацию и фенотипический анализ на устойчивость к антибиотикам проводили на приборе VITEK MS system (bioMerieux, Marcyl'toile, Франция). Тридцать пять антибиотикорезистентных изолятов были охарактеризованы с помощью анализа данных полногеномного секвенирования.* ***Результаты.*** *Определена клональная структура изученной популяции, выявлены немногочисленные детерминанты устойчивости к антибиотикам (fosX, tetM и clpL), обширный набор факторов вирулентности и системы CRISPR/Cas. Большая часть изолятов относилась ко II филогенетической линии и разделилась на девять клональных комплексов с доминированием CC 121, который является одним из эпидемиологически значимых генетических клоном. Обнаружены также два CC2-изолята, принадлежащих к наиболее патогенной филогенетической линии I. Тринадцать изолятов характеризовались наличием полноценных CRISPR/Cas систем IB и IIA типов, при этом все CC121-изоляты в своих геномах содержали одновременно два типа выявленных систем адаптивного иммунитета. Корреляционный анализ подтвердил их функциональность.* ***Заключение.*** *Мы полагаем, что полученные данные о полных геномах изолятов Listeria monocytogenes пищевого происхождения облегчат и дополнят дальнейшие исследования эпидемиологии данного патогена, вариабельности его генома с точки зрения приобретения различных генетических элементов, связанных с адаптацией, устойчивостью к противомикробным препаратам и вирулентностью. В свою очередь, результаты таких исследований помогут разработать профилактические меры для эффективного решения проблем, связанных с контаминацией бактериальными патогенами продуктов животного происхождения, и обеспечения пищевой безопасности в условиях производств и векторной цепочки «от фермы до стола».*

Ключевые слова: *пищевая безопасность, антибиотикорезистентность, факторы вирулентности, патогенный потенциал, CRISPR/Cas системы, геномная эпидемиология*

Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: *Михайлова Ю. В., Молчанов А. Д., Шеленков А. А. и др. Гетерогенность антибиотикорезистентных изолятов Listeria Monocytogenes, выделенных из пищевой продукции в Москве. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2023;22(6):108-123. https://doi:10.31631/2073-3046-2023-22-6-108-123*

Heterogeneity of Antibiotic-Resistant Isolates of Listeria Monocytogenes Isolated from Food Products in Moscow

*YuV Mikhailova, AD Molchanov**, AA Shelenkov, MA Tyumentseva, KS Karbyshev, AI Tyumentsev, AE Egorova, NG Kulikova, IN Manzenyuk, VG Akimkin*

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Relevance. *Listeria monocytogenes is a ubiquitous bacterium that causes listeriosis, which represents a widespread infectious disease currently inflicting great damage to livestock production and posing a serious threat to human health.* ***Aim.*** *To analyze the population structure and assess the pathogenic potential of Listeria monocytogenes isolates isolated on the territory*

* *Для переписки: Молчанов Артем Дмитриевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов антибиотикорезистентности, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, Россия, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А. +7 (977) 927-66-17, Molchanov@cmd.su. ©Михайлова Ю. В. и др.*

** *For correspondence: Molchanov Artem D., junior research officer at the Laboratory of Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance of the Federal Budgetary Institution Central Research Institute of Experimental Radiotherapy of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia. . +7 (977) 927-66-17, Molchanov@cmd.su. ©Mikhailova YuV, et al.*

of the Russian Federation. ***Materials and methods.*** *A total of 79 listeria isolates were isolated from food products. Species identification and phenotypic analysis for antibiotic resistance were performed using VITEK MS system (bioMerieux, Marcyl'toile, France). Thirty-five antibiotic-resistant isolates were characterized by analysis of whole-genome sequencing data.* ***Results.*** *Whole genome sequences of thirty-five antibiotic-resistant Listeria monocytogenes isolates of food origin were analyzed. We determined clonal structure of this population and revealed a small number of antibiotic resistance determinants (fosX, tetM и clpL), extensive set of virulence factors, as well as the presence of CRISPR/Cas systems. Most of the isolates belonged to phylogenetic line II and were divided into nine clonal complexes with the prevalence of CC121, which was one of the epidemiologically significant genetic clones. Two CC2 isolates belonging to the most pathogenic phylogenetic lineage I were also found. Thirteen isolates were characterized by the presence of putative CRISPR/Cas systems of IB and IIA types. All ST 121 isolates contained two types of identified adaptive immunity systems simultaneously in their genomes. Correlation analysis confirmed their functionality.* ***Conclusion.*** *We believe that the whole genome data obtained for the foodborne Listeria monocytogenes isolates will facilitate and complement further epidemiological studies of this pathogen, as well as the investigations of its genome variability in terms of the acquisition of various genetic elements associated with adaptation, antimicrobial resistance, and virulence. Moreover, the results of such studies will help to develop preventive measures to effectively solve problems associated with the bacterial contamination of animal products and ensure food safety in production conditions and the «farm-to-table» chain.*

Keywords: *food safety, antibiotic resistance, virulence factors, pathogenic potential, CRISPR/Cas systems, genomic epidemiology*
No conflict of interest to declare.

For citation: *Mikhailova YuV, Molchanov AD, Shelenkov AA et al. Heterogeneity of Antibiotic-Resistant Isolates of Listeria Monocytogenes Isolated from Food Products in MoscowEpidemiology and Vaccinal Prevention. 2023;22(6):108-123 (In Russ.). https://doi:10.31631/2073-3046-2023-22-6-108-123*

Введение

Listeria monocytogenes (Lm) – это грамположительная, микроаэрофильная, не образующая спор палочковидная бактерия, вызывающая у людей заболевание – листериоз [1]. Инфекция может проявляться у людей в виде инвазивной бактериемии и менингоэнцефалита. Высокому риску при листериозе подвержены беременные женщины и новорожденные, пожилые люди, пациенты с онкологическими заболеваниями, перенесшие трансплантацию органов, страдающие хроническими заболеваниями, лица, находящиеся на иммуносупрессивной терапии [1]. Листериоз считается одной из основных причин смерти при пищевом отравлении. В настоящее время подсчитано, что каждый год примерно 16% людей, заражающихся листериозом, умирают [«Listeria (Listeriosis),» 2021, https://www.cdc.gov/spanish/listeria/index.html].

Среди многочисленных видов рода *Listeria*, наиболее известен *L. monocytogenes*. Бактерии этого вида филогенетически и генотипически подразделяются на четыре эволюционных линии (I–IV). Установлено, что все линии имеют разные генетические, фенотипические и экологические характеристики. Изоляты линии I ассоциированы с большинством клинических случаев и вспышек среди людей, штаммы *Lm* линии II широко распространены в пищевых продуктах. Изоляты филогенетических линий III и IV являются редкими и преимущественно выделяются из источников животного происхождения [2]. Бактерии *Lm* линии II характеризуются обширным набором мобильных элементов и высокой скоростью рекомбинации по сравнению с изолятами линии I, несмотря на более высокую патогенность последней [2].

Патогенез, распространение и инвазия *Lm* зависят от таких факторов, как вирулентность, наличие генов антибиотикорезистентности и плазмид. Гены вирулентности являются одним из важнейших факторов патогенности. Известен ряд биологически активных молекул и поверхностных белков листерий, играющих важную роль на различных этапах взаимодействия с эукариотической клеткой – адгезии к клеткам-мишеням, лизисе мембраны и вакуолей, внутриклеточном размножении и распространении в другие клетки-хозяина. Гены, кодирующие известные факторы вирулентности (*prfA, hly, inlAB, actA, plcAB* и *mpl*), расположены на фрагменте хромосомы размерами около 10 тыс. пар нуклеотидов и функционально объединены в 4 оперона, транскрипция которых полностью или частично находится под контролем регуляторного белка *PrfA* [3].

Объекты пищевых производств также представляют собой неблагоприятную среду для листерий, главным образом, из-за процедур дезинфекции и очистки, включенных в санитарные правила, а вирулентность этого патогена связана с реакцией на стресс. Одной из недавно описанных систем реагирования на стресс является CRISPR-Cas [4]. Включение системы CRISPR-Cas в анализ геномов состоит в том, чтобы различать виды, устойчивые к антибиотикам с большим разнообразием плазмид, несущих гены устойчивости, и менее устойчивые виды, поскольку CRISPR препятствует поглощению фагов, содержащих некоторые гены вирулентности, а также плазмид, несущих гены устойчивости у многих бактерий [5].

Устойчивость к противомикробным препаратам является проблемой общественного здравоохранения во всем мире, особенно важной считается устойчивость патогенов, участвующих в цепочках

производства продуктов питания. За последние несколько десятилетий возникла и развивалась устойчивость листерий ко многим противомикробным препаратам [6]. Резистентность все чаще наблюдается у изолятов *Lm*, выделенных от людей, продуктов питания, растений и окружающей среды. Изоляты *Lm, выделенные от людей,* главным образом характеризовались устойчивостью к тетрациклину и ципрофлоксацину. *Lm* в пищевых продуктах отличает высокая распространенность резистентности к оксациллину и клиндамицину, значительный процент устойчивости к ампициллину, пенициллину G и тетрациклину был отмечен в штаммах *Lm*, выделенных из цепочек производства мяса, рыбы и молочных продуктов [7]. Для контроля эпидемиологического потенциала *Lm* одних только данных о восприимчивости патогена к антимикробным препаратам в большинстве случаев может быть недостаточно. При анализе рисков часто необходимо проводить дополнительное генетическое тестирование для сравнения аллелей определенных генов и изолятов, полученных из разных сред.

Полногеномное секвенирование представляет собой мощный инструмент для анализа бактериальных патогенов, позволяющий получить подробную информацию о типировании, о профилях детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности, плазмидных репликонах и филогении [8]. В этой работе мы провели сравнительный анализ полных геномов антибиотикорезистентных изолятов *Lm*, выделенных из пищевой продукции на территории РФ, для оценки их патогенного потенциала, вариабельности геномов, а также дальнейшего эпидемиологического мониторинга в условиях пищевых производств.

Цель исследования – проанализировать популяционную структуру и оценить патогенный потенциал изолятов *Listeria monocytogenes,* выделенных на территории РФ.

Материалы и методы

Сбор материала проводили с 2018 г. по 2020 г. в рамках контрольных функций референс-центра ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии по остаточному количеству антибиотиков и антибиотикорезистентности бактерий в продовольственном сырье и пищевых продуктах (Москва).

Фенотипический анализ на чувствительность к антимикробным препаратам (АМП) выделение геномной ДНК и пробоподготовку для полногеномного секвенирования выполняли по методикам, описанным ранее [8].

Сборку геномов осуществляли с помощью программы SPAdes, версия 3.15.2 (https://cab.spbu.ru/software/spades/). Геномы были депонированы в базу данных Genbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) под номером проекта PRJNA974000.

Выявление детерминант антибиотикорезистентности и генов вирулентности производили в программах Resfinder ((https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/) и Virulence finder (https://cge.food.dtu.dk/services/VirulenceFinder/) соответственно, с параметрами по умолчанию. Для мультилокусного типирования использовали базу данных BIGSdb (https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/). Серотип у анализируемых изолятов *Lm определяли в соответствии с критериями*, установленными ранее [9], на основании аллелей генов lmo0737, lmo1118, ORF2110, ORF2819, prs *с применением программного обеспечения с сайта* bigsdb.pasteur.fr (https://bigsdb.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_listeria_isolates&page=profiles, раздел PCR-serogroup).

Определение cgMLST профилей проводили с помощью программы MentaList версии 0.2.4 с параметрами по умолчанию с помощью схемы, представленной в работе Moura, et al. [10], содержащей 1748 локусов. Минимальное остовное дерево построено с использованием программы PHYLOViz online (http://online.phyloviz.net/index).

Поиск кассет CRISPR-Cas, а также определение их типа осуществляли с помощью программы CRISPR-finder и базы CRISPRCasdb соответственно. Анализ спейсеров в кластерах CRISPR изолятов CrieF *Lm* с предполагаемыми системами CRISPR/Cas выполняли с помощью Web BLAST®. Спейсеры CrieF *Lm* были идентифицированы и загружены из интернет-ресурса CRISPRFinder [11] (http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/, по состоянию на 20 марта 2023 г). Последовательности FASTA спейсеров CrieF *Lm* были загружены в программный пакет Web BLAST® blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov, по состоянию на 20 марта 2023 г.) и проанализированы с использованием параметров алгоритма MegaBLAST по умолчанию. Тип кластера CRISPR оценивали с помощью CRISPRCasdb, где CRISPR4 представлял собой CRISPR уровня 4 (наиболее достоверные), а CRISPR уровней 1, 2 и 3 можно рассматривать как ложные CRISPR [12].

Прогнозирование последовательностей профагов и оценка вероятности активности профага были выполнены с использованием интернет-ресурса Prophage Hunter (https://pro-hunter.genomics.cn/index.php/Home/Index/index.html, по состоянию на 20 марта 2023 г.) [13]. Для каждого изолята CrieF *Lm* были подсчитаны последовательности профагов, относящиеся к категориям «Интактный», «Спорный» и «Неполный».

Анализ данных и построение графиков выполняли, применяя программу Prism 9 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

Результаты

Изоляты Listeria monocytogenes и их типирование

Типы пищевой продукции, из которых были выделены исследуемые образцы *Lm,* разделились на 4 основные группы: рыба и ее субпродукты (икра) (n = 18; 23%), куриные изделия (n = 30; 38%), говядина (n = 17; 21%), свинина и ее

полуфабрикаты (n = 14; 18%). На чувствительность к антимикробным препаратам тестировали 79 изолятов. Согласно данным фенотипического анализа, для дальнейшего проведения полногеномного секвенирования были отобраны 35 изолятов, устойчивых к триметоприму/сульфаметоксазолу и/или эритромицину.

Мультилокусное сиквенс-типирование in *silico* показало, что анализируемые изоляты *Lm* разделились на десять сиквенс-типов с преобладанием ST121 серовара 1/2a и ST37 серовара 1/2a (по 9 изолятов каждый; 25,7%). Пять изолятов относились к ST9 серовара 3a (14,2%). Все 35 изолятов, относящиеся к десяти сиквенс-типам (ST), принадлежали к девяти различным клональным комплексам (CC) (рис. 1A). Предписанные клональным комплексам филогенетические линии, согласно базе данных MLST BIGSdb-Lm, показали разделение изолятов по двум линиям I и II, в то же время отсутствовали штаммы, принадлежащие к III и IV филогенетическим линиям. Подавляющее число изолятов относилось ко II линии, кроме одного клонального комплекса (CC2), включающего такие изоляты, как CrieF125 и CrieF363, которые принадлежат к I филогенетической линии и серотипу 4b (рис. 1Б).

Как показано на рисунке 1, наиболее патогенная филогенетическая линия I, представленная изолятами CC2 серовара 4b, составила 5% от общего числа анализируемой выборки бактерий, что может представлять потенциальную эпидемиологическую опасность. При этом изоляты, относящиеся к данному серотипу, были обнаружены в курином мясе. Штаммы *Lm* филогенетической линии II, относящиеся к 1/2a серогруппе, составляли доминирующую часть анализируемой выборки изолятов (n = 25, 71,4%).

Фенотипический анализ и детерминанты антибиотикорезистентности

Сравнительные данные анализа на чувствительность к АМП, а также выявленные детерминанты антибиотикорезистентности изученных изолятов *Lm* представлены в таблице 1. Согласно полученным результатам фенотипического анализа, изоляты, устойчивые к карбопенемам (меропенем), были выявлены только в 2020 г. (16,6%). В то же время штаммы, резистентные к сульфаниламидам (триметоприм и сульфаметоксазол), выделялись в течение всего периода исследования (97,1%). Штаммов *Lm,* резистентных к препарату терапии листериоза – ампицилину, не было выявлено. При анализе на чувствительность к эритромицину обнаружено десять изолятов *Lm* (n = 28,6%), устойчивых к тестируемому антибиотику. При этом, у этих образцов не был найден соответствующий ген антибиотикорезистентности и не обнаружены плазмиды, которые могли бы содержать детерминанты, отвечающие за резистентность к эритромицину.

С помощью полногеномного анализа in *silico* были выявлены следующие детерминанты антибиотикорезистентности: ген *tet(M)* (кодирующий устойчивость к тетрациклину), *fosX* (кодирующий устойчивость к фосфомицину) и clpL (ген, кодирующий белок теплового шока, способный модулировать ферменты биосинтеза клеточной стенки и приводить к снижению чувствительности к пенициллину [14]).

Как известно, бактерии *Lm* характеризуются природной устойчивостью к фосфомицину [15], поэтому ожидаемо ген *fosX* присутствовал у всех изолятов. Наличие же двух генов резистентности (*tetM* и clpL) наблюдалось у 12 (n = 34%) изолятов, у 11 (n = 31,4%) – только ген *clpL*, при этом 8 изолятов относились к CC121. Только два изолята – CrieF122 и CrieF349 (n = 5,7%) несли ген *tet(M)*. Все три гена устойчивости присутствовали у одного изолята CrieF122, поученного из курицы и относящегося к филогенетической линии II и серовару 3a.

Филогенетический анализ изученных изолятов *Listeria monocytogenes*

Для получения дополнительной информации о гетерогенности изучаемой популяции *Lm* было проведено сравнение полных геномов изолятов *Lm* по установленным профилям cgMLST согласно схеме Moura, et al. 2016 {Formatting Citation}, включающей 1748 генов. Для этого на основе cgMLST профилей анализируемой выборки изолятов было построено минимальное остовное дерево (рис. 2), которое обладает высокой дискриминирующей способностью и четко демонстрирует генетическое разнообразие и родство исследуемых изолятов. На остовном дереве представлены изоляты, разделенные по трем большим (многочисленным) клональным комплексам (CC9, CC121 и CC37) и шести малым. Количество различных аллелей между парами соответствующих изолятов внутри одного клонального комплекса составляло от 1 до 122, в то время как между изолятами разных комплексов достигало 1371 аллель. В соответствии с одним из предложенных пороговых значений изоляты *Lm*, отличающиеся друг от друга менее, чем на семь аллелей, относятся к одному штамму [10]. Согласно полученным результатам, пары изолятов CrieF369, CrieF370 и CrieF601, CrieF602, вероятно, принадлежат к одному штамму, так как не отличаются между собой первая пара и отличаются на 1 аллель – вторая пара. При этом CrieF601 и CrieF602 различаются только по аллелю lmo2019, который не был обнаружен в CrieF602 вследствие, с большой вероятностью, ошибки секвенирования или недостаточного покрытия именно этого гена. Эти изоляты относятся к клональному комплексу CC37. Следует отметить, что упомянутые пары изолятов выделены из разных типов пищевой продукции: салат, курица, говядина и рыба (см. табл. 1). Дата выделения CrieF369 и CrieF370 отличалась на один

Рисунок 1. Разнообразие клональных комплексов и распределение типов продуктов питания по серотипам
Figure 1. Diversity of clonal complexes and distribution of food types by serotype.

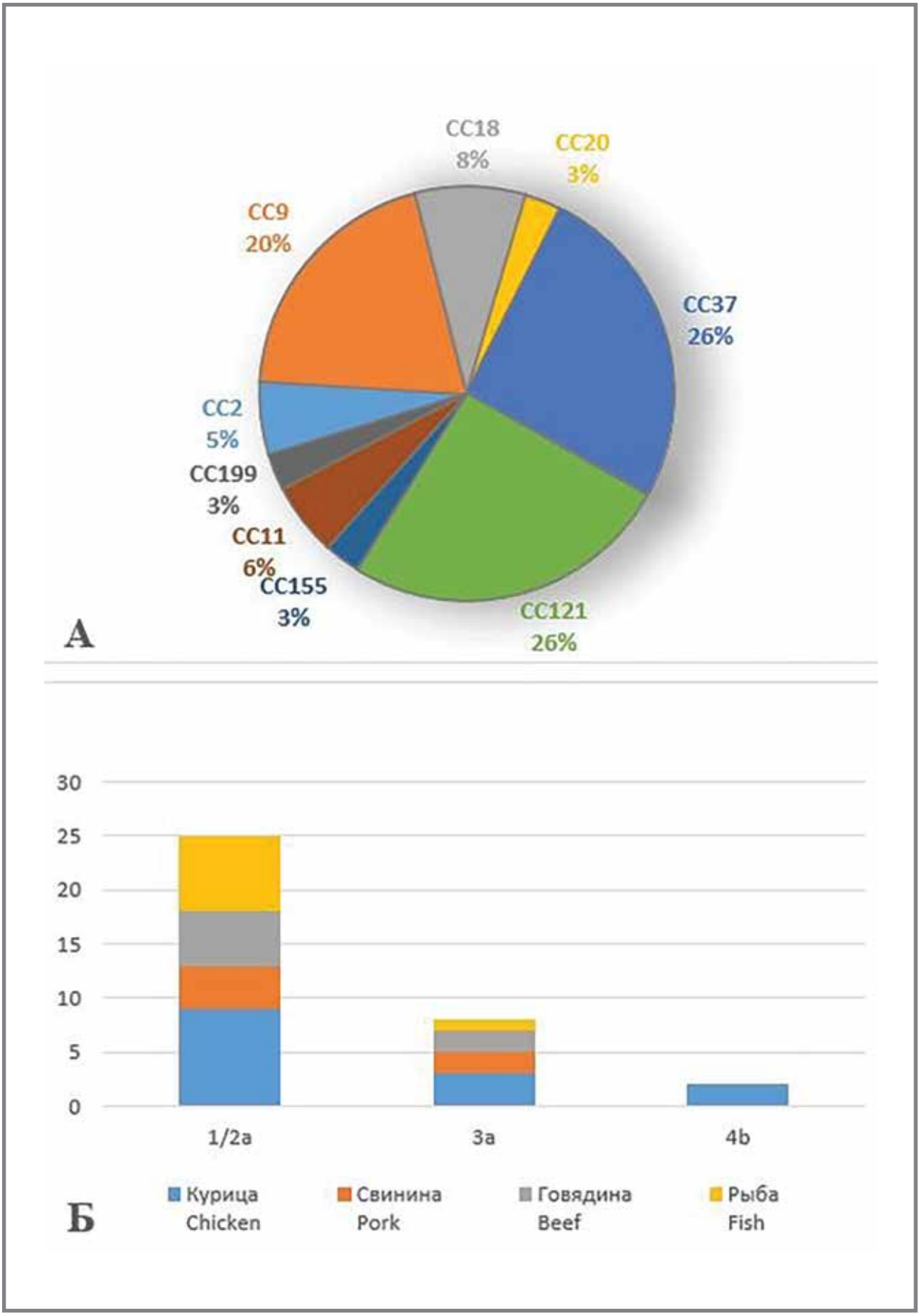


Таблица 1. Распределение генов резистентности и чувствительность к антибиотикам у изученных изолятов Listeria monocytogenes
Table 1. Distribution of resistance genes and sensitivity to antibiotics in the studied Listeria monocytogenes isolates

Номер изолята Isolate number	ST;CC;Lineage	Вид продукта питания Type of food	Дата выделения Extraction date	Меропенем Meropenem	Триметоприм / Сульфаметоксазол Trimethoprim / Sulphamethox	Эритромицин Erythromycin	ClpL	tet(M)
Crie-F121*	9;9;II	Курица Chicken	25.09.2018	S	R	R	-	-
Crie-F283*	9;9;II	Курица Chicken	19.04.2019	S	S	S	-	-
Crie-F285	9;9;II	Рыба Fish	24.04.2019	S	R	S	-	-
Crie-F349	9;9;II	Свинина Pork	15.04.2019	S	R	S	-	+
Crie-F368*	9;9;II	Курица Chicken	20.11.2019	S	R	S	-	-
Crie-F282	580;9;II	Говядина Beef	15.04.2019	S	R	S	+	-
Crie-F348	580;9;II	Свинина Pork	24.04.2019	S	R	S	+	-
Crie-F123	121;121;II	Рыба Fish	25.09.2018	S	R	R	+	-
Crie-F126	121;121;II	Говядина Beef	28.09.2018	S	R	R	+	-
Crie-F127	121;121;II	Курица Chicken	02.10.2018	S	R	R	+	-
Crie-F128	121;121;II	Курица Chicken	02.10.2018	S	R	R	+	-
Crie-F129	121;121;II	Курица Chicken	05.10.2018	S	R	R	+	-
Crie-F284	121;121;II	Говядина Beef	24.04.2019	S	R	S	-	-
Crie-F364	121;121;II	Рыба Fish	11.11.2019	S	R	S	+	-
Crie-F605	121;121;II	Говядина Beef	20.07.2020	S	R	S	+	-
Crie-F608	121;121;II	Свинина Pork	03.06.2020	S	R	S	+	-
Crie-F365	37;37;II	Свинина Pork	13.11.2019	S	R	S	-	-
Crie-F369*	37;37;II	Салат Salad	21.11.2019	S	R	S	-	-
Crie-F370*	37;37;II	Курица Chicken	20.11.2019	S	R	S	-	-
Crie-F599	37;37;II	Рыба Fish	20.07.2020	S	R	S	-	-
Crie-F600	37;37;II	Курица Chicken	20.07.2020	S	R	S	-	-
Crie-F601*	37;37;II	Говядина Beef	20.07.2020	S	R	S	-	-
Crie-F602*	37;37;II	Рыба Fish	20.07.2020	S	R	S	-	-

Таблица 1. Продолжение
Table 1. Continuation

Номер изолята Isolate number	ST;CC;Lineage	Вид продукта питания Type of food	Дата выделения Extraction date	Меропенем Meropenem	Триметоприм / Сульфаметоксазол Trimethoprim / Sulphamethox	Эритромицин Erythromycin	ClpL	tet(M)
Crie-F609	37;37;II	Курица Chicken	05.06.2020	S	R	S	-	-
Crie-F817	37;37;II	Рыба Fish	01.06.2020	R	R	R	-	-
Crie-F281	18;18;II	Говядина Beef	15.04.2019	S	R	S	-	-
Crie-F366	18;18;II	Рыба Fish	20.11.2019	S	R	S	-	-
Crie-F367	18;18;II	Свинина Pork	20.11.2019	S	R	S	-	-
Crie-F603	451;11;II	Свинина Pork	20.07.2020	S	R	S	-	-
Crie-F604	451;11;II	Курица Chicken	22.0.2020	S	R	S	-	-
Crie-F125	2;2;I	Курица Chicken	28.09.2018	S	R	R	-	-
Crie-F363	2;2;I	Курица Chicken	07.11.2019	S	R	S	-	-
Crie-F606	155;155;II	Рыба Fish	22.0.2020	S	R	S	-	-
Crie-F122	199;199;II	Курица Chicken	25.09.2018	S	R	R	+	+
Crie-F815	20;20;II	Говядина Beef	01.06.2020	R	R	R	-	-

*Примечание: изоляты, относящиеся к наиболее многочисленным клональным комплексам, отмечены цветом, включая 2 изолята наиболее патогенной филогенетической линии I. * обозначает изоляты относящиеся к одному штамму.*
*Note: isolates belonging to the most numerous clonal complexes are indicated by color, including 2 isolates of the most pathogenic phylogenetic lineage I. * denotes isolates belonging to the same strain.*

день, а CrieF601 и CrieF602 были выделены в один и тот же день (см. табл. 1).

Построенное минимальное остовное дерево четко демонстрирует гетерогенность изолятов другого клонального комплекса – CC9, включающего штаммы *Lm,* принадлежащие к двум сиквенс-типам: ST9 и ST580. Бактерии *Lm* этих генетических линий отличаются друг от друга 54 аллелями, а внутри каждого сиквенс-типа ST9 и ST580 отличия между изолятами составили 1– 49 и 27 аллелей соответственно. При этом три ST9-изолята CrieF121, CrieF368 и CrieF283, выделенные из курицы, отличаются друг от друга одним (в паре CrieF121-368 – lmo1594, не обнаружен у CrieF121) и пятью генами (CrieF121-F283 и F368-F283: lmo0027, lmo0617, lmo0884, lmo1594 не найдены в одном из изолятов пары, lmo2019 имеет разные аллели у пары (1 и 165 соответственно) cgMLST, соответственно, а значит, относятся к одному штамму (см. рис. 2).

Гены вирулентности

Спектр генов вирулентности изученных изолятов был достаточно консервативен. Согласно анализу *in silico*, большинство изолятов несли 33 фактора вирулентности, при этом все они содержали остров патогенности LIPI-1, регулируемый геном *prfA*. Несмотря на высокое сходство генов вирулентности у изученных образцов *Lm*, были выявлены некоторые различия, представленные в таблице 2.

Так, изоляты, относящиеся к шести разным клональным комплексам (CC 9, 11, 18, 20, 155 и 199), несли все 33 выявленных фактора вирулентности, в то время как у изученных штаммов других генетических линий отсутствовали от одного до четырех генов вирулентности. Для изолятов CC37 было характерно отсутствие только одного гена вирулентности *vip* (белок, вовлеченный в проникновение через кишечный барьер посредствам связывания рецептора Gp96) (https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A3T1TDM3/entry).

Рисунок 2. Минимальное остовное дерево, построенное на основе профилей cgMLST изолятов L. monocytogenes
Figure 2. Minimum spanning tree constructed from cgMLST profiles of L. monocytogenes isolates

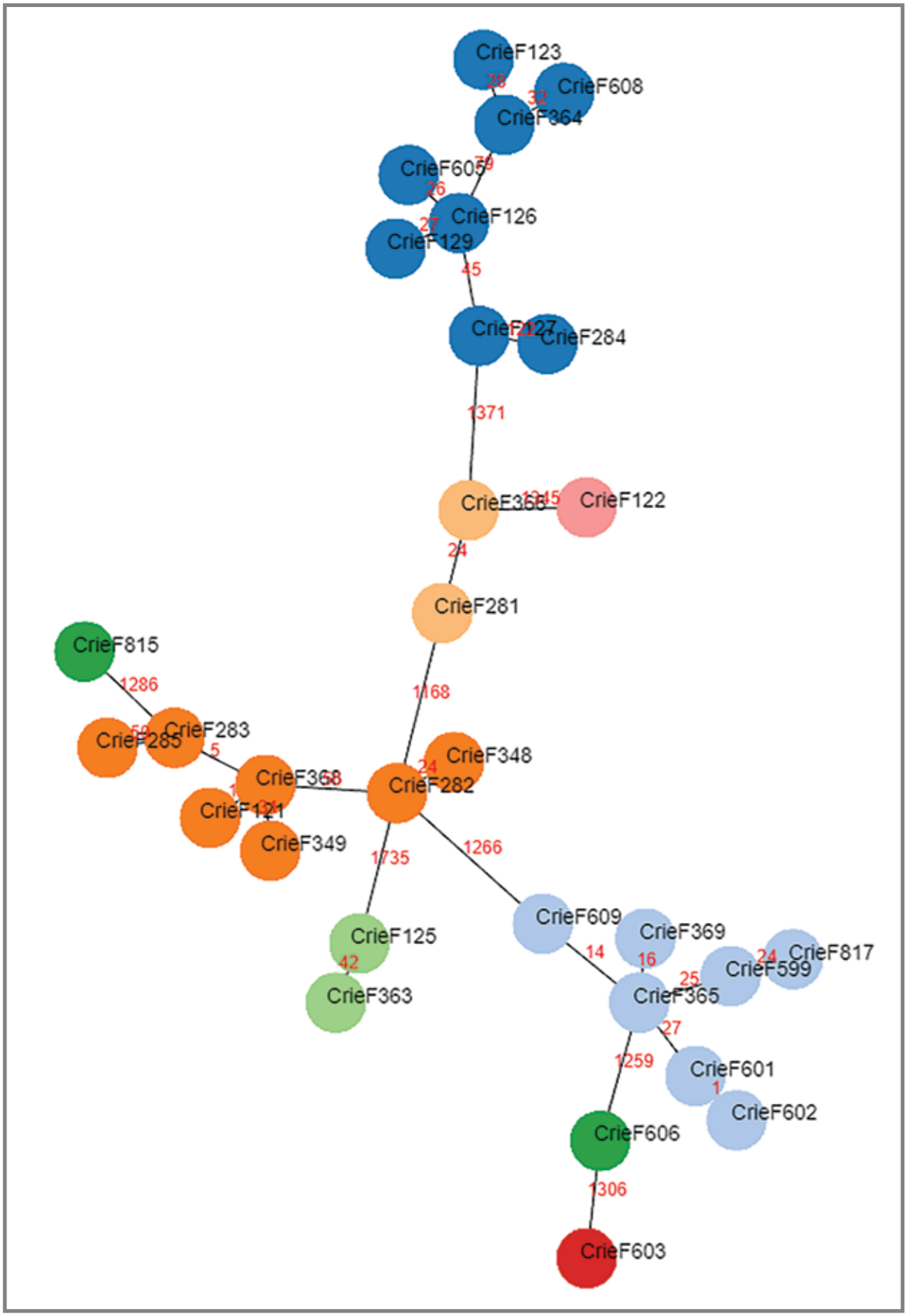


Таблица 2. Распределение клональных комплексов по наличию факторов вирулентности, изученных изолятов Listeria monocytogenes
Table 2. Distribution of clonal complexes according to the presence of virulence factors in the studied Listeria monocytogenes isolates

	actA	ami	aut	inlF	inlJ	vip
CC9, CC199, CC18, CC11, CC155, CC20	+	+	+	+	+	+
CC121	–	+	+	–	–	+
CrieF125	+	–	–	+	–	+
CrieF363	+	–	–	+	–	–
CC37	+	+	+	+	+	–

Примечание: гены, составляющие один и тот же кластер, представленные во всех изолятах, были объединены для сокращения формата. Знак «+» – наличие кластера генов, знак «–» – отсутствие. Цветом выделены самые крупные клональные комплексы.
Note: Genes forming the same cluster present in all isolates were combined to reduce the format. The «+» sign means the presence of a gene cluster, the «–» sign means the absence. The largest clonal complexes are highlighted in color.

Изоляты CrieF363 и CrieF125, относящиеся к CC2 и I филогенетической линии, не содержали генов кластеров *ami* (играет непосредственную роль в адгезии к эукариотическим клеткам через домен, связывающий клеточную стенку) (https://www.uniprot.org/uniprotkb/O33983/entry), *aut* (кодирует белки, участвующие в адгезии и инвазии в клетки человека) (https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9JXF0/entry) и *inlJ* (клеточная инвазия) (https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8Y3L4/entry). Однако у изолята CrieF125 в отличии от CrieF363 отсутствовал ген *vip*.

Штаммы CC121 характеризовались отсутствием генов *actA* (ген, кодирующий поверхностный белок, необходимый для актиновой подвижности, может также способствовать продвижению через клетки-хозяина) (https://www.uniprot.org/uniprotkb/P33379/entry), *inlF* и *inlJ* (оба интерналина отвечают за клеточную инвазию, https://www.uniprot.org/uniprotkb/O33930/entry).

CRISPR-Cas системы и корреляционный анализ

Системы CRISPR-Cas реализуют механизм адаптивного иммунитета у многих прокариотических микроорганизмов; они обеспечивают защиту от элементов горизонтального переноса генов и представлены во многих вариациях у разных видов [16]. Многообразие систем CRISPR-Cas указывает на их различные функции в соответствующих штаммах, которые, возможно, ассоциированы с разными сиквенс-типами, встречающимися в разных средах [17].

Поиск и анализ последовательностей CRISPR-Cas показал, что 13 из 35 исследуемых изолятов *Lm* (n = 37%) обладали предположительно функциональными (полноценными) CRISPR-Cas системами. При этом все изоляты, принадлежащие к ST 121, в своих геномах содержали одновременно CRISPR-Cas системы двух типов: IIA и IB (рис. 3). CRISPR-Cas систему IB типа имели четыре изолята, два из которых принадлежали к ST451, другие два – к ST155 и ST199. Геномы остальных десяти изолятов других сиквенс-типов (ST2, 9, 20 и 80) характеризовались только наличием гена Cas3 (рис. 4).

Анализ кластеров CRISPR изолятов CrieF *Lm* с предполагаемыми системами CRISPR/Cas выявил 805 спейсеров, 282 из которых были уникальными (119 – не повторяющиеся, 163 – повторяющиеся). Большинство уникальных спейсеров были идентифицированы как последовательности генома *Lm*, что программой обозначается как «*Listeria monocytogenes* strain 11-4254 genome», (78 и 109 спейсеров соответственно).

С помощью BLAST 13 из 119 не повторяющихся уникальных спейсеров были идентифицированы как спейсеры *Lm* («*Listeria monocytogenes* strain 48 CRISPR sequence») и 18 из 119 не повторяющихся уникальных спейсеров – как фаговые последовательности («Listeria phage A006, complete genome»), 30 из 119 — как плазмидные последовательности («*Listeria monocytogenes* strain LM-F-78 plasmid pLM-F-78, partial sequence»).

Идентифицированы как спейсеры *Lm* 17 из 163 повторяющихся уникальных спейсеров, 29 из 163 – как фаговые последовательности, 36 из 163 — как плазмидные последовательности. Один повторяющийся уникальный спейсер не был идентифицирован с применением алгоритма MegaBLAST («значимого сходства не обнаружено»). Этот спейсер был отнесен к геному *Herminia tarsipennalis* с помощью алгоритма BLASTN.

Для оценки предположительной функциональной активности выявленных CRISPR-Cas систем мы провели корреляционный анализ по следующему набору данных изолятов CrieF *Lm*: «Количество

Рисунок 3. Организация CRISPR-Cas систем IIA и IB типов, выявленных у изученных изолятов L. Monocytogenes
Figure 3. Organization of type IIA and type IB CRISPR-Cas systems identified in the studied L. monocytogenes isolates

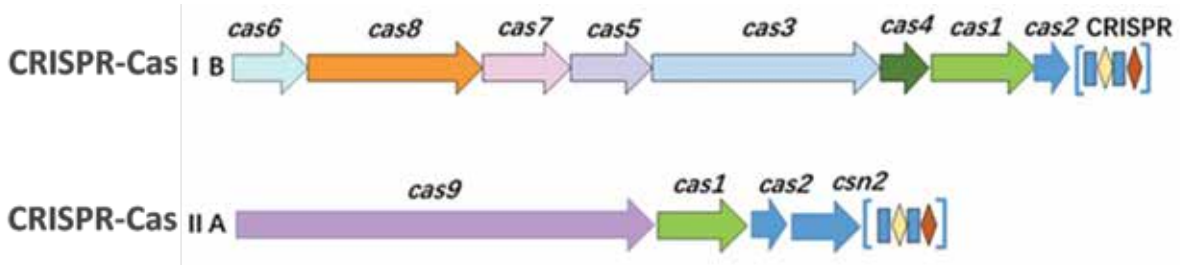


Рисунок 4. CRISPR-Cas системы, выявленные у изученных изолятов L. monocytogenes
Figure 4. CRISPR-Cas systems identified in the studied L. monocytogenes isolates

Номер изолята	Сиквенс-тип	Тип CRISPR-Cas системы
Crie-F606	ST155	IB
Crie-F122	ST199	IB
Crie-F603	ST451	IB
Crie-F604	ST451	IB
Crie-F123	ST121	IIA+IB
Crie-F126	ST121	IIA+IB
Crie-F127	ST121	IIA+IB
Crie-F128	ST121	IIA+IB
Crie-F129	ST121	IIA+IB
Crie-F284	ST121	IIA+IB
Crie-F364	ST121	IIA+IB
Crie-F605	ST121	IIA+IB
Crie-F608	ST121	IIA+IB
Crie-F125	ST2	Cas3
Crie-F363	ST2	Cas3
Crie-F121	ST9	Cas3
Crie-F283	ST9	Cas3
Crie-F285	ST9	Cas3
Crie-F349	ST9	Cas3
Crie-F368	ST9	Cas3
Crie-F815	ST20	Cas3
Crie-F282	ST580	Cas3
Crie-F348	ST580	Cas3

генов антибиотикорезистентности», «Количество кластеров генов вирулентности», «Количество плазмид», «Количество кластеров CRISPR4», «Количество кластеров CRISPR1, 2, 3», «Количество спейсеров CRISPR4», «Количество Cas-кассет», «Количество интактных профагов», «Количество спорных профагов» и «Количество неполных профагов».

После нормализации данных рассчитана непараметрическая корреляция Спирмена и построена корреляционная матрица (рис. 5).

В изучаемой выборке изолятов CrieF *Lm* была обнаружена достоверная низкая отрицательная корреляция между количеством генов устойчивости к антибиотикам и кластеров генов вирулентности ($r = -0{,}38$, $p = 0{,}025$), а также количеством генов устойчивости к антибиотикам и кластеров CRISPR1, 2, 3 ($r = -0{,}41$, $p = 0{,}016$). Кроме того, количество генов устойчивости к антибиотикам положительно коррелировало с количеством плазмид ($r = 0{,}45$, $p = 0{,}008$), кластеров CRISPR4 ($r = 0{,}42$, $p = 0{,}013$), спейсеров CRISPR4 ($r = 0{,}42$, $p = 0{,}013$) и Cas-кассет ($r = 0{,}67$, $p \le 0{,}0001$).

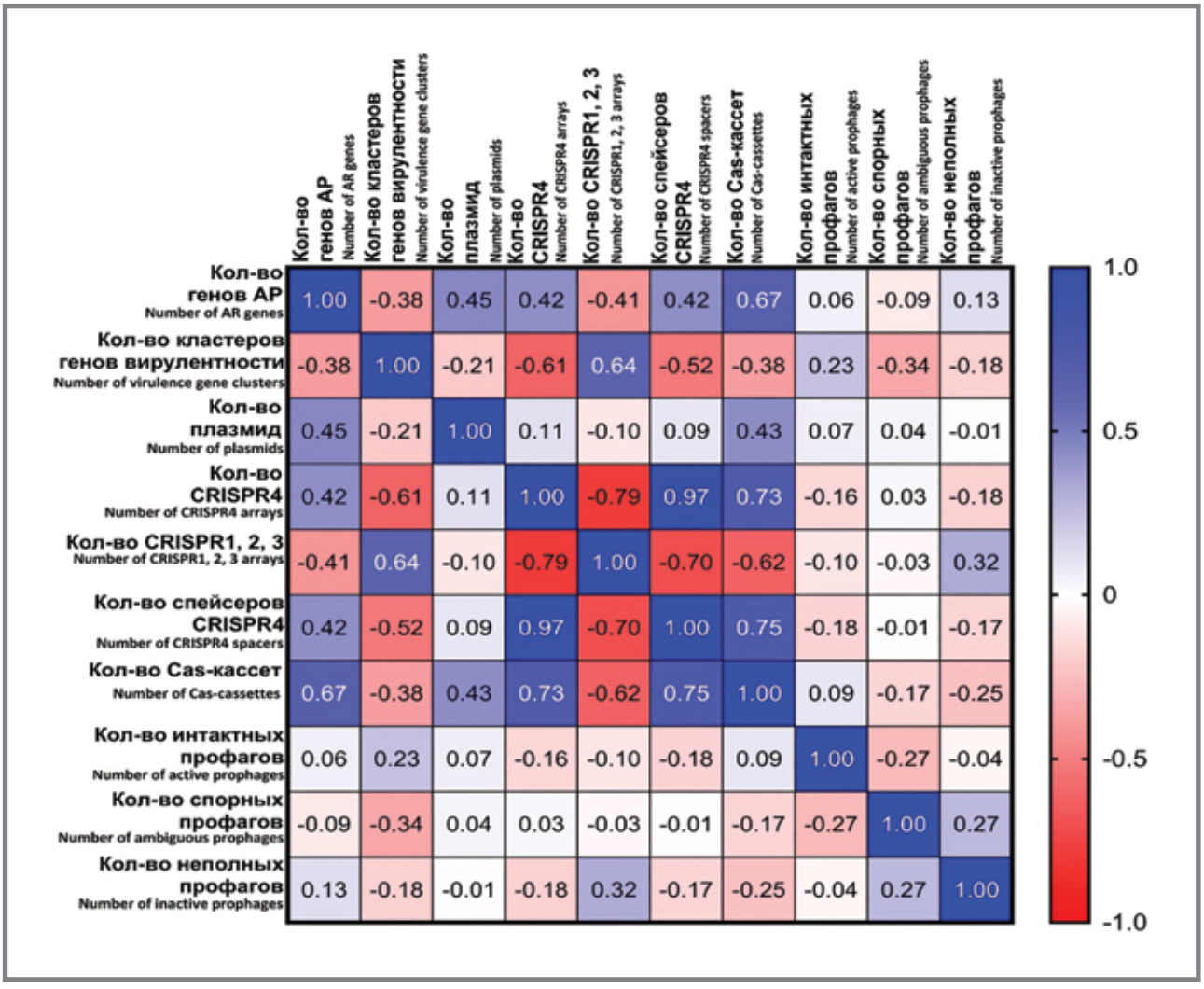
Количество кластеров генов вирулентности отрицательно коррелировало с количеством Cas-кассет ($r = -0{,}38$, $p = 0{,}028$), спорных профагов ($r = -0{,}34$, $p = 0{,}049$), кластеров CRISPR4 ($r = -0{,}61$, $p \le 0{,}0001$) и спейсеров CRISPR4 ($r = -0{,}52$, $p = 0{,}002$). В то же время, количество кластеров генов вирулентности положительно коррелировало с количеством кластеров CRISPR1, 2, 3 ($r = 0{,}64$, $p \le 0{,}0001$).

Также достоверная положительная корреляция была обнаружена между количеством Cas-кассет и плазмид ($r = 0{,}43$, $p = 0{,}012$), кластеров CRISPR4 ($r = 0{,}73$, $p \le 0{,}0001$) и спейсеров CRISPR4 ($r = 0{,}75$, $p \le 0{,}0001$).

Количество кластеров CRISPR1, 2, 3 отрицательно коррелировало с количеством Cas-кассет ($r = -0{,}59$, $p \le 0{,}0001$), кластеров CRISPR4 ($r = -0{,}79$, $p \le 0{,}0001$) и спейсеров CRISPR4 ($r = -0{,}70$, $p \le 0{,}0001$).

Наконец, крайне высокая достоверная положительная корреляция была обнаружена между количеством кластеров CRISPR4 и спейсеров CRISPR4 ($r = 0{,}97$, $p \le 0{,}0001$).

Рисунок 5. Корреляционная матрица для набора данных изолятов CrieF L. monocytogenes
Figure 5. Correlation matrix for the CrieF L. monocytogenes isolate data set



Обсуждение

В этой работе мы провели сравнительный анализ полных геномов 35 антибиотикорезистентных изолятов *L. monocytogenes*, полученных из пищевой продукции. Исследуемые бактерии были выделены из трех основных видов мясной продукции (курица, говядина, свинина) и рыбной продукции, что коррелирует с предыдущими исследованиями, в которых отмечалось, что наиболее часто контаминированы *Lm* были рыба, свинина, говядина, курица и молоко [18]. Кроме того, в нашем исследовании, мясо птицы было определено как один из самых распространенных источников и потенциальных переносчиков *Lm*. Из проанализированных 79 изолятов, частота встречаемости *Lm* в курином мясе составила 40%, что также подтверждается многочисленными исследованиями [19]. Было показано, что 8,6 и 44,2% соответственно образцов куриной грудки и бедра цыпленка были контамиированы *Lm*.

Согласно результатам мультилокусного типирования последовательностей *in silico* изолятов *Lm* нашей выборки, наиболее интересными являлись изоляты с такими сиквенс-типами, как ST2, ST9, ST37 и ST121. Так, штаммы ST2 (n = 5; 14,2%), согласно Лю С. с соавт., имеют более низкую способность к образованию биопленок, что ведет к более низкой устойчивости к условиям обработки пищевых продуктов [20]. Согласно отчету Сун Ц., генетическая линия ST9 (n = 5; 14,2%) характеризуется стабильным, но открытым (компетентным) геномом, допускающим интеграцию чужеродной ДНК, что приводит к его возрастающей способности адаптироваться к новым нишам и находиться в стадии быстрого развития и распространения [21]. Согласно неопубликованным данным, представленным Ворониной О. Л. на вебинаре MAKMAX «Профиль патогена: *Listeria monocytogenes*», ST37-изоляты характеризовались значительными различиями генома до пандемии SARS-CoV-2 и во время нее. Кроме того, с ST37-изолятами связано наибольшее число случаев смерти среди пациентов с листериозным менингитом. В своей работе Севеллек Я. утверждает, что ST121 (одна из эпидемически значимых генетических линий, n = 9; 25,7%), также наиболее широко представленный сиквенс-тип в нашем исследовании, обладает более высокой устойчивостью к сублетальным хлорсодержащим дезинфицирующим средствам, довольно широко используемым в пищевой промышленности [22]. В исследовании Ворониной О. Л. с соавт. показано, что ST121 был впервые выявлен в клинических изолятах, хотя до вспышки SARS-CoV-2 данный сиквенс-тип выделяли только из продуктов питания [23]. Вызванный этим сиквенс-типом листериоз приводил в том числе и к летальным исходам (https://www.antibiotic.ru/events/antitalk-season4/). Важно отметить, что в период пандемии SARS-CoV-2 в изолятах ST121 появились плазмиды, чего не было до пандемии. Согласно данным, полученным в нашем исследовании (см. табл. 1), к ST121 относилось наибольшее количество изолятов, имеющих резистентность к эритромицину (n = 5; 55,5%), а также 8 из 9 изолятов этого сиквенс-типа содержали ген *clpL*, что свидетельствует о их сниженной чувствительности к пенициллину.

По результатам фенотипического анализа, 10 изолятов *Lm* имели резистентность к эритромицину, триметоприму/сульфаметоксазолу и по два изолята к тетрациклину (CrieF349 и CrieF122) и меропенему (CrieF817 и CrieF122). Похожие результаты продемонстрировали Джамали Х. с соавт. [24], показав высокую устойчивость к тетрациклину (23,3%), пенициллину G и цефалотину (по 16,5%). Согласно предыдущим исследованиям [25], выявляемость антибиотикорезистентных *Lm* значительно выросла. Кроме того, возникающая резистентность к пенициллину штаммов из клинических образцов представляет собой еще одну серьезную проблему общественного здравоохранения, поскольку пенициллин является золотым стандартом для лечения листериоза у человека. Таким образом, факт выявления в ходе нашего исследования изолятов, устойчивых к триметоприму/сульфаметоксазолу, настораживает и свидетельствует о потенциальной опасности, связанной с потреблением полуфабрикатов.

Гены вирулентности могут быть вовлечены в сложный комплекс взаимодействий, которые индуцируют образование биопленки, что может являться еще одним фактором возникновения резистентности к противомикробным препаратам [3,26]. Так, в исследовании, проведенном Джамали Х. с соавт. на рыбном рынке под открытым небом в северном регионе Ирана, было показано, что 100% выделенных изолятов *Lm* были положительными в отношении генов *hlyA, inlA* и *inlC*, а 97.7% были положительными в отношении генов *inlJ* и *prfA* [24]. Эти результаты полностью совпадают с данными нашего исследования. У тридцати пяти изученных изолятов *Lm* было выявлено тридцать три гена вирулентности. Согласно полученным результатам, четырнадцать изолятов содержали все тридцать три гена, а соотношение генов *hlyA, inlA, inlC, inlJ* и *prfA* в точности совпадали с данными, предоставленными Джамали Х. с соавт. Стоит отметить, что отсутствие у изолятов CC121 гена *actA* при наличии коровых генов вирулентности LIPI-1, согласно исследованию Ангелакопулоса Х. с соавт. [27], ведет к потере вирулентности. Это связано с тем, что отсутствие *actA* в штаммах Lm делает их практически авирулентными, поскольку предотвращает перемещение бактерий внутри клеток-хозяев, избегая аутофагии и ускользая от аутофагического распознавания. Подробный анализ нуклеотидных последовательностей шести генов вирулентности, кодируемых LIPI-1, в изолятах Lm из разных географических мест, серотипов и источников выделения, выявил, что ген *actA* является наиболее

дивергентным, демонстрирующим наибольшее количество аллелей среди исследованных генов LIPI-1 [28]. Более того, в работе Мьинтзав П. с соавт. сравнительный анализ геномов 150 изолятов Lm разного происхождения показал, что распределение генов *actA, ecbA, inlF, inlJ, lapB,* LIPI-3 и *vip* среди штаммов Lm в значительной степени ассоциировано с их принадлежностью к той или иной клональной группе (CC), тогда как наличие генов *ami, inlF, inlJ* и LIPI-3 было выявлено исключительно у клинических изолятов листерий [3]. Авторы также продемонстрировали, что отсутствие генов *actA*, *inlF* и *inlJ* является специфичным признаком штаммов Lm клонального комплекса 121, результаты сравнительного анализа изолятов Lm CC121 в нашей работе четко согласуются с этими данными.

В работе Парра-Флорес Х. с соавт. [29] было показано, что гены *arsBC, bcrBC* и *clpL* придают *Lm* устойчивость к стрессу и дезинфицирующим средствам, а также, что все изоляты, полученные ими в Чили, содержали набор генов вирулентности полностью идентичный выявленному нами в изученной российской популяции листерий. В нашей выборке изолятов *Lm* помимо вышеупомянутых факторов вирулентности были обнаружены гены, которые кодируют ферменты, защищающие бактерий от агрессивной внешней среды или повышающие их выживаемость путем перехода из фагосомы в цитозоль клетки-хозяина [30]. Такие гены, как *pdgA* и *oatA* (пептидогликан N-деацетилазы и O-ацетилазы соответственно), могут быть необходимы для устойчивости к лизоциму хозяина. Мутация в этих двух генах приводит к повышению чувствительности пептидогликана к лизоциму, вызывая ослабление вирулентности *Lm*, что было показано в работе Рей С. с соавт. [30].

Ген *gtcA*, обнаруженный нами в тридцати пяти изолятах, кодирует фермент, который катализирует гликозилирование тейхоевой кислоты на стенке *Lm*. Такое гликозилирование опосредует ключевые признаки патогенности: правильное закрепление основных поверхностных факторов вирулентности (*ami* и i*nlB*); устойчивость к антимикробным пептидам и снижение восприимчивости к антибиотикам [3].

Накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что роль CRISPR/Cas систем не ограничивается формированием адаптивного иммунитета. Было показано, что у многих бактерий эти системы регулируют экспрессию генов, влияющих на вирулентность патогенных бактерий и групповое поведение (quorum sensing), а также участвуют в репарации ДНК и ускоряют эволюцию геномов [16]. Среди 35 изолятов *Lm* изучаемой нами выборки 13 характеризовались наличием полноценных CRISPR-Cas систем. При этом все ST121-изоляты в одном геноме одновременно несли две разные CRISPR-Cas системы (IIA и IB). Полученные нами данные четко согласуются с результатами работы Ванг И. с соавт. [17], в которой среди 259 изолятов *Lm*, выделенных из свинины разных производителей, более половины содержали системы CRISPR-Cas, а все ST121-штаммы несли системы IIA и IB. Несмотря на значительно отличающиеся по численности анализируемые выборки, наши данные также совпадают с таковыми в вышеупомянутой работе в отношении выявленного типа CRISPR-Cas-системы и принадлежности изолята к тому или иному сиквенс-типу. Так, например, китайские штаммы, принадлежащие к ST 155 и ST 451, так же, как и российские, характеризовались наличием IB CRISPR-Cas системы, а изоляты ST2, 9 и 20 двух разных географических регионов несли только остаточный ген, кодирующий белок Cas3.

Известно, что корреляция между наличием системы CRISPR-Cas и приобретением генами устойчивости к антибиотикам могут быть как положительными, так и отрицательными. Например, системы CRISPR типа I-F у *E. coli* ассоциированы с чувствительностью к антибиотикам. В то же время, система CRISPR-Cas у *Francisella novicida* поддерживает целостность оболочки, регулируя экспрессию липопротеинов оболочки, для повышения устойчивости к антибиотикам, как и система CRISPR-Cas у *Campylobacter jejuni* участвует в повышении устойчивости к антибиотикам, поскольку делеция гена Cas9 увеличивала чувствительность к антибиотикам. Согласно результатам проведенного корреляционного анализа, мы показали, что у исследуемых изолятов *Lm* количество генов антибиотикорезистентности положительно коррелирует с количеством кластеров CRISPR и Cas-кассет. Полученные данные, наряду с накопленной ранее информацией, подтверждают, что системы CRISPR-Cas могут влиять на приобретение мобильных элементов устойчивости к противомикробным препаратам или/и регулировать физиологический путь, связанный с устойчивостью к антибактериальным средствам [31]. Кроме того, мы показали, что количество ложных CRISPR кластеров [12] отрицательно коррелирует с количеством достоверных кластеров CRISPR и Cas-кассет, в то время как количество достоверных кластеров CRISPR положительно коррелирует с количеством Cas-кассет и спейсеров, что говорит о том, что выявленные CRISPR-Cas системы у изученных изолятов *Lm* представляют собой активно функционирующие системы прокариотического иммунитета.

Системы CRISPR/Cas разных типов не очень часто встречаются у листерий (менее 50%), но, очевидно, вносят существенный вклад в вариабельность генома этого патогена, который считается достаточно стабильным и консервативным, но, в то же время, открытым, что предполагает способность листерий адаптироваться к новым условиям путем генерирования или включения новой генетической информации [32]. Известно,

что утрата части факторов вирулентности представляет собой повторяющийся эволюционный паттерн у листерий, а отличия в содержании элементов CRISPR у *Lm* предполагают, что присутствие как отдельных ее элементов, так и полноценных систем адаптивного иммунитета является результатом событий переноса генов. Гомология выявленных спейсеров с последовательностями известных бактериофагов или плазмидами в базе данных NCBI свидетельствует о том, что система CRISPR/Cas, возможно, является ключевым звеном защитного алгоритма у *Lm*, что, в свою очередь, потенциально полезно для пищевой промышленности будущего в контексте биоконтроля патогенов с помощью фаговой санации и регуляции экспрессии генов.

Заключение

Таким образом, в нашем исследовании представлены данные по устойчивости к противомикробным препаратам, типированию, профилям детерминант антибиотикорезистентности и факторов вирулентности, а также системам CRISPR-Cas у антибиотикорезистентных изолятов *Lm*, выделенных из пищевых продуктов в России.

Согласно полученным результатам, часть изолятов характеризовалась высоким патогенным потенциалом. Нами показано, что отслеживание фенотипов и генотипов устойчивости к противомикробным препаратам, а также путей передачи *Lm* может являться эффективным методом эпидемиологического мониторинга. Динамические эпидемические исследования бактериальных патогенов на уровне полных геномов особенно необходимы для понимания генетического разнообразия и структур родственных вирулентных генов, генов устойчивости к антибиотикам и других элементов, подверженных горизонтальному переносу, включая системы CRISPR-Cas.

Финансирование

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках гранта в форме субсидии на создание и развитие «Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий», соглашение N 075-15-2019-1666.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Литература

1. *Orsi R.H., Wiedmann M. Characteristics and distribution of Listeria spp., including Listeria species newly described since 2009 // Appl Microbiol Biotechnol. Appl Microbiol Biotechnol, 2016. Vol. 100, № 12. P. 5273–5287.*
2. *Ragon M., Wirth T., Hollandt F., et al. A new perspective on Listeria monocytogenes evolution // PLoS Pathog. PLoS Pathog, 2008. Vol. 4, № 9.*
3. *Myintzaw P., Pennone V., McAuliffe O., et al. Association of Virulence, Biofilm, and Antimicrobial Resistance Genes with Specific Clonal Complex Types of Listeria monocytogenes // Microorganisms. MDPI, 2023. Vol. 11, № 6. P. 1603.*
4. *Espinoza-Mellado M.D.R., Vilchis-Rangel R.E. Review of CRISPR-Cas Systems in Listeria Species: Current Knowledge and Perspectives // Int J Microbiol. Hindawi Limited, 2022. Vol. 2022.*
5. *Palmer K.L., Gilmore M.S. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas // MBio. American Society for Microbiology, 2010. Vol. 1, № 4. P. 227–237.*
6. *Rodríguez-Melcón C., Alonso-Calleja C., Capita R. Effect of low doses of biocides on the susceptibility of Listeria monocytogenes and Salmonella enterica to various antibiotics of clinical importance // Food Control. Elsevier, 2023. Vol. 149. P. 109602.*
7. *Olaimat A.N., Al-Holy M.A., Shahbaz H.M., et al. Emergence of Antibiotic Resistance in Listeria monocytogenes Isolated from Food Products: A Comprehensive Review // Compr Rev food Sci food Saf. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2018. Vol. 17, № 5. P. 1277–1292.*
8. *Egorova A., Mikhaylova Y., Saenko S., et al. Comparative Whole-Genome Analysis of Russian Foodborne Multidrug-Resistant Salmonella Infantis Isolates // Microorganisms. Microorganisms, 2021. Vol. 10, № 1.*
9. *Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., et al. Differentiation of the major Listeria monocytogenes serovars by multiplex PCR // J Clin Microbiol. J Clin Microbiol, 2004. Vol. 42, № 8. P. 3819–3822.*
10. *Maury M.M., Tsai Y.H., Charlier C., et al. Uncovering Listeria monocytogenes hypervirulence by harnessing its biodiversity // Nat Genet. Nat Genet, 2016. Vol. 48, № 3. P. 308–313.*
11. *Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats // Nucleic Acids Res. Nucleic Acids Res, 2007. Vol. 35, № Web Server issue.*
12. *Pourcel C., Touchon M., Villeriot N., et al. CRISPRCasdb a successor of CRISPRdb containing CRISPR arrays and cas genes from complete genome sequences, and tools to download and query lists of repeats and spacers // Nucleic Acids Res. Oxford University Press, 2020. Vol. 48, № D1. P. D535.*
13. *Song W., Sun H.X., Zhang C., et al. Prophage Hunter: an integrative hunting tool for active prophages // Nucleic Acids Res. Oxford University Press, 2019. Vol. 47, № W1. P. W74.*
14. *Tran T.D.H., Kwon H.Y., Kim E.H., et al. Decrease in penicillin susceptibility due to heat shock protein ClpL in Streptococcus pneumoniae // Antimicrob Agents Chemother. Antimicrob Agents Chemother, 2011. Vol. 55, № 6. P. 2714–2728.*
15. *Scortti M., Han L., Alvarez S., et al. Epistatic control of intrinsic resistance by virulence genes in Listeria // PLoS Genet. PLoS Genet, 2018. Vol. 14, № 9.*
16. *Westra E.R., Buckling A., Fineran P.C. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity // Nat Rev Microbiol. Nat Rev Microbiol, 2014. Vol. 12, № 5. P. 317–326.*
17. *Wang Y., Ji Q., Li S., et al. Prevalence and Genetic Diversity of Listeria monocytogenes Isolated From Retail Pork in Wuhan, China // Front Microbiol. Front Microbiol, 2021. Vol. 12.*
18. *Osek J., Lachtara B., Wieczorek K. Listeria monocytogenes – How This Pathogen Survives in Food-Production Environments? // Front Microbiol. Frontiers Media S.A., 2022. Vol. 13. P. 1441.*
19. *Xedzro C., Tano-Debrah K., Nakano H. Antibacterial efficacies and time-kill kinetics of indigenous Ghanaian spice extracts against Listeria monocytogenes and some other food-borne pathogenic bacteria // Microbiol Res. Microbiol Res, 2022. Vol. 258.*
20. *Liu X., Chen W., Fang Z., et al. Persistence of Listeria monocytogenes ST5 in Ready-to-Eat Food Processing Environment // Foods (Basel, Switzerland). Foods, 2022. Vol. 11, № 17.*
21. *Song Z., Ji S., Wang Y., et al. The population structure and genetic diversity of Listeria monocytogenes ST9 strains based on genomic analysis // Front Microbiol. Frontiers Media S.A., 2022. Vol. 13.*
22. *Sévellec Y., Torresi M., Félix B., et al. First Report on the Finding of Listeria mnocytogenes ST121 Strain in a Dolphin Brain // Pathog (Basel, Switzerland). Pathogens, 2020. Vol. 9, № 10. P. 1–13.*
23. *Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Кунда М.С. и др. Итоги многоцентрового мониторинга возбудителя инвазивного листериоза в мегаполисе // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2023. Vol. 100, № 3. P. 143–154.*
24. *Jamali H., Paydar M., Ismail S., et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of Listeria species and Listeria monocytogenes isolated from open-air fish markets // BMC Microbiol. BMC Microbiol, 2015. Vol. 15, № 1.*
25. *Conter M., Paludi D., Zanardi E., et al. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne Listeria monocytogenes // Int J Food Microbiol. Int J Food Microbiol, 2009. Vol. 128, № 3. P. 497–500.*

26. Poimenidou S. V., Caccia N., Paramithiotis S., et al. Influence of temperature on regulation of key virulence and stress response genes in Listeria monocytogenes biofilms // Food Microbiol. Academic Press, 2023. Vol. 111. P. 104190.
27. Angelakopoulos H., Loock K., Sisul D.M., et al. Safety and Shedding of an Attenuated Strain of Listeria monocytogenes with a Deletion of actA/plcB in Adult Volunteers: a Dose Escalation Study of Oral Inoculation // Infect Immun. American Society for Microbiology (ASM), 2002. Vol. 70, № 7. P. 3592.
28. Poimenidou S. V., Dalmasso M., Papadimitriou K., et al. Virulence Gene Sequencing Highlights Similarities and Differences in Sequences in Listeria monocytogenes Serotype 1/2a and 4b Strains of Clinical and Food Origin From 3 Different Geographic Locations // Front Microbiol. Front Microbiol, 2018. Vol. 9, № JUN.
29. Parra-Flores J., Holý O., Bustamante F., et al. Virulence and Antibiotic Resistance Genes in Listeria monocytogenes Strains Isolated From Ready-to-Eat Foods in Chile // Front Microbiol. Front Microbiol, 2022. Vol. 12.
30. Rae C.S., Geissler A., Adamson P.C., et al. Mutations of the Listeria monocytogenes peptidoglycan N-deacetylase and O-acetylase result in enhanced lysozyme sensitivity, bacteriolysis, and hyperinduction of innate immune pathways // Infect Immun. Infect Immun, 2011. Vol. 79, № 9. P. 3596–3606.
31. Wan F., Draz M.S., Gu M., et al. Novel Strategy to Combat Antibiotic Resistance: A Sight into the Combination of CRISPR/Cas9 and Nanoparticles // Pharm 2021, Vol 13, Page 352. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 13, № 3. P. 352.
32. Kuenne C., Billion A., Mraheil M.A., et al. Reassessment of the Listeria monocytogenes pan-genome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome // BMC Genomics. BioMed Central, 2013. Vol. 14, № 1. P. 1–19.

Referenses

1. Orsi RH, Wiedmann M. Characteristics and distribution of Listeria spp., including Listeria species newly described since 2009. Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100(12):5273-5287. doi:10.1007/S00253-016-7552-2
2. Ragon M, Wirth T, Hollandt F, et al. A new perspective on Listeria monocytogenes evolution. PLoS Pathog. 2008;4(9). doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1000146
3. Myintzaw P, Pennone V, McAuliffe O, et al. Association of Virulence, Biofilm, and Antimicr al Resistance Genes with Specific Clonal Complex Types of Listeria monocytogenes. Microorganisms. 2023;11(6):1603. doi:10.3390/MICROORGANISMS11061603/S1
4. Espinoza-Mellado MDR, Vilchis-Rangel RE. Review of CRISPR-Cas Systems in Listeria Species: Current Knowledge and Perspectives. Int J Microbiol. 2022;2022. doi:10.1155/2022/9829770
5. Palmer KL, Gilmore MS. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. MBio. 2010;1(4):227-237. doi:10.1128/MBIO.00227-10/SUPPL_FILE/MBIO00227-10-SF03.PDF
6. Rodríguez-Melcón C, Alonso-Calleja C, Capita R. Effect of low doses of biocides on the susceptibility of Listeria monocytogenes and Salmonella enterica to various antibiotics of clinical importance. Food Control. 2023;149:109602. doi:10.1016/J.FOODCONT.2023.109602
7. Olaimat AN, Al-Holy MA, Shahbaz HM, et al. Emergence of Antibiotic Resistance in Listeria monocytogenes Isolated from Food Products: A Comprehensive Review. Compr Rev food Sci food Saf. 2018;17(5):1277-1292. doi:10.1111/1541-4337.12387
8. Egorova A, Mikhaylova Y, Saenko S, et al. Comparative Whole-Genome Analysis of Russian Foodborne Multidrug-Resistant Salmonella Infantis Isolates. Microorganisms. 2021;10(1). doi:10.3390/MICROORGANISMS10010089
9. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, et al. Differentiation of the major Listeria monocytogenes serovars by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2004;42(8):3819-3822. doi:10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004
10. Maury MM, Tsai YH, Charlier C, et al. Uncovering Listeria monocytogenes hypervirulence by harnessing its biodiversity. Nat Genet. 2016;48(3):308-313. doi:10.1038/NG.3501
11. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. Nucleic Acids Res. 2007;35(Web Server issue). doi:10.1093/NAR/GKM360
12. Pourcel C, Touchon M, Villeriot N, et al. CRISPRCasdb a successor of CRISPRdb containing CRISPR arrays and cas genes from complete genome sequences, and tools to download and query lists of repeats and spacers. Nucleic Acids Res. 2020;48(D1):D535. doi:10.1093/NAR/GKZ915
13. Song W, Sun HX, Zhang C, et al. Prophage Hunter: an integrative hunting tool for active prophages. Nucleic Acids Res. 2019;47(W1):W74. doi:10.1093/NAR/GKZ380
14. Tran TDH, Kwon HY, Kim EH, et al. Decrease in penicillin susceptibility due to heat shock protein ClpL in Streptococcus pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(6):2714-2728. doi:10.1128/AAC.01383-10
15. Scortti M, Han L, Alvarez S, et al. Epistatic control of intrinsic resistance by virulence genes in Listeria. PLoS Genet. 2018;14(9). doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1007525
16. Westra ER, Buckling A, Fineran PC. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. Nat Rev Microbiol. 2014;12(5):317-326. doi:10.1038/NRMICRO3241
17. Wang Y, Ji Q, Li S, et al. Prevalence and Genetic Diversity of Listeria monocytogenes Isolated From Retail Pork in Wuhan, China. Front Microbiol. 2021;12. doi:10.3389/FMICB.2021.620482
18. Osek J, Lachtara B, Wieczorek K. Listeria monocytogenes – How This Pathogen Survives in Food-Production Environments? Front Microbiol. 2022;13:1441. doi:10.3389/FMICB.2022.866462/BIBTEX
19. Xedzro C, Tano-Debrah K, Nakano H. Antibacterial efficacies and time-kill kinetics of indigenous Ghanaian spice extracts against Listeria monocytogenes and some other food-borne pathogenic bacteria. Microbiol Res. 2022;258. doi:10.1016/J.MICRES.2022.126980
20. Liu X, Chen W, Fang Z, et al. Persistence of Listeria monocytogenes ST5 in Ready-to-Eat Food Processing Environment. Foods (Basel, Switzerland). 2022;11(17). doi:10.3390/FOODS11172561
21. Song Z, Ji S, Wang Y, et al. The population structure and genetic diversity of Listeria monocytogenes ST9 strains based on genomic analysis. Front Microbiol. 2022;13. doi:10.3389/FMICB.2022.982220/FULL
22. Sévellec Y, Torresi M, Félix B, et al. First Report on the Finding of Listeria mnocytogenes ST121 Strain in a Dolphin Brain. Pathog (Basel, Switzerland). 2020;9(10):1-13. doi:10.3390/PATHOGENS9100802
23. Voronina OL, Ryzhova NN, Kunda MS. et al. Itogi mnogocentrovogo monitoringa vozbuditelya invazivnogo listerioza v megapolise. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. 2023;100(3):143-154. (In Russ). doi:10.36233/0372-9311-393
24. Jamali H, Paydar M, Ismail S, et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of Listeria species and Listeria monocytogenes isolated from open-air fish markets. BMC Microbiol. 2015;15(1). doi:10.1186/S12866-015-0476-7
25. Conter M, Paludi D, Zanardi E, et al. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne Listeria monocytogenes. Int J Food Microbiol. 2009;128(3):497-500. doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.10.018
26. Poimenidou S V., Caccia N, Paramithiotis S, et al. Influence of temperature on regulation of key virulence and stress response genes in Listeria monocytogenes biofilms. Food Microbiol. 2023;111:104190. doi:10.1016/J.FM.2022.104190
27. Angelakopoulos H, Loock K, Sisul DM, et al. Safety and Shedding of an Attenuated Strain of Listeria monocytogenes with a Deletion of actA/plcB in Adult Volunteers: a Dose Escalation Study of Oral Inoculation. Infect Immun. 2002;70(7):3592. doi:10.1128/IAI.70.7.3592-3601.2002
28. Poimenidou S V., Dalmasso M, Papadimitriou K, et al. Virulence Gene Sequencing Highlights Similarities and Differences in Sequences in Listeria monocytogenes Serotype 1/2a and 4b Strains of Clinical and Food Origin From 3 Different Geographic Locations. Front Microbiol. 2018;9(JUN). doi:10.3389/FMICB.2018.01103
29. Parra-Flores J, Holý O, Bustamante F, et al. Virulence and Antibiotic Resistance Genes in Listeria monocytogenes Strains Isolated From Ready-to-Eat Foods in Chile. Front Microbiol. 2022;12. doi:10.3389/FMICB.2021.796040
30. Rae CS, Geissler A, Adamson PC, et al. Mutations of the Listeria monocytogenes peptidoglycan N-deacetylase and O-acetylase result in enhanced lysozyme sensitivity, bacteriolysis, and hyperinduction of innate immune pathways. Infect Immun. 2011;79(9):3596-3606. doi:10.1128/IAI.00077-11
31. Wan F, Draz MS, Gu M, et al. Novel Strategy to Combat Antibiotic Resistance: A Sight into the Combination of CRISPR/Cas9 and Nanoparticles. Pharm 2021, Vol 13, Page 352. 2021;13(3):352. doi:10.3390/PHARMACEUTICS13030352
32. Kuenne C, Billion A, Mraheil MA, et al. Reassessment of the Listeria monocytogenes pan-genome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome. BMC Genomics. 2013;14(1):1-19. doi:10.1186/1471-2164-14-47/FIGURES/4

Об авторах

- **Юлия Владимировна Михайлова** – заведующая лабораторией молекулярных механизмов антибиотикорезистентности ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. +7 (903) 234-05-66, mihailova@cmd.su. ORCID 0000-0002-5646-538X.
- **Артем Дмитриевич Молчанов** – младший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов антибиотикорезистентности ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. +7 (977) 927-66-17, Molchanov@cmd.su. ORCID 0000-0001-5229-2285.

About the Authors

- **Yulia V. Mikhailova** – Head of the Laboratory of Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance at the Federal Budgetary Institution Central Research Institute of Experimental Radiotherapy of Rospotrebnadzor. +7 (903) 234-05-66, mihailova@cmd.su. ORCID 0000-0002-5646-538X.
- **Artem D. Molchanov** – junior research officer at the Laboratory of Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance of the Federal Budgetary Institution of Sciences Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor. +7(977)927-66-17, Molchanov@cmd.su. ORCID 0000-0001-5229-2285.

- **Андрей Александрович Шеленков** – старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов антибиотикорезистентности ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. +7 (926) 296-97-35, shelenkov@cmd.su. ORCID 0000-0002-7409-077X.
- **Марина Алексеевна Тюменцева** – заведующая лабораторией геномного редактирования ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. tyumentseva@cmd.su.
- **Константин Сергеевич Карбышев** – руководитель группы лаборатории экспериментальной фармакологии - группа обеспечения качества и архивирования ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Karbyshev@cmd.su.
- **Александр Игоревич Тюменцев** – заведующий лабораторией экспериментальной фармакологии ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. +7 (495) 974-96-46 (26-27), tymencev@cmd.su
- **Анна Евгеньевна Карпенко** – научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов антибиотикорезистентности ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. +7 (914) 669-86-12, a.egorova@cmd.su. ORCID 0000-0003-0486-1353.
- **Нина Георгиевна Куликова** – старший научный сотрудник, ВРИО руководителя научной группы антибиотикорезистентности пищевых патогенов ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. +7 (495) 974-96-46 (24-46), kulikova_ng@cmd.su.
- **Игорь Николаевич Манзенюк** – помощник директора по научной работе ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. +7(926)2960604, manzeniuk@cmd.su.
- **Василий Геннадьевич Акимкин** – директор ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. akimkin@pcr.ms.

Поступила: 30.10.2023. Принята к печати: 04.12.2023.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

- **Andrey A. Shelenkov** – senior research officer at the Laboratory of Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance of the Federal Budgetary Institution of Sciences Central Research Institute of Experimental Radiotherapy of Rospotrebnadzor. +7 (926) 296-97-35, shelenkov@cmd.su. ORCID 0000-0002-7409-077X.
- **Marina A. Tyumentseva** – head of the laboratory of genomic editing of the Federal Budgetary Institution Central Scientific Research Institute of Experimental Radiotherapy of Rospotrebnadzor. tyumentseva@cmd.su.
- **Konstantin S. Karbyshev** – group leader of the laboratory of experimental pharmacology - quality assurance and archiving group of the Federal Budgetary Institution Central Research Institute of Experimental Pharmacy of Rospotrebnadzor. Karbyshev@cmd.su.
- **Alexander I. Tyumentsev** – Head of the Laboratory of Experimental Pharmacology, Central Scientific Research Institute of Experimental Pharmacy, Rospotrebnadzor. +7 (495) 974-96-46 (26-27). tymencev@cmd.su.
- **Anna E. Karpenko** – research officer at the Laboratory of Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance at the Federal Budgetary Institution of Sciences Central Research Institute of Epidemiology and Epidemiology of Rospotrebnadzor. +7 (914) 669-86-12, a.egorova@cmd.su. ORCID 0000-0003-0486-1353.
- **Nina G. Kulikova** – Senior Research Officer - Acting Head of the Scientific Group on Antibiotic Resistance of Food Pathogens of the Federal Budgetary Institution Central Research Institute of Infectious Diseases of Rospotrebnadzor. +7 (495) 974-96-46 (2446), kulikova_ng@cmd.su.
- **Igor N. Manzenyuk** – assistant director for scientific work of the Federal Budgetary Institution of Sciences Central Research Institute of Energy of Rospotrebnadzor. +7 (926) 296-06-04. manzeniuk@cmd.su.
- **Vasily G. Akimkin** – Director of the Federal Budgetary Institution Central Research Institute of Energy of Rospotrebnadzor. akimkin@pcr.ms.

Received: 30.10.2023. Accepted: 04.12.2023.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.