

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

www.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273) Тираж 3000 экз.

Подписные индексы

По каталогу «Журналы России» на 2019 г. агентства «Роспечать»:

82125 – для индивидуальных подписчиков;

82126 – для организаций.

Подписка на сайте издателя

<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции

214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
cmac@antibiotic.ru

Электронная версия журнала:
www.cmac-journal.ru

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук. Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2019.

Содержание

Болезни и возбудители

- Макинтош Д.
253 Разработка вакцин против гонореи, сифилиса, хламидиоза, вируса простого герпеса, вируса иммунодефицита человека и вируса Зика
Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Кутузова А.В., Аксенова Е.И., Карпова Т.И., Тартаковский И.С., Ющук Н.Д., Климова Е.А., Кареткина Г.Н., Чемерис О.Ю., Груздева О.А., Мелкумян А.Р., Орлова О.Е., Бурмистрова Е.Н.
261 Листерия: генотипирование как ключ к выявлению возможного источника заражения
Муравьев А.А., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Куркова А.А., Цветкова И.А., Козлов Р.С. и исследовательская группа «SPECTRUM»
275 Эпидемиология серотипов *S. pneumoniae*, выделенных у лиц старше 18 лет: здоровых носителей, пациентов с острым средним отитом, внебольничной пневмонией и инвазивной пневмококковой инфекцией (исследование «SPECTRUM»)

Антимикробные препараты

- Елисеева Е.В., Азизов И.С., Зубарева Н.А.
282 Обзор международных согласительных рекомендаций по оптимальному использованию полимиксинов
Козлов Р.С., Голуб А.В.
310 Остановить темпы роста антибиотикорезистентности микроорганизмов сегодня – дать шанс на выживание человечества завтра

Антибиотикорезистентность

- Иванчик Н.В., Сухорукова М.В., Чагарян А.Н., Дехнич А.В., Козлов Р.С., Архипенко М.В., Беккер Г.Г., Гудкова Л.В., Ершова М.Г., Жолобова А.Ф., Зубарева Н.А., Исакова Л.М., Кречикова О.И., Морозова О.А., Москвитина Е.Н., Петрова Т.А., Сивая О.В., Чернявская Ю.Л.
317 Антибиотикорезистентность клинических штаммов *Haemophilus influenzae* в России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «ПеГАС 2014–2017»
Веселов А.В.
324 Резистентность *Candida glabrata* к эхинокандинам: некоторые аспекты проблемы
Зубарева Л.М., Эйдельштейн И.А., Руднева Н.С., Романов А.В., Власова Т.А., Лавриненкова Ю.В., Суханова Л.Н., Ахмедова А.М., Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Евстафьев В.В.
330 Распространенность ассоциированных с устойчивостью к макролидам мутаций у *Mycoplasma genitalium* среди пациентов с негонококковыми инфекциями, передающимися половым путем, в Смоленске и Туле

Опыт работы

- Шагинян И.А., Аветисян Л.Р., Чернуха М.Ю., Сиянова Е.А., Бурмистров Е.М., Воронкова А.Ю., Кондратьева Е.И., Чучалин А.Г., Гинцбург А.Л.
340 Эпидемиологическая значимость молекулярной изменчивости генома изолятов *Pseudomonas aeruginosa*, вызывающих хроническую инфекцию легких у больных муковисцидозом
Демин М.В., Тихомиров Д.С., Бидерман Б.В., Глинщикова О.А., Дроков М.Ю., Сударики А.Б., Туполева Т.А., Филатов Ф.П.
352 Мутации в гене UL97 цитомегаловируса, ассоциированные с устойчивостью к ганцикловиру, у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток
Кецко Ю.Л., Жестков А.В., Гусякова О.А., Лунина А.В., Лямин А.В.
359 Влияние тинкториальных свойств микроорганизма на нутритивный статус и ближайший прогноз у пациентов с синдромом системной воспалительной реакции бактериального генеза
Шамсиев Г.А., Хаммуд Ф.А., Закиров Ф.И., Попов Д.А., Лазарев Р.А., Абдуллоев О.К.
366 Случай успешного лечения инфекционного эндокардита митрального клапана, вызванного *Listeria monocytogenes*, после ранее выполненной операции на сердце

Листериоз: генотипирование как ключ к выявлению возможного источника заражения

Воронина О.Л.¹, Кунда М.С.¹, Рыжова Н.Н.¹, Кутузова А.В.¹, Аксенова Е.И.¹, Карпова Т.И.¹, Тартаковский И.С.¹, Ющук Н.Д.², Климова Е.А.², Кареткина Г.Н.², Чемерис О.Ю.², Груздева О.А.³, Мелкумян А.Р.⁴, Орлова О.Е.⁵, Бурмистрова Е.Н.⁶

¹ ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия

⁴ Городская клиническая больница им. Ф.И. Иноземцева, Москва, Россия

⁵ Городская клиническая больница им. Л.А. Ворохобова, Москва, Россия

⁶ Городская клиническая больница им. С.С. Юдина, Москва, Россия

Контактный адрес:

Ольга Львовна Воронина
Эл. почта: olv550@gmail.com

Ключевые слова: листериоз, *Listeria monocytogenes*, генотипирование, пищевая инфекция.

Цель. Провести сравнительный анализ клинических и пищевых изолятов *Listeria monocytogenes*, выделенных на территории европейской части России в 2018–2019 гг.

Материалы и методы. В работе использовали мультилокусное секвенирование (MLST), дополненное локусами вирулентности, включающими фрагменты генов интерналинов (MvLST), с последующим филогенетическим анализом.

Результаты. Основными диагнозами при выделении клинических изолятов *L. monocytogenes* были перинатальный и неонатальный листериоз и менингит. Клинические изоляты относились преимущественно к филогенетической линии II с преобладанием ST7, который также был наиболее многочисленным у изолятов из продуктов питания. Вторым по частоте встречаемости у пищевых изолятов был ST121, широко распространенный в Европе. Клинические изоляты филогенетической линии I в трех случаях были представлены ST6, обнаруженным при вспышках листериоза в Европе в 2015–2018 гг. и в Южной Африке в 2017–2018 гг. Принадлежность к филогенетической линии I отмечена только у одного изолята из продуктов питания. В целом разнообразие генотипов пищевых изолятов было существенно выше, чем клинических изолятов. Анализ локусов вирулентности выявил новый аллель интерналина A и новый профиль генов интерналинов у изолята ST7 из продуктов питания.

Выводы. *L. monocytogenes* наиболее распространенного ST7 является аутохтонной для России; случаи листериоза, вызванного изолятами ST6, скорее всего, относятся к завозным. На основании анализа разнообразия ST и профилей генов интерналинов *L. monocytogenes*, выявленных на территории России, предложена схема экспресс-диагностики при эпидемических расследованиях.

Original Article

Listeriosis: genotyping as a key for identification a possible source of infection

Voronina O.L.¹, Kunda M.S.¹, Ryzhova N.N.¹, Kutuzova A.V.¹, Aksenova E.I.¹, Karpova T.I.¹, Tartakovskij I.S.¹, Yushchuk N.D.², Klimova E.A.², Karetkina G.N.², Chemeris O.Yu.², Gruzdeva O.A.³, Melkumyan A.R.⁴, Orlova O.E.⁵, Burmistrova E.N.⁶

¹ N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

² A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

⁴ City Clinical Hospital named after F.I. Inosemtsev, Moscow, Russia

⁵ City Clinical Hospital named after L.A. Vorokhobov, Moscow, Russia

⁶ City Clinical Hospital named after S.S. Yudin, Moscow, Russia

Contacts:

Olga L. Voronina
E-mail: olv550@gmail.com

Key words: listeriosis, *Listeria monocytogenes*, genotyping, food-borne infection.

Objective. To perform a comparative analysis of clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes* collected in the European part of Russia in 2018–2019.

Materials and methods. We used multilocus sequencing (MLST), supplemented by virulence loci, including fragments of internalin genes (MvLST, Multi-virulent-locus sequence typing), followed by phylogenetic analysis.

Results. The main diagnoses for clinical isolates were prenatal and neonatal listeriosis and meningitis. Clinical isolates predominantly belonged to phylogenetic line II with the predominance of ST7, which was also the most abundant in food isolates. The second most common occurrence in food isolates was ST121, widely distributed in Europe. Isolates of phylogenetic line I in the group of clinical cultures in three cases were represented by ST6, detected during outbreaks of listeriosis in Europe 2015–2018 and South Africa in 2017–2018. Only in one isolate from food belonged to the phylogenetic lineage I. In general, the diversity of food isolate genotypes was significantly higher than clinical isolates. The analysis of virulence loci revealed a new internalin A allele and a new internalin genes profile (IP) in isolate ST7 from food.

Conclusions. *L. monocytogenes* of the most common ST7 is autochthonous in Russia; cases of listeriosis caused by the ST6 bacterium are most likely imported. Based on the analysis of the diversity of ST and IP of *L. monocytogenes* identified in Russia, a rapid diagnosis scheme for epidemiological investigation is proposed.

Введение

Листерия, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), является одним из наиболее серьезных и тяжелых заболеваний пищевого происхождения. Количество зарегистрированных случаев в год составляет 0,1–10 на 1 млн человек в зависимости от страны [1]. Если неинвазивный листериоз, имеющий короткий инкубационный период и характеризующийся лихорадкой, диареей, головной болью и миалгией, чаще не сопровождается выявлением возбудителя, то инвазивные случаи с инкубационным периодом длительностью до 90 дней приводят к госпитализации, обнаружению *Listeria monocytogenes* в биологических жидкостях и тканях пациента и смертельным исходам в 20–30% случаев [1]. Первая изученная вспышка листериоза с пищевым путем передачи, зарегистрированная в 1979–1981 гг. в Канаде (41 случай), показала, что при инвазивном заболевании преобладают две группы диагнозов: перинатальный листериоз (83%) и менингит у взрослых (15%). Один случай сопровождался пневмонией и сепсисом [2]. Следует отметить, что при поражении центральной нервной системы в результате инвазивного листериоза лечение не приводит к полному восстановлению здоровья, что отражает фактор «вес нетрудоспособности» (DW: 0 – здоровье, 1 – смерть), составляющий 0,426 [3].

Способность *L. monocytogenes* расти в широком диапазоне температур (от 1 до 45°C) позволяет достигать скоростей накопления биомассы 0,035–0,556 log₁₀ КОЕ/день при температуре хранения готовых продуктов (5–8°C) [4], поэтому даже незначительная контаминация зоны производства может привести к существенному количеству *L. monocytogenes* в потребляемых продуктах с учетом разрешенных сроков хранения.

Для контроля *L. monocytogenes* в готовых к употреблению продуктах специалисты ВОЗ и FAO (Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН) разработали руководство по применению общих принципов гигиены пищевых продуктов [5]. Международная сеть органов по безопасности пищевых продуктов (INFOSAN), которая связывает национальные органы государств-членов, отвечающих за управление мероприятиями по продовольственной безопасности, позволяет ВОЗ и FAO оказывать помощь в

эпидемиологическом надзоре, координации и реагировании на вспышки.

Центры США по контролю и профилактике заболеваний (CDC) на национальном уровне осуществляют координацию действий по контролю листериозной инфекции. CDC была создана PulseNet – сеть национальных лабораторий, собирающих данные о листерии в виде профилей, полученных методом геле-электрофореза в пульсирующем поле, и результатов геномного секвенирования. GenomeTrakr – еще одна сеть, позволяющая взаимодействовать организациям здравоохранения и лабораториям университетов, способным провести полногеномное секвенирование микроорганизмов. The *Listeria* Initiative – национальная эпидемиологическая система, которая собирает информацию о лабораторно подтвержденных случаях листериоза.

Европейские CDC (ECDC), в свою очередь, способствуют изучению возбудителя, координируя разработку и оптимизацию протоколов сборки геномов, поскольку собранные геномы позволяют проводить мультилокусное сравнение (wg/cgMLST) выделенных при вспышках бактерий для обнаружения источника инфекции. Референтной лабораторией Евросоюза для *L. monocytogenes* с 2006 г. является Французское агентство по безопасности пищевых продуктов, окружающей среды и гигиене труда (ANSES). Базой лаборатории служит Институт Пастера в Париже, который поддерживает и развивает базу данных мультилокусного и полногеномного секвенирования *L. monocytogenes* (<https://bigsd.biorchive.org/pasteur.fr/listeria/>) [6].

Несмотря на все перечисленные меры и инициативы, вспышки листериозной инфекции не оставляют человечество. Если на североамериканском континенте в последние годы не зарегистрировано масштабных вспышек (24 случая в США в 2017–2019 гг., 2 смертельных исхода [7], 7 случаев в Канаде [8]), то в Европе ситуация гораздо сложнее. Вспышка 2014–2019 гг., вызванная *L. monocytogenes* ST1247 (CC8) в рыбе холодного копчения, затронула 5 европейских стран. Подтверждено 22 случая листериоза (23% смертельных исходов) [9]. В 2015–2018 гг. *L. monocytogenes* ST6 в замороженных овощах привела к 47 случаям заболевания (19% смертельных исходов) в пяти странах [10]. Самой масштабной стала вспышка в августе–сентябре 2019 г.

в Испании, когда *L. monocytogenes* ST388 в свиной корейке вызвала 222 случая листериоза (3 смертельных исхода, 7 аборт) [11, 12]. Однако беспрецедентное количество заболеваний листериозной инфекцией было отмечено в Южной Африке в 2017–2018 гг.: 1060 заболевших, 216 умерших (20%), 42% случаев составил неонатальный листериоз [13, 14]; 91% изолятов относился к ST6 [14].

В России заболеваемость листериозом официально регистрируют с 1992 г., до 2016 г. ежегодно выявлялись до 100 заболевших листериозом [15]. В 2017 г. было зарегистрировано 205 случаев листериоза, т.е. 1% от 20,5 тыс. случаев природно-очаговых и зоонозных болезней, среди которых учитывают листериоз в Роспотребнадзоре [16]. Вместе с тем листериоз относят к группе инфекций, которые передаются с пищей [15], и контролируют согласно санитарно-эпидемиологическим правилам СП 3.1.7.2817-10 «Профилактика листериоза у людей». В НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи листерии изучали как возбудителя и природно-очаговых, и пищевых инфекций, уделяя внимание, прежде всего, лабораторной диагностике [17], что позволило сотрудникам центра принять участие в разработке Методических указаний МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах», принятых в 2002 г. С 2014 г. в России действует ГОСТ 32031-2012, являющийся межгосударственным стандартом для стран Евразийского экономического союза [18]. Основное внимание в этом документе уделено методам идентификации вида листерий: культуральным, морфологическим, биохимическим. Для ускоренной идентификации разрешено использование тестов и тест-систем, валидированных и сертифицированных по ГОСТ ISO 16140-2011, к которым относят системы ПЦР в реальном времени (Thermo Fisher Scientific, США) и визуальной иммунохроматографии (Merck, США). Отечественный набор «АмплиСенс® *Listeria monocytogenes*-скрин/монитор-FL» (ИнтерЛабСервис, Россия) зарегистрирован в 2015 г.

Методы серо- и генотипирования, позволяющие идентифицировать клоны и штаммы, ГОСТ 32031-2012 не регламентирует. Тем не менее эти методы получили свое развитие в специализированных лабораториях российских исследовательских центров.

В НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи активно используют метод MLST *Listeria monocytogenes*; кроме того, Ермолаевой С. и соавт. разработан подход для типирования локусов вирулентности, включающих фрагменты генов интерналинов, – MvLST (Multi-virulent-locus sequence typing) [19–22]. Дальнейшие исследования изолятов листерий [21–24] дополнили список аллелей интерналинов (InI) A, B, C, E и интерналиновых профилей (IP). Широта исследования, охват изолятов европейской части России и Дальневосточного федерального округа (ДФО) стали возможны благодаря многоцентровому сотрудничеству (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, НИИЭМ им. Г.П. Сомова, ФИЦВиМ, а теперь и филиалы ФИЦВиМ в ПФО). В ходе работы для сравнения клинического изолята и штамма из природного очага ДФО был применен метод полногеномного секвенирования (GenBank Accession Numbers: CP018148, CP018149).

Накопленный методический опыт позволил сотрудникам НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи включиться в новое исследование циркулирующих в России штаммов *Listeria monocytogenes* с целью поиска возможных источников инвазивного листериоза, выявляемого в медицинских организациях.

Материалы и методы

Было проанализировано две группы изолятов *L. monocytogenes*: 1) клинические (ноябрь 2018 г. – апрель 2019 г.), выделенные в лечебных учреждениях Москвы и Сызрани (Таблица 1); 2) из продуктов питания (январь 2018 г. – май 2019 г.), переданные лабораториями по исследованию объектов окружающей среды (Таблица 2). Вторая группа была дополнена изолятами из среды приготовления пищи (раковина ресторана),

Таблица 1. Характеристика клинических изолятов *L. monocytogenes*

Изолят	Фило-генетическая линия	ST	ID MLST Database	IP	Дата выделения	Пациент	Пол	Возраст	Диагноз	МКБ 10	Город
GIMC2014:LmcSH3	II	14	42983	27	09.11.2018	1	Ж	–	Листериоз; вторичный менингит	G03.9	Сызрань
GIMC2005:LmcIH1_1f	I	241	42973	43	01.02.2019	2	Ж	80	Менингит	G03.9	Москва
GIMC2008:LmcUH14	II	7	42976	15	18.04.2019	3_1	М	59	Менингит	G03.9	Москва
GIMC2007:LmcIH1_3	II	7	42975	15	25.04.2019	3_2	М	59	Менингит	G03.9	Москва
GIMC2011:LmcUH12	II	7	42979	15	30.11.2018	4	Ж	0	Неонатальный диссеминированный листериоз	P37.2	Москва
GIMC2009:LmcUH4	II	7	42977	15	13.02.2019	5	Ж	23	Преждевременные роды	O60.0	Москва
GIMC2010:LmcUH8	II	7	42978	15	13.02.2019	6	М	0	Врожденная пневмония неуточненная	P23.9	Москва
GIMC2012:LmcUH1	I	6	42981	44	06.03.2019	7	Ж	0	Неонатальный диссеминированный листериоз	P37.2	Москва

Продолжение табл. 1

Изолят	Фило-генетическая линия	ST	ID MLST Database	IP	Дата выделения	Пациент	Пол	Возраст	Диагноз	МКБ 10	Город
GIMC2006:LmcIH1_2	II	7	42974	15	07.03.2019	8	Ж	30	Листерийный сепсис, вызвавший самопроизвольный аборт на 18-й неделе	A32.7; O03	Москва
GIMC2002:LmcH67_1	I	6	42980	44	16.03.2019	9	Ж	0	Неонатальный диссеминированный листериоз	P37.2	Москва
GIMC2013:LmcUH16	I	6	42982	44	25.04.2019	10	М	65	Перенесенный инфаркт миокарда	I25.2	Москва

выделенными в июле 2019 г. (Таблица 2). Изоляты из окружающей среды, полученные из коллекции ФГБНУ ФИЦВиМ и использованные в группе сравнения, были проанализированы нами ранее [21, 24] и зарегистрированы в базе данных Institut Pasteur MLST and whole genome MLST (<https://bigsd.b.pasteur.fr/listeria/>) [6] под ID 5799-5801, 5803-5816.

Выделение культур *L. monocytogenes* из продуктов питания проводили согласно ГОСТ 32031-2012 [18], клинические изоляты выделяли в соответствии с Методическими указаниями по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) ме-

тодов исследования в клинико-диагностических лабораториях (Приложение 1 к Приказу Минздрава СССР № 535 от 22.04.1985).

Для получения препарата ДНК изолятов одну колонию микроорганизма переносили в 20 мкл лизирующего буфера, содержащего 0,25% SDS и 0,05 М NaOH, прогревали 15 мин. при 95°C и добавляли 180 мкл бидистиллированной воды. Полученный лизат хранили при температуре 4°C.

Праймеры, использованные для MLST, представлены в Таблице 3. В программе амплификации для локусов MLST: 95°C – 3 мин.; (95°C – 30 сек., T°C – 40 сек.,

Таблица 2. Характеристика изолятов *L. monocytogenes*, выделенных из продуктов питания

Изолят	Фило-генетическая линия	ST	ID MLST Database	IP	Дата выделения	Наименование продукта	Наименование продукции согласно [25]	Сокращение названия для рисунка	Город
GIMC2015:Lmc22	II	7	42984	15	14.05.2018	Мясо, охлажденное в тушах	1.1.1. Мясо убойных животных	мясо (M)	Самара
GIMC2017:Lmc921	II	9	42987	46	25.04.2018	Хинкали грузинские замороженные	1.1.3. Полуфабрикаты мясные	мясо (M)	Самара
GIMC2021:Lmc431	II	121	42992	48	12.02.2019	Оленина, котлетное мясо замороженное	1.1.3. Полуфабрикаты мясные	мясо (M)	Москва
GIMC2019:Lmc309	II	121	42990	48	15.02.2018	Полуфабрикат мясной мелкокусковой охлажденный	1.1.3. Полуфабрикаты мясные	мясо (M)	Самара
GIMC2018:Lmc2433	II	9	42988	46	07.11.2018	Жир-сырец говяжий	1.3. Жир-сырец говяжий	жир (Fat)	Самара
GIMC2025:Lmc82_19	II	7	42986	15	27.05.2019	Мясо птицы замороженное, цыплята	1.9.1. Мясо птицы	птица (P)	Самара
GIMC2016:Lmc547	II	7	42985	45	14.02.2019	Филе бедра цыпленка замороженное	1.9.2. Полуфабрикаты из мяса птицы	птица (P)	Москва
GIMC2001:Lmc156	II	504	42996	47	25.01.2018	Филе куриное по-шанхайски	1.11.9. Готовые быстрозамороженные блюда из мяса птицы	птица (P)	Самара
GIMC2003:Lmc171	II	31	42989	49	07.11.2018	Сельдь атлантическая филе	3.3.4. Рыба соленая, пряная	рыба (F)	Самара

Продолжение табл. 2

Изолят	Фило-генетическая линия	ST	ID MLST Database	IP	Дата выделения	Наименование продукта	Наименование продукции согласно [25]	Сокращение названия для рисунка	Город
GIMC2020:Lmc630	II	121	42991	48	20.02.2019	Форель радужная, филе, ломтики «Русское море»	3.3.3. Рыба разделанная малосоленая	рыба (F)	Москва
GIMC2022:Lmc2052	II	121	42993	48	16.04.2019	Форель, филе, кусочек с кожей, слабосоленая, охлажденная «Меридиан»	3.3.3. Рыба разделанная малосоленая	рыба (F)	Москва
GIMC2024:Lmc2689	II	155	42994	50	29.04.2019	Семга соленая, ломтики в вакуумной упаковке, «Пеликан»	3.3.3. Рыба разделанная малосоленая	рыба (F)	Москва
GIMC2004:Lmc76_19	I	288	42995	51	20.05.2019	Молоко пастеризованное	2.2.1. Питьевое молоко пастеризованное	молоко (Milk)	Самара
GIMC2026:LmcBD14	II	37	42997	28	29.07.2019	Моечная раковина, ресторан		мойка (Sink)	Москва
GIMC2027:LmcBD15	II	37	42998	28	29.07.2019	Моечный слив раковины, ресторан		слив (Sink)	Москва

72°C – 1 мин.) × 35; 72°C – 5 мин.; 4°C – хранение, в зависимости от мишени изменяли только температуру отжига (T°C), значения которой внесены в Таблицу 3.

Локусы вирулентности включали 4 гена интерналинов (InI), предложенных для анализа Adgamon R и соавт. [20]. Последовательность *InIA*, *InIB*, *InIC*, *InIE* формирует профиль генов интерналинов (IP). Праймеры, использованные для амплификации локусов *MvLST*, а также значения температуры отжига представлены в Таблице 3.

Секвенирование продуктов амплификации проводили согласно протоколу к набору BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing kit на геномном анализаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems/Hitachi, США). Электрофоретическое разделение продуктов реакции выполняли в капиллярах длиной 50 см с использованием полимера POP7.

Анализ аллелей MLST и аллельных профилей проводили с помощью ресурсов сайта Institut Pasteur MLST and whole genome MLST (<https://bigbdb.pasteur.fr/listeria/>)

Таблица 3. Праймеры для амплификации локусов MLST и *MvLST*

№	Локус	Название праймера	Последовательность праймера	T° отжига	Авторы
1	abcZ	abcZF abcZR	TCGCTGCTGCCACTTTTATCCA TCAAGGTCGCCGTTTAGAG	55	[26]
2	bglA	bglA38F bglA591R	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAGCCGACTTTTTATGGGGTGGAG TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGATTAATACGGTGCGGACATA	65	[27]
3	cat	catF catR	ATTGGCGCATTTTGATAGAGA AGATTGACGATTCCTGCTTTG	55	[26]
4	dap	dapEF dapER	CGACTAATGGGCATGAAGAACAAG ATCGAACTATGGGCATTTTACC	59	[26]
5	dat	datF datR	GAAAGAGAAGATGCCACAGTTGA TGCGTCCATAATACACCATCTTT	55	[26]
6	ldh	ldhF ldhR	GTATGATTGACATAGATAAAGA TATAAATGTCGTTCCATACCAT	50	[21]
7	lhkA	lhkA_F2 lhkA_R2	TGAACACGTATCAGCGAATT TGAGGCCACTAATCGTTGT	58	Данное исследование
8	Секвенирование	PrSeqF PrSeqR	GTTTTCCAGTCACGACGTTGT TTGTGAGCGGATAACAATTC		[27]

№	Локус	Название праймера	Последовательность праймера	T° отжига	Авторы
9	InIA	InIAF	TAACGGGACAAATGCTCAGGC	63	[20]
		InIAR	TGTTAAACTCGCCAATGTGCC		
10	InIB	InIB-146F	CAGATGATGCTTTTGACAGAA	54	[24]
		InIB-1229R	GCATTCGCGCAATATATTT		
		InIB590F	AAATTAGTGATATTGTGCCAC		
		InIB-610R	GTGGCACAATATCACTAATTT		
11	InIC	InICF	TTCCAGATCCCGGCCTAGC	63	[20]
		InICR	ATAGCCTCAGTCTCCCAACG		
12	InIE	InIEF	AAGCGGATGTAACAGACGAAG	55	[24]
		InIER	GATAAAATACGGGTTGGTTGG		

[6]. Проанализированные изоляты депонировали в базе данных сайта: ID 42973-42998 (Таблицы 1 и 2).

Аллели MvLST определяли, используя в качестве эталона опубликованные последовательности [20, 24]. Новые варианты аллелей регистрировали в GenBank (InIA MN580484 – MN580486; InIB MN580487 – MN580488; InIC MN580489 – MN580492; InIE MN580493 – MN580496). IP определяли в соответствии с ранее опубликованными данными [20, 24].

Филогенетический анализ в программе MEGA 6.0 [28] выполняли для двух групп последовательностей: сцепленных последовательностей локусов MLST (2808 п.н.) и сцепленных последовательностей локусов IP (1176 п.н.). Для выравнивания использовали сервис MUSCLE [29]. Построение дендрограмм, отражающих филогенетическое родство ST/IP, проводили с помощью метода максимального правдоподобия (ML). Для оценки эволюционных различий по локусам MLST использовали модель Tamura – Nei [30], по IP локусам – модель General Time Reversible (GTR) [31]. Выбор модели основывался на результатах Modeltest и критерия Akaike [32]. Для оценки надежности филогенетического дерева проводили Bootstrap тест с числом реплик 1000.

Результаты

Характеристика клинических изолятов *L. monocytogenes*

В нашей выборке клинические изоляты были представлены 11 культурами *L. monocytogenes* (Таблица 1). Более половины из них (6) было связано со случаями перинатальной и неонатальной патологии: самопроизвольный аборт у беременной с листериозным сепсисом, преждевременные роды и рождение ребенка с пневмонией, неонатальный диссеминированный листериоз (3). Следующая по численности группа включала пациентов с менингитом (4). Один изолят был выделен от пациента с инфарктом миокарда. Последние два диагноза наблюдали у пациентов обоих полов старшей возрастной группы (59–80 лет).

Генотипирование изолятов показало, что 4 случая заболеваний были вызваны *L. monocytogenes* филогенетической линии I. Два пациента с неонатальным

листериозом и пациент с инфарктом миокарда были инфицированы *L. monocytogenes* ST6, пациент с менингитом – ST241. Как видно из Рисунка 1, эти генотипы относятся к разным ветвям дендрограммы в пределах клада филогенетической линии I (Bootstrap-показатель 87).

6 изолятов относились к филогенетической линии II: 2 выделены от пациентов с менингитом, 4 – при перинатальной и неонатальной патологии. 5 изолятов принадлежали ST7, 1 изолят – ST14. Указанные генотипы расположены в разных кладах филогенетической линии II (Bootstrap-показатель 99).

Таким образом, в группе клинических изолятов большинство (6) относилось к филогенетической линии II, ST7. Количество выявленных генотипов *L. monocytogenes* составило 4.

Характеристика изолятов из продуктов питания

Из 15 изолятов *L. monocytogenes* 8 были выделены из продукции мясного и молочного животноводства, 4 – из рыбной продукции, 2 – из среды приготовления пищи (Таблица 2). 8 культур получены из образцов продуктов в Самарской области, 5 – из продуктов в Москве.

В проанализированной выборке только 1 изолят *L. monocytogenes* относился к филогенетической линии I (ST288) и был выделен из пастеризованного молока. Из данных, представленных на Рисунке 1, следует, что этот генотип формирует отдельную (базальную) ветвь в кладе филогенетической линии I.

Остальные изоляты представляли филогенетическую линию II и относились к 7 генотипам. Наиболее часто встречались ST7 и ST121, дважды – ST9 и ST37, по одному разу – ST155, 288, 504. Изоляты ST7 и ST121 выделяли как в Москве, так и в Самаре. ST7 был характерен для изолятов из мяса и птицы, ST121 – из мяса и рыбы.

Сопоставление клинических изолятов и изолятов из пищевых продуктов с изолятами из окружающей среды

Проведенный анализ двух групп изолятов показал, что общим генотипом в обеих группах является только ST7. Следует отметить, что все изоляты были выделены из образцов, полученных в европейской части России. Клинические изоляты, за исключением одного, представляли Центральный федеральный округ (ЦФО), а

изоляты из пищевых продуктов были в равной степени представлены образцами ЦФО и Приволжского федерального округа (ПФО). Для поиска возможного источника *L. monocytogenes* в окружающей среде мы сопоставили полученные данные с ранее типированными изолятами из коллекции, собранной сотрудниками ФГБНУ ФИЦВиМ в ЦФО во время экологического мониторинга трех национальных парков и Ивановского водохранилища в 2006–2013 гг. [21, 24]. Таким образом, мы учли географические и временные параметры при сопоставлении данных.

На Рисунке 1 образцы из окружающей среды помечены знаком деревьев. Согласно рисунку, в кластерах ST7 и ST14 находятся как образцы из окружающей среды, так и из двух проанализированных групп. В группе клонального комплекса 7 (CC7) образцы из окружаю-

щей среды относились к двум генотипам: ST7 и ST111. Последний является SLV (вариант по одному локусу аллельного профиля), ST7 по локусу *ldh* и выделен из подстилки в зоне кормления животных заповедника, тогда как изоляты ST7 получены из фекалий оленей и кабанов.

В кластере ST14 в данной выборке был только один клинический образец, однако в окружающей среде этот генотип представлен широко и был обнаружен как у изолятов из речной рыбы, так и из фекалий кабана [21, 24].

Сопоставление полученных данных со сведениями по вспышкам пищевой листериозной инфекции

Поиск данных по вспышкам листериозной инфекции за последние годы также проводился преимущественно по странам Европы. Как видно из Рисунка 1, к кластеру CC7 относится вспышка 2019 г. в Великобритании, кото-

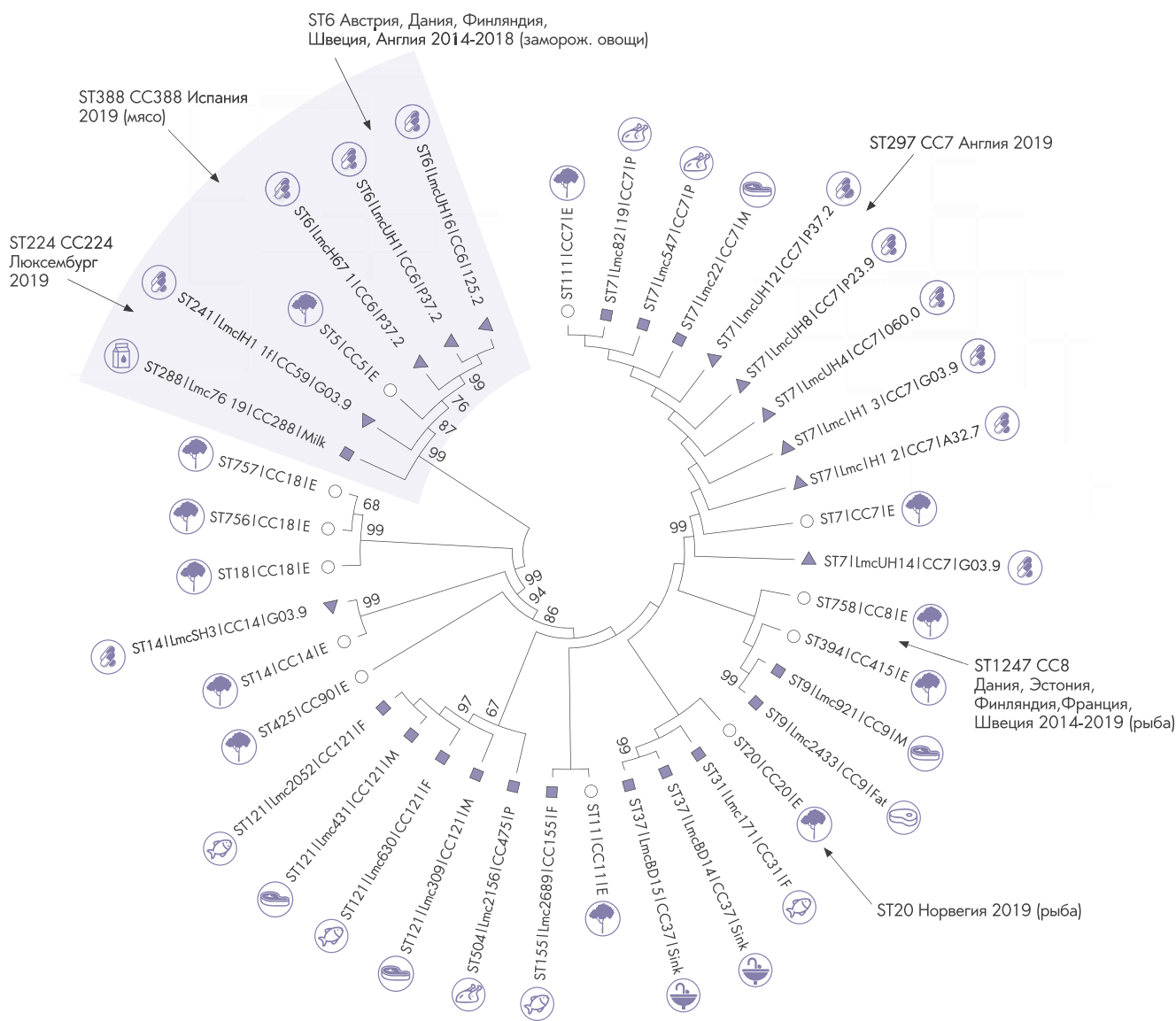


Рисунок 1. Филогенетическое древо сцепленных последовательностей фрагментов генов MLST (рамкой обведены профили изолятов филогенетической линии I)

рую вызвала *L. monocytogenes* ST297 (ID MLST database 39930-39932), SLV ST7 по локусу *bglA*.

В кластерах филогенетической линии II находятся еще две вспышки, связанные с рыбопродуктами: 1) 2014–2018 гг., затронувшая 5 стран и вызванная *L. monocytogenes* ST1247 (CC8) [9] и 2) 2019 г. в Норвегии, вызванная *L. monocytogenes* ST20 (ID MLST database 39834). На Рисунке 1 видно, что *L. monocytogenes* CC8 и ST20 обнаружены в окружающей среде при мониторинге природных объектов ЦФО.

К филогенетической линии I относятся *L. monocytogenes* трех европейских вспышек: 1) в 2015–2018 гг. в 5 странах Европы, причиной которой послужили *L. monocytogenes* ST6 в замороженных овощах [10]; 2) в 2019 г. в Люксембурге, вызванная *L. monocytogenes* ST224 (ID MLST database 39755-39757), и 3) в 2019 г. в Испании – *L. monocytogenes* ST388, охватившая 5 регионов страны [11, 12]. В нашем исследовании из перечисленных генотипов обнаружен только ST6 у трех клинических изолятов. Учитывая, что эпидемия *L. monocytogenes* ST6 затронула не только страны Европы, но и Южную Африку в 2017–2018 гг. [13, 14], перечень зараженных продуктов питания, а также широкую географию поставок, нельзя исключить завозные случаи листериоза, вызванного *L. monocytogenes* ST6 в нашей стране.

Генотип ST224 из вспышки в Люксембурге ближе всего генотипу *L. monocytogenes* ST241, выделенной у пациента с менингитом, но сходен только по трем локусам аллельного профиля. Генотип ST338, обнаруженный у возбудителя листериоза в Испании, также по трем локусам сходен с ST1, ранее преобладавшим наряду с ST2 в случаях листериозного менингита в Нидерландах, но, начиная с 2010 г., потесненным ST6 и другими ST [33]. Возвращаясь к ST338, стремительно распространившемуся по Испании в августе–сентябре 2019 г., следует отметить, что первый случай инфекции *L. monocytogenes* этого генотипа, зарегистрированный в MLST database (ID 4319), относится к 2002 г. (Канада). В настоящее время в MLST database содержится информация о 148 изолятах ST338, исключая пока не внесенную в базу испанскую вспышку.

Таким образом, мы проанализировали разнообразие *L. monocytogenes*, выделенных в текущем году. Как же изменился спектр генотипов бактерии за последнее время? Для ответа на этот вопрос мы рассмотрели все российские изоляты *L. monocytogenes*, депонированные в MLST database.

Анализ российских изолятов *L. monocytogenes*, представленных в MLST database

В базе данных Institut Pasteur MLST and whole genome MLST (<https://bigsd.b.pasteur.fr/listeria/>) представлено 152 российских изолята, в том числе депонированных нами. Исследования, начатые сотрудниками НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи и НИИЭМ им. Г.П. Сомова на дальневосточных штаммах *L. monocytogenes* [20], были продолжены в работах НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи с ФИЦВиМ на штаммах коллекции ФИЦВиМ XXI века [21, 24], также XX века [22]. Сотрудниками ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболенск, Россия) были исследо-

ваны клинические изоляты 2015–2017 гг., два изолята из окружающей среды 2018 г., а также изоляты из продуктов питания 2017 г. (один изолят 2018 г.) (ID 37675-37702; 40075-4079; 41055-41069; 41071; 41075, 41516; 41522-41526; 42264-42275). Информация о 5 изолятах 1948–1956 гг. (ID 4313, 4881, 5098, 5322, 5423) добавлена в 2011 г. Haase J. (Environmental Research Institute, Ирландия). Таким образом, данные нашего исследования дополнили базу данных сведениями о штаммах 2018–2019 гг.

Представленные изоляты были неравномерно распределены по трем группам (Таблица 4). Преобладали изоляты из окружающей среды, к которым отнесены и изоляты от сельскохозяйственных животных. Несколько меньше клинических изолятов от людей. Изоляты из продуктов питания начали генотипировать в России с 2017 г., поэтому их почти в 2 раза меньше, чем изолятов предыдущих групп. Следует отметить, что первый изолят из продуктов, полученный в 1948 г., был генотипирован Haase J. в 2011 г.

При оценке количества генотипов в каждой группе изолятов мы обратили внимание на более высокое разнообразие ST изолятов из продуктов (0,6 ST/изолят vs. 0,4 ST/изолят в двух других группах).

В группе клинических изолятов изоляты филогенетической линии II составляли 61%, по количеству лидировал ST7 (20%). Изоляты CC7 составили 24%. Поскольку изоляты, собранные в европейской части России, представляли 70% группы, мы провели расчет отдельно для этой подгруппы. В ней изоляты филогенетической линии II составили 76%, ST7 – 29%, CC7 – 34%.

В группе изолятов из окружающей среды изоляты филогенетической линии II составляли 67%, по количеству лидировал ST7 (23%). Изоляты CC7 составили 30%. В данной группе было 56% европейских изолятов, среди которых только один принадлежал филогенетической линии I, изоляты ST7 – 32%, CC7 – 44%.

В группе изолятов из пищевых продуктов доминировала филогенетическая линия II (92% изолятов), лидировал ST121 (24%), а ST7 занимал третье место по численности – 8%; CC7 – 11%.

Рассмотрим отдельно преобладающий в европейской части России CC7 (Таблица 5). В комплекс входит 9 генотипов, среди которых ST7 – абсолютный лидер, а оставшиеся 8 ST встречались однократно. Большинство генотипов отличаются от ST7 по одному локусу аллельного профиля – *ldh*, только ST126 дополнительно отличается по гену *lhcA*. Следует отметить, что в MLST database

Таблица 4. Российские изоляты в MLST database

Характеристики	Изоляты		
	клинические	из окружающей среды	из продуктов питания
Количество изолятов	54	60	38
Количество ST	21	24	21
Преобладающие ST	7 (20%); 1 (13%); 2 (13%); 6 (6%)	7 (23%); 315 (20%); 145 (10%)	121 (24%), 9 (13%); 7 (8%); 37 (8%)

Таблица 5. Разнообразие изолятов *CC7* на территории России

ST	abcZ	bglA	cat	dapE	dat	ldh	lhcA	клинические	из окружающей среды	из продуктов питания	MLST Database (4136)
7	5	8	5	7	6	2	1	11	14	3	1053 (25%)
12	5	8	5	7	6	22	1	1	0	0	44 (1%)
23	5	8	5	7	6	25	1	0	1	0	7 (0,2%)
85	5	8	5	7	6	38	1	0	1	0	7 (0,2%)
98	5	8	5	7	6	45	1	0	1	0	14 (0,34%)
106	5	8	5	7	6	50	1	0	1	0	2 (0,05%)
111	5	8	5	7	6	53	1	0	1	0	7 (0,2%)
126	5	8	5	7	6	65	15	0	0	1	2 (0,05%)
1539	5	8	5	7	6	398	1	1	0	0	1(0,02%)

из генотипов *CC7* также чаще всего встречается ST7. Изоляты этого генотипа составляют 25% от депонированных образцов.

Как давно изолируют *L. monocytogenes CC7* в нашей стране? Согласно MLST database, первый изолят из окружающей среды датируется 1947 г., из продуктов – 1948 г., клинический – 1960 г. (Таблица 6). Скорее всего, ST7 и представители *CC7* являются аутохтонными для территории России.

Анализ локусов вирулентности у изолятов выборки

С целью поверить степень гетерогенности изолятов одного генотипа (ST) по факторам вирулентности мы провели анализ локусов интерналинов, определив IP. Как видно из Таблицы 7, одинаковые IP15 имеют как клинические, так и большинство изолятов из пищевых продуктов с генотипом ST7. Такой IP у изолятов этого генотипа отмечали и ранее [20, 21, 24]. Однако у одного изолята ST7, выделенного из мяса птицы (GIMC2016:Lmc547, Таблица 2), был определен новый аллель *InIA* и новый IP45. Разные IP, также отличавшиеся аллелем *InIA*, ранее были обнаружены нами у изолятов ST14, выделенных из окружающей среды [21, 24].

Следует отметить, что аллель 11 (IP27), обнаруженная в нашем исследовании у клинического изолята GIMC2014:LmcSH3 (Таблица 1), у изолята из окружающей среды коррелировал с более высокой вирулентностью, проявлявшейся в опытах на мышах, чем у изолятов с аллелем 12 (IP36) [21, 24].

Таблица 6. Время выделения изолятов *CC7* на территории России

ST	Год выделения изолята		
	Клинические образцы	Окружающая среда	Продукты питания
7	1960	1952	2018
12	1975		
23		1965	
85		1965	
98		1955	
106		1947	
111		2008	
126			1948
1539	1971		

Для изолятов ST37, выделенных из среды приготовления пищи, мы определили IP28. Ранее для изолята ST37, выделенного из фекалий кабана, был определен такой же IP [20].

Для изолятов других генотипов определение IP было проведено впервые, поэтому аллельные профили 43–51 являются новыми.

Сопоставление филогенетического древа последовательностей IP (Рисунок 2) с древом последовательностей MLST (Рисунок 1) показывает, что кластеры генотипов совпадают с кластерами IP, подтверждая достоверность различий изолятов двух филогенетических линий, а также генетических групп внутри каждой филогенетической линии.

Заметим, что анализ всех известных IP российских изолятов *L. monocytogenes* показал различия между изолятами филогенетических линий I и II по разнообразию аллелей для каждого из четырех локусов IP. Разнообразие оценивали по отношению количества вы-

Таблица 7. Профили аллелей интерналинов

Источник изолятов	Филогенетическая линия	ST	<i>InIA</i>	<i>InIB</i>	<i>InIC</i>	<i>InIE</i>	IP
Клинические образцы	II	7	4	14	6	8	15
	II	14	11	14	11	11	27
	I	241	17	22	14	3	43
	I	6	16	1	4	13	44
Продукты питания	II	7	4	14	6	8	15
	II	37	9	11	7	8	28
	II	7	18	14	6	8	45
	II	9	7	13	18	9	46
	II	504	9	17	7	12	47
	II	121	9	17	7	2	48
	II	31	9	21	7	14	49
	II	155	10	14	19	2	50
	I	288	3	8	20	15	51

Полужирным шрифтом выделены новые аллели и IP.

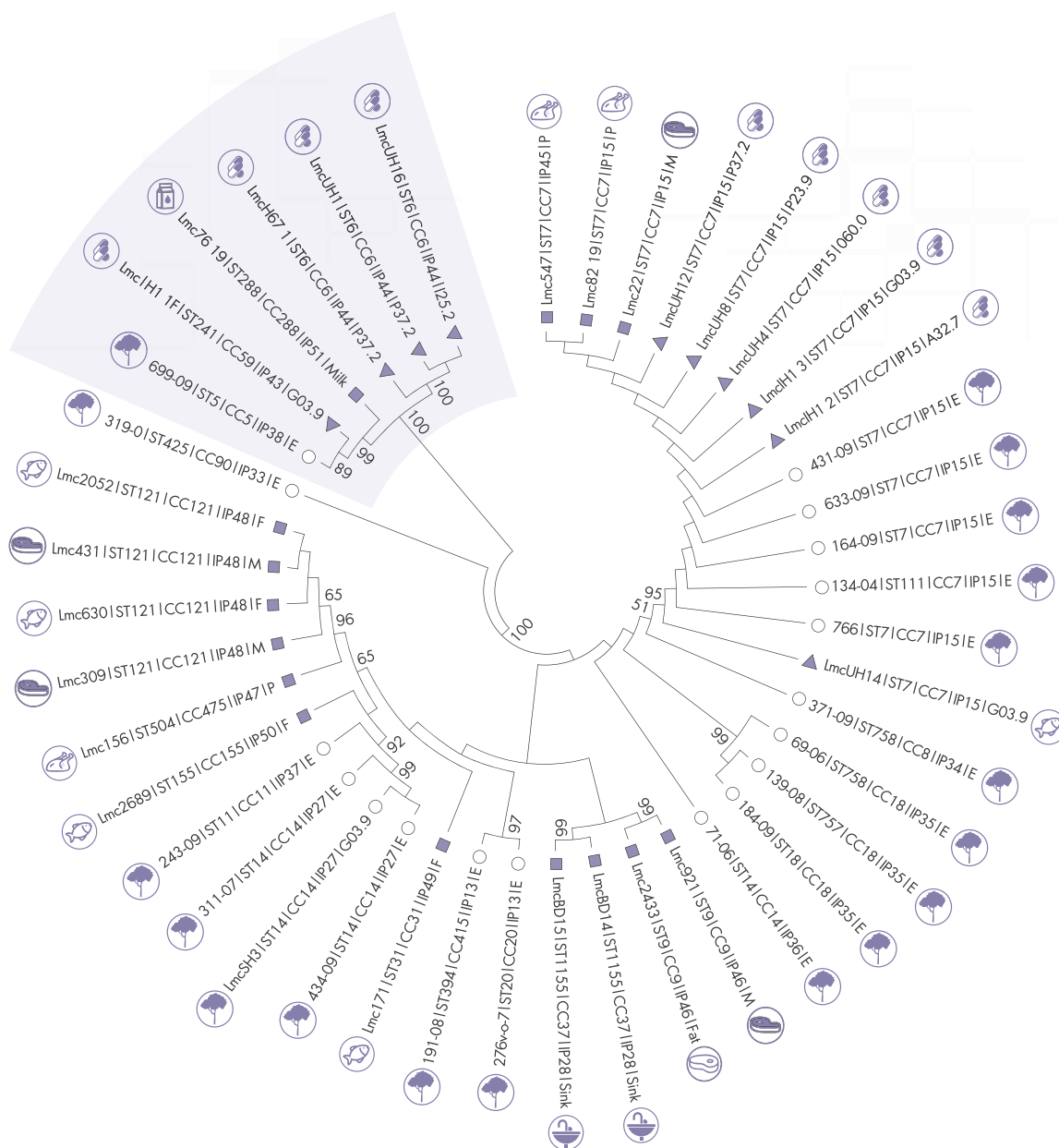


Рисунок 2. Филогенетическое древо сцепленных последовательностей локусов интерналинов (рамкой обведены профили изолятов филогенетической линии I)

явленных аллелей к количеству профилей, зарегистрированных для изолятов филогенетической линии. Для филогенетической линии II такой показатель был выше в 2 раза для локуса *InlA* (0,4 vs. 0,2) и на 13% для локуса *InlC* (0,4 vs. 0,3), а для филогенетической линии I превышение в 2 раза отмечено для локуса *InlB* (0,6 vs. 0,3). Разнообразие аллелей *InlE* (0,3) было одинаковым в филогенетических линиях. Существенное превышение аллельного разнообразия по локусу *InlB* для филогенетической линии I объясняется тем, что в 50% IP филогенетической линии II выявлен аллель 14. Широкая представленность аллеля *InlB14* сделала именно его объектом сравнительного исследования с *InlB9* филогенетической линии I в работе Chalenko Y. и соавт. [34].

Оценивая разнообразие аллелей фрагментов генов *Inl*, следует отметить, что больше всего аллелей (22) выявлено для *InlB*, 21 из которых имеет несинонимичные замены, т.е. для *InlB* подавляющему большинству обнаруженных нуклеотидных последовательностей соответствуют уникальные аминокислотные. У *InlC* и *InlE* половина аллелей имеет несинонимичные замены, тогда как у *InlA* количество уникальных аминокислотных последовательностей в 3 раза меньше выявленных аллелей. Построение филогенетических деревьев для аминокислотных последовательностей каждого из локусов *Inl* показало, что аллели *InlB* и *InlE* четко распределены между филогенетическими линиями (Bootstrap-показатель 99 и 100 соответственно), несколько ниже Bootstrap-

показатель (87) для *InlC*, тогда как для *InlA* ряд аллелей филогенетической линии II кластеризуется с аллелями филогенетической линии I, и только аллели 7–11 и 15 филогенетической линии II формируют отдельную группу (Bootstrap-показатель 88).

Возможно, выявленное различие аллелей *InlA* связано с особенностью фрагмента, выбранного для амплификации. Если для локусов *InlB*, *InlC*, *InlE* фрагмент, отвечающий возможностям секвенирования по Сэнгеру (700–800 п.н.), включал всю область богатых лейцином повторов (LRR), то для *InlA* только 9 из 15 повторов вошло в анализ [35].

Предложение локусов для экспресс-схемы идентификации изолятов *L. monocytogenes*

Представленные данные дают возможность выбрать локусы для экспресс-схемы идентификации, позволяющей, прежде всего, определить принадлежность изолята к филогенетической линии и СС. Для первоначальной идентификации достаточно трех локусов: *cat*, *dat* (MLST) и *InlE* (IP). Далее они могут быть дополнены наиболее вариабельными локусами для определенной филогенетической линии и СС. Такой подход позволит сэкономить время и ресурсы при расследовании вспышек.

Однако оптимальным для полной характеристики изолятов, ставших причиной листериоза, является полногеномное секвенирование с последующей сборкой геномов и оценкой cgMLST [6].

Заключение

Проведенное исследование показало, что большинство клинических изолятов *L. monocytogenes* 2018–2019 гг. выделяли при перинатальном и неонатальном листериозе. Изоляты филогенетической линии I встречались реже, чем изоляты филогенетической линии II. *L. monocytogenes* ST6, выявленная у трех пациентов, ско-

рее всего, является завозной, поскольку ни в окружающей среде, ни в продуктах питания на территории России листерии такого генотипа не обнаружено.

Среди клинических изолятов филогенетической линии II преобладала *L. monocytogenes* ST7, широко распространенная в окружающей среде и обнаруженная в продуктах питания в двух регионах.

Изоляты из продуктов питания отличались большим разнообразием выявленных генотипов преимущественно филогенетической линии II. Преобладали изоляты *L. monocytogenes* ST7. Большинство изолятов *L. monocytogenes* ST7 из продуктов питания были идентичны клиническим изолятам по IP, однако изолят из мяса птицы имел новый аллель *InlA* и новый IP45, что свидетельствует о большей изменчивости *L. monocytogenes*, размножающихся в продуктах.

Вторым по численности в нашей выборке изолятов из пищевых продуктов и первым среди всех изолятов из России, представленных в базе данных MLST, был ST121. Изменчивость пищевых штаммов этого генотипа была прослежена в международном исследовании 70 геномов одного из распространенных в Европе ST121. Все геномы показали 99,7% идентичность нуклеотидной последовательности. Различия между двумя российскими изолятами, вошедшими в анализ, заключались в следующем: в геноме изолята 2012 г. отсутствовал транспозон Tn6188 и стоп-кодон в гене *InlA*, в то время как изолят 2013 г. уже имел вставку мобильного элемента и транскрированный *InlA*, как и большинство пищевых и клинических изолятов выборки [36].

Таким образом, для эпидемиологического контроля пищевых продуктов и производств оптимальным является метод полногеномного секвенирования и сопоставления cgMLST выделенных культур *L. monocytogenes*. Для экспресс-диагностики *L. monocytogenes* при расследовании случаев инвазивного листериоза мы предлагаем амплификацию и секвенирование трех локусов: *cat*, *dat* (MLST) и *InlE* (IP).

Литература

1. WHO. Listeriosis. Available at: www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis.
2. Schlech W.F. 3rd, Lavigne P.M., Bortolussi R.A., Allen A.C., Haldane E.V., Wort A.J., et al. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. *N Engl J Med*. 1983;308(4):203-206. DOI: 10.1056/NEJM198301273080407
3. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1.
4. *Listeria monocytogenes* risk assessment. Appendix 8: Growth of *Listeria monocytogenes* in foods. FDA. Available at: <https://www.fda.gov/media/77930/download>.
5. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. CAC/GL 61 – 2007. Available at: www.fao.org/input/download/standards/10740/CXG_061e.pdf.
6. Moura A., Criscuolo A., Pouseele H., Maury M.M., Leclercq A., Tarr C., et al. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat Microbiol*. 2016;2:16185. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.185
7. Outbreak of *Listeria* Infections. Timeline of Reported Cases. Posted August 23, 2019. Available at: www.cdc.gov/listeria/outbreaks/monocytogenes-08-19/epi.html.
8. Public Health Notice – Outbreak of *Listeria* infections linked to Rosemount brand cooked diced chicken. October 2, 2019. Available at: www.canada.ca/en/public-health/services/public-health-notices/2019/outbreak-listeria-infections-cooked-diced-chicken.html.
9. Joint ECDC-EFSA rapid outbreak assessment: Multi-country

- outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6, infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables – first update. 3 July 2018. Available at: www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-multi-country-outbreak-listeria-monocytogenes-serogroup-ivb.
10. Rapid risk assessment: Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* PCR serogroup IVb, MLST ST6. 8 December 2017. Available at: www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-multi-country-outbreak-listeria-monocytogenes-pcr-serogroup.
 11. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Informe de fin de seguimiento del brote de listeriosis 27 de septiembre de 2019. Available at: www.msccs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeriosis/docs/Informe_cierre_listeriosis_20190927.pdf.
 12. WHO. Disease outbreak news. Listeriosis – Spain. 16 September 2019. Available at: www.who.int/csr/don/16-september-2019-listeriosis-spain/en/.
 13. WHO. Disease outbreak. Listeriosis – South Africa. 28 March 2018. Available at: www.afro.who.int/health-topics/listeriosis/outbreak/28-march-2018-south-africa/.
 14. Smith A.M., Tau N.P., Smouse S.L., Allam M., Ismail A., Ramalwa N.R., et al. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in South Africa, 2017-2018: Laboratory Activities and Experiences Associated with Whole-Genome Sequencing Analysis of Isolates. *Foodborne Pathog Dis.* 2019;16(7):524-530. DOI: 10.1089/fpd.2018.2586
 15. Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Primorsky Region. Dangerous disease listeriosis. Available at: http://25.rospotrebnadzor.ru/c/journal/view_article_content?groupId=10156&articleId=373855&version=1.0. Russian. (Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Приморскому краю. Опасное заболевание листериоз. Доступно по адресу: http://25.rospotrebnadzor.ru/c/journal/view_article_content?groupId=10156&articleId=373855&version=1.0.)
 16. Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. On the state of the sanitary-epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2017. State report. Available at: https://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=10145. Russian. (Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году. Государственный доклад. Доступно по адресу: https://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=10145.)
 17. Tartakovski I.S. Listeriae: the role in infectious diseases and laboratory diagnostics. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2000;2(2):20-30. Russian. (Тартаковский И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2000;2(2):20-30.)
 18. GOST 32031-2012 Food products. Methods for the detection of bacteria *Listeria monocytogenes* (as amended by ИУС N 6-2019). Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200105310>. Russian. (ГОСТ 32031-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* (с Поправкой ИУС N 6-2019). Доступно по адресу: <http://docs.cntd.ru/document/1200105310>.)
 19. Zaytseva E., Ermolaeva S., Somov G.P. Low genetic diversity and epidemiological significance of *Listeria monocytogenes* isolated from wild animals in the Far East of Russia. *Infect Genet Evol.* 2007;7(6):736-742. DOI: 10.1016/j.meegid.2007.07.006
 20. Adgamov R., Zaytseva E., Thiberge J.M., Brisse S., Ermolaeva S. Genetically related *Listeria monocytogenes* strains isolated from lethal human cases and wild animals. In: *Genetic Diversity in Microorganisms*, Caliskan M. ed., 2012. Chapter 9. ISBN: 978-953-51-0064-5.
 21. Voronina O.L., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., Semenov A.N., Kurnaeva M.A., et al. Regularities of the Ubiquitous Polyhostal Microorganisms Selection by the Example of Three Taxa. *Molekuljarnaja biologija.* 2015;49(3):430-441. Russian. (Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н. Аксенова Е.И., Семенов А.Н., Курнаева М.А. и соавт. Закономерности селекции полигостальных убиквитарных микроорганизмов на примере представителей трех таксонов. *Молекулярная биология.* 2015;49(3):430-441.) DOI: 10.7868/S0026898415030179
 22. Psareva E.K., Egorova I.Y., Liskova E.A., Razheva I.V., Gladkova N.A., Sokolova E.V., et al. Retrospective Study of *Listeria monocytogenes* isolated in the territory of inner Eurasia from 1947 to 1999. *Pathogens.* 2019;8(4). pii: E184. DOI: 10.3390/pathogens8040184
 23. Zaitseva E.A., Ermolaeva S.A., Somov G.P. Genes, encoding invasion factors in *Listeria monocytogenes* strains isolated in the European part and the far east of Russia. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii.* 2006;(4):42-45. Russian. (Зайцева Е.А., Ермолаева С.А., Сомов Г.П. Гены, кодирующие факторы инвазии у штаммов *Listeria monocytogenes*, изолированных в европейской части и Дальневосточном регионе России. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2006;(4):42-45.)
 24. Voronina O.L., Ryzhova N.N., Kunda M.S., Kurnaeva M.A., Semenov A.N., Aksenova E.I., et al. Diversity and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolated from environmental sources in the Russian Federation. *IJMER.* 2015;5(3):5-15.
 25. Unified sanitary and epidemiological and hygienic requirements for products (goods) subject to sanitary and epidemiological surveillance (control) (as amended on May 21, 2019). Available at <http://docs.cntd.ru/document/902249109>. Russian. (Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) (с изменениями на 21 мая 2019 г.). Доступно по адресу: <http://docs.cntd.ru/document/902249109>.)
 26. Salcedo C., Arreaza L., Alcalá B., de la Fuente L., Vázquez J.A. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *J Clin Microbiol.* 2003;41(2):757-762. DOI: 10.1128/jcm.41.2.757-762.2003
 27. Ragon M., Wirth T., Hollandt F., Lavenir R., Lecuit M., Le Monnier A., et al. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog.* 2008;4(9):e1000146. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000146
 28. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipi A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725-2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197
 29. Madeira F., Park Y.M., Lee J., Buso N., Gur T., Madhusoodanan N., et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W636-W641. DOI: 10.1093/nar/gkz268

30. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 1993;10(3):512-526. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023
31. Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* New York: Oxford University Press; 2000. 348 p. ISBN: 9780195135855.
32. Posada D., Crandall K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998;14(9):817-818. DOI: 10.1093/bioinformatics/14.9.817
33. Kremer P.H., Lees J.A., Koopmans M.M., Ferwerda B., Arends A.W., Feller M.M., et al. Benzalkonium tolerance genes and outcome in *Listeria monocytogenes* meningitis. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(4):265.e1-265.e7. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.12.008
34. Chalenko Y., Kalinin E., Marchenkov V., Sysolyatina E., Surin A., Sobyenin K., et al. Phylogenetically Defined Isoforms of *Listeria monocytogenes* Invasion Factor InlB Differently Activate Intracellular Signaling Pathways and Interact with the Receptor gC1q-R. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17). pii: E4138. DOI: 10.3390/ijms20174138
35. Bonazzi M., Lecuit M., Cossart P. *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from bench to bedside. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(4):a003087. DOI: 10.1101/cshperspect.a003087
36. Rychli K., Wagner E.M., Ciolacu L., Zaiser A., Tasara T., Wagner M., et al. Comparative genomics of human and non-human *Listeria monocytogenes* sequence type 121 strains. *PLoS One.* 2017;12(5):e0176857. DOI: 10.1371/journal.pone.0176857