

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla



**Ivana Zuber Bogdanović, master biolog, spec. inženjer
tehnologije**

**KONCEPT KONTROLE *Listeria*
monocytogenes U POGONU ZA PRERADU
MESA UZ UPOTREBU SEKVENCIRANJA
KOMPLETNOG GENOMA U CILJU
POSTIZANJA BEZBEDNOSTI HRANE**

-Doktorska disertacija-

Beograd, 2019. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
Department of food hygiene and technology



**Ivana Zuber Bogdanović, Master of biology, Specialist
engineer of technology**

**THE CONCEPT OF CONTROLLING
Listeria monocytogenes IN A MEAT
PROCESSING PLANT USING WHOLE
GENOME SEQUENCING TO ACHIEVE
FOOD SAFETY**

-Doctoral Dissertation-

Belgrade, 2019.

MENTORI

Dr Mirjana Dimitrijević, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Brankica Lakićević, viši naučni saradnik

Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Vlado Teodorović, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Dejan Krnjajić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Vesna Đorđević, naučni savetnik

Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

Datum odbrane: _____

Zahvalnost za korisne i stručne ideje za ovu doktorsku disertaciju dugujem svojim mentorkama. Profesorica dr Mirjana Dimitrijević je od prvog dana naše saradnje pružala nesebičnu pomoć i kroz profesionalan i savjestan odnos prema radu, posvetila mi vrijeme, strpljenje i podršku, na čemu sam joj iskreno zahvalna. Zahvaljujem se dr Brankici Lakićević na požrtvovanosti u organizaciji istraživačkog rada, na strpljenju, iskustvu i znanju koje mi je nesebično pružila. Čast je i uživanje bilo raditi sa njima. Zahvaljujem se takođe i profesoru dr Vladi Teodoroviću, profesoru dr Dejanu Krnjajiću i dr Vesni Dorđević na posvećenom vremenu i korisnim savjetima za izradu ove disertacije. Bezrezervnu pomoć tokom doktorskih studija sam imala od dr Nevene Grković, na čemu joj se iskreno zahvaljujem. Hvala svim divnim ljudima sa Katedre za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu. Veliko hvala iskazujem profesorici dr Aleksandri Martinović na prijateljskim savjetima, velikodušnoj pomoći, na ohrabrivanju i razumijevanju i svoj ljudskosti koja krasi naš odnos.

Posebnu zahvalnost za pomoć pri izradi ove doktorske disertacije dugujem cijelom kolektivu Specijalističke veterinarske laboratorije, koji svojim kolegijalnim i prijateljskim odnosom čine da se osjećam ponosnom što sam dio njih. Posebnu zahvalnost iskazujem Snežani Vučinić, na nesebičnom zalaganju i stručnim savjetima tokom cijelog procesa istraživanja i izrade ove disertacije. Hvala mr Zorici Pavićević, na svim profesionalnim i životnim savjetima. Mr Dejanu Lauševiću se zahvaljujem za razumijevanje i veliku podršku. Hvala Marku Simonoviću na beskrajnom strpljenju i angažovanju pri izradi disertacije. Hvala Biljani Vujisić na prijateljskoj podršci.

Snagu i volju za sve u životu dobijam od mojih najmilijih. Njima se beskrajno zahvaljujem. Mom Mirku na ljubavi i podršci, a Emi i Nori na tome što moj život čine čarobnim i svemu daju smisao.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Radmili i Draganu. Uz njihovu ljubav, pomoć i požrtvovanu podršku, sve postaje moguće i izvodljivo. Zato ovu disertaciju posvećujem njima, kao iskreni, ali nedostojan znak zahvalnosti za sve.

Ovo istraživanje je podržalo Ministarstvo za obrazovanje, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, prema istraživačkom projektu br. 31034, kao i Ministarstvo odbrane Republike Srbije, u okviru istraživačke donacije MFVMA / 1 / 17-19.

KONCEPT KONTROLE *Listeria monocytogenes* U POGONU ZA PRERADU MESA UZ UPOTREBU SEKVENCIRANJA KOMPLETNOG GENOMA U CILJU POSTIZANJA BEZBEDNOSTI HRANE

REZIME

L.monocytogenes, fakultativni intracelularni patogen, je široko rasprostranjena u različitoj svežoj i prerađenoj hrani. Ovaj patogen je uzročnik listerioze, retkog ali ozbiljnog oboljenja ljudi i životinja, izazvanog konzumacijom kontaminirane hrane. *L.monocytogenes* može da preživi i raste u širokom rasponu različitih uslova sredine u kojoj se nalazi, bilo da je ona prirodna ili sredina modifikovana aktivnošću čoveka. Usled sposobnosti da preživi i raste na niskim temperaturama, u sredinama sa visokom koncentracijom soli, smanjenom pH i niskim vrednostima aktivnosti vode, čest je stanovnik pogona za proizvodnju hrane. Zbog svoje sveprisutnosti u životnoj sredini, kontrola pojave *L.monocytogenes* u pogonima za proizvodnju hrane predstavlja ozbiljan izazov za sistem bezbednosti hrane. U cilju unapređenja sistema bezbednosti hrane, uporedo sa razvojem legislative i standarda, razvijaju se i nove metode i tehnike identifikacije mikroorganizama. Sekvenciranje kompletnog genoma (eng. Whole genome sequencing - WGS) predstavlja ultimativnu metodu za ispitivanje prisustva patogena i otkrivanje njihovog porekla u hrani.

Delikates proizvodi od mesa spremni za jelo, identifikovani su kao jedan od čestih izvora epidemija listerioze. Prisustvo *L.monocytogenes* u pogonu za proizvodnju tradicionalnih proizvoda od mesa u Crnoj Gori, ispitivano je tokom perioda od 2011. do 2014. godine. Za posmatrani period izolovano je 20 izolata *L.monocytogenes* iz proizvoda od mesa i pogona za njihovu proizvodnju koji su podvrgnuti molekularnoj karakterizaciji, serotipizaciji uz pomoć multipleks PCR-a i sekvencera nove generacije (eng. Next generation sequencing – NGS), utvrđivanju potencijalne antimikrobne rezistencije na osnovu NGS podataka o prisustvu secifičnih gena rezistencije i skriningu na prisustvo određenih markera rezistencije na dezinficijense. Tokom četvorogodišnjeg perioda praćenja prisustva *L.monocytogenes* u pogonu i njegovim proizvodima,

identifikovani su izolati iz četiri sekvenciona tipa (ST515, ST8, ST21, ST121). Svaki od sekvencionih tipova pripada različitim klonalnim kompleksima (CC1, CC8, CC21, CC121). Jedan od 20 izolata *L.monocytogenes* pripada serogrupi IVb (ST515, CC1), dok su svi ostali izolati iz IIa serogrupe. Izolati *L.monocytogenes* poreklom iz proizvodnog okruženja pripadaju isključivo ST21 i izolovani su iz briseva daske za sečenje i brisa poda. Genomi izolata *L.monocytogenes*, sekvencionog tipa ST 121, sadržali su transpozon Tn6188, odgovoran za rezistenciju na benzankolijum hlorid. Dodatno, geni antimikrobne rezistencije, *mprF* i *fosX* bili su prisutni kod izolata iz klonalnih kompleksa CC21 i CC121, dok su kompleksi CC8 i CC1 isključivo sadržali *mprF* gen antimikrobne rezistencije.

Ključne reči: *Listeria monocytogenes*, listerioza, hrana spremna za jelo (RTE), sekvenciranje kompletnog genoma (WGS), markeri antimikrobne rezistencije, biofilm

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Higijena i tehnologija mesa

UDK broj: 619:637.5:579.86

THE CONCEPT OF CONTROLLING *Listeria monocytogenes* IN A MEAT PROCESSING PLANT USING WHOLE GENOME SEQUENCING TO ACHIEVE FOOD SAFETY

SUMMARY

L. monocytogenes, facultative intracellular pathogen, can be found in different types of raw and processed foods. This pathogen causes listeriosis, a rare but severe disease in humans and animals, which is spread primarily through the consumption of contaminated food. *L. monocytogenes* can survive and grow in a wide spectrum of environmental conditions, whether natural or habitats created by the human activity. Due to its ability to survive low temperatures, higher sodium nitrate concentrations, low pH and water activity, *L. monocytogenes* can frequently be found in the food processing environment. The ubiquitous nature of *L. monocytogenes* poses a significant encounter to its control in the food production environment, representing a great challenge for food safety. With the aim of improvement of the efficiency of the food safety systems, in parallel to the development of legislation and standards, the new methods and techniques for identification of microorganisms have been devised. Whole genome sequencing (WGS) technique represents the ultimate method for pathogen detection and for determination of their origin in food products.

Ready-To-Eat (RTE) delicatessen meat products have repeatedly been identified as a source of listeriosis outbreaks. The presence of *Listeria monocytogenes* was evaluated in the meat processing facility in Montenegro in the period from 2011 to 2014. In total, 20 isolates of *L. monocytogenes*, isolated from traditional meat products and environmental swabs, were subjected to molecular characterization, serotyping by both multiplex PCR and next generation sequencing (NGS), testing to their potential antimicrobial resistance (AMR) by extraction of specific genes from NGS data and screening for the presence of some disinfectant resistance markers. Results of this four-year monitoring period of the facility environment and the products have showed that the selected isolates of *L. monocytogenes* belong to four distinct sequencing types (ST515, ST8, ST21, ST121). Each of the detected sequencing types belonged to

different clonal complexes (CC1, CC8, CC21, CC121). Out of 20 *L. monocytogenes* isolates, one belonged to serogroup IVb (ST515, CC1), while all other isolates were from serogroup IIa. The isolates origination from environmental swabs belonged exclusively to ST21 and were isolated from cutting board and floor swabs. In addition, results showed that Tn6188, a novel transposon conferring tolerance to BC, was specific to sequence type ST121. Furthermore, antimicrobial resistance genes *mprF* and *fosX* were present in clonal complexes CC21 and CC121, while complexes CC8 and CC1 exclusively harbored the *mprF* antimicrobial resistance gene.

Key words: *Listeria monocytogenes*, listeriosis, Ready to eat food (RTE), Whole genome sequencing (WGS), antimicrobial resistance markers, biofilm

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Meat Hygiene and Technology

UDC Number: 619:637.5:579.86

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERURE.....	3
2.1 Rod <i>Listeria</i> i vrsta <i>Listeria monocytogenes</i>	3
2.1.1 Istorijski pregled.....	3
2.1.2 Filogenija i taksonomija roda <i>Listeria</i>	4
2.1.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	6
2.1.4 Faktori virulencije i patogenosti <i>L.monocytogenes</i>	8
2.1.5 Epidemiološki podaci listerioze ljudi.....	10
2.2 <i>L.monocytogenes</i> u hrani i proizvodnim pogonima za hranu	12
2.2.1 Faktori koji utiču na rast i preživljavanje <i>L.monocytogenes</i> u hrani.....	16
2.2.2.1 Temperatura.....	17
2.2.2.2 Kiselost sredine.....	18
2.2.2.3 Aktivnost vode.....	20
2.2.2.4 Koncentracija soli (NaCl)	21
2.2.2.5 Pakovanje u modifikovanoj atmosferi	22
2.3 Sposobnost formiranja biofilmova.....	24
2.4 Otpornost <i>L.monocytogenes</i> na dejstvo kvaternarnih benzalkonijum hlorida.....	27
2.5 Osetljivost <i>L.monocytogenes</i> na antimikrobne lekove.....	30
2.6 Sekvenciranje celokupnog genoma.....	32
3. CILJEVI I ZADACI RADA.....	38
4. MATERIJAL I METODE	40
4.1 Prikupljanje uzoraka proizvoda i briseva iz proizvodnog pogona.....	40
4.2 Mikrobiološke metode.....	40
4.3 Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilmova.....	42
4.4 Vizuelizacija biofilma uz pomoć skenirajućeg elektronskog mikroskopa.....	43
4.5 Ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove.....	44
4.6 Ekstrakcija DNK	44
4.7 Sekvenciranje kompletnog genoma i analiza podataka.....	44
4.8 PCR-skrining na prisustvo markera za otpornost na dezinficijense: Tn6188 i brcABC.....	45
4.9. Statistička obrada rezultata.....	46

5. REZULTATI	47
5.1 Prikupljanje uzoraka	47
5.1 Izolacija i detekcija <i>L.monocytogenes</i>	47
5.3 Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma izolata <i>L.monocytogenes</i>	53
5.4 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	55
5.5. Ispitivanje osetljivosti na antibiotike izolata <i>L.monocytogenes</i>	55
5.6 Sekvenciranje kompletnog genoma izolata <i>L.monocytogenes</i>	56
5.7. Identifikacija gena rezistencije na antimikrobne lekove.....	59
5.8 PCR-skrining na prisustvo markera za otpornost na dezinficijense: Tn6188 i <i>brcABC</i>	61
6. DISKUSIJA	64
6.1 Prikupljanje izolata <i>L.monocytogenes</i>	64
6.2 Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma izolata <i>L.monocytogenes</i>	65
6.3 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	66
6.4 Ispitivanje osetljivosti na antibiotike izolata <i>L.monocytogenes</i>	67
6.5 Sekvenciranje kompletnog genoma izolata <i>L.monocytogenes</i>	68
6.6 Identifikacija gena rezistencije na antimikrobne lekove.....	711
6.7 PCR-skrining na prisustvo markera za otpornost na dezinficijense: Tn6188 i <i>brcABC</i>	73
7. ZAKLJUČCI	76
8. SPISAK LITERATURE.....	78

1. UVOD

Listeria monocytogenes, ubikvitarna bakterija rasprostranjena u životnoj sredini, uzročnik je listerioze ljudi. Listerioza ljudi nije tako često oboljenje, međutim uglavnom zahteva hospitalizaciju pacijenata, a nisu retki ni smrtni slučajevi. Smatra se da je hrana kontaminirana *L.monocytogenes* uzročnik najvećeg broja slučajeva listerioze ljudi, te je veoma važno obezbediti njenu višestepenu kontrolu u svim fazama proizvodnje, kao i praćenje uslova sredine proizvodnih pogona za hranu. Kontrola prisustva *L.monocytogenes* duž celog prehrambenog lanca, počev od primarne proizvodnje (životinje na farmama i njihova hrana), prerade (klanice, postrojenja za sečenje) i distribucije (maloprodaja i ugostiteljstvo), je neophodna u cilju postizanja mikrobiološke bezbednosti hrane. Kriterijumi bezbednosti hrane u celom lancu su definisani Regulativom Evropske komisije (Regulation (EC) No 2073/2005), koja je u celosti prenesena u legislativna akta zemalja članica, ali i zemalja koje su u procesu pridruživanja Evropskoj Uniji.

Među raznovrsnom hranom u kojoj *L.monocytogenes* uspešno preživljava i iz koje je bila izolovana, hrana spremna za konzumiranje (eng. Ready-to-eat; RTE) predstavlja najrizičniju kategoriju za oboljevanja ljudi. Uslovi u kojima se čuva ova vrsta hrane, pružaju *L.monocytogenes* sredinu u kojoj dominira u odnosu na kompetitivnu mezofilnu mikrofloru. U kategoriju hrane spremne za konzumiranje se ubrajaju i proizvodi od mesa, pripremljeni na tradicionalan način, dimljenjem i sušenjem. Ovi se proizvodi, zahvaljujući primenjenim tehnikama konzervisanja mesa, mogu dugo čuvati i u frižideru i van njega, a često ne podležu nikakvoj termičkoj obradi pre konzumacije, te predstavljaju veliku opasnost za konzumenta u pogledu izvora *L.monocytogenes*. Kontaminacija proizvoda se najčešće dešava tokom njegove proizvodnje, a poreklo *L.monocytogenes* u proizvodu može biti iz sirovina ili iz proizvodnog pogona. Zbog svojih karakteristika koje joj omogućavaju rast u dosta nepovoljnim uslovima, *L.monocytogenes* je čest stanovnik proizvodnih pogona. Sposobnost formiranja biofilmova sa drugim vrstama bakterija, čini je izuzetno otpornom na veliki broj dezinfekcionih i sanitacionih sredstava. Kada se toj činjenici dodaju i njene prirodne i stečene adaptacije na dejstva antimikrobnih supstanci, jasna je sve veća zabrinutost koja vlada kada je u pitanju prisustvo *L.monocytogenes* u hrani. S

tim u vezi, na evropskom i međunarodnom nivou su uspostavljene pravne regulative i standardi za praćenje i ispitivanje prisustva *L.monocytogenes* u celom lancu proizvodnje hrane. Sve veću primenu u oblasti bezbednosti hrane imaju savremene molekularne tehnike tipizacije mikroorganizama. Među njima, tehnika sekvenciranja kompletnog genoma (eng. Whole genome sequencing - WGS) se izdvojila kao superiorna metoda za karakterizaciju bakterija. Uz podatke o izgledu genoma, WGS pruža informacije o markerima virulence, determinantama rezistencije na antimikrobna sredstva, ali i o evoluciji bakterijskih vrsta. Upotreba ove tehnike u mesnoj industriji se ogleda u njenoj praktičnosti da definiše i odredi mesta ulaska i daljih puteva širenja *L.monocytogenes*. Pružajući informacije koje će olakšati razumevanje distribucije patogena duž lanca hrane i unaprediti efektivnost epidemioloških istraga, tehnika sekvenciranja kompletnog genoma će uveliko koristiti unapređenju upravljanja sistemom bezbednosti hrane i zaštiti javnog zdravlja.

2. PREGLED LITERURE

2.1 Rod *Listeria* i vrsta *Listeria monocytogenes*

2.1.1 Istorijski pregled

Listeria monocytogenes i listerioza nemaju dugu istoriju. Zvanično, ona počine 1924. godine kada je Murray sa kolegama publikovao studiju o praćenju iznenadnog uginuća mladih zečeva (Ryser and Marth, 2007). Primetili su da uzročnik bolesti nije ni jedan od, do tada opisanih organizama, te da je njegova istaknuta karakteristika stvaranje velikih mononuklearnih leukocitoza (Ryser and Marth, 2007). Kako su autori naveli u svojoj studiji, ne mogavši svoj novootkriveni mikroorganizam svrstati ni u jedan od opisanih rodova u tadašnjem izdanju Berdžijevog ključa za identifikaciju (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) iz 1925. godine, predložili su mu ime: „*Bacterium monocytogenes*“. Istraživajući pojavu neuobičajene smrti među džarbilima u blizini Johanenzburga, Pirie je 1927. godine otkrio novi mikroorganizam, koji je bio uzročnik bolesti tad nazvane: „bolest reke Tigar“. Nazvao ge je *Listerella hepatolytica* u čast Lorda Listera (Glaser et al., 2007). Naučnici su svoje izolate poslali u Nacionalnu kolekciju izolata Lister instituta u Londonu, gdje su, posebno iznenađeni sličnošću ova dva mikroorganizma, predložili ime *Listerella monocytogenes*. Kako je naziv *Listerella* prethodno bio već korišćen za opis dve različite i nesrodne vrste, Pirie je 1940. godine predložio naziv *Listeria* (Glaser et al., 2007). Do tad, pa čak i mnogo nakon tog datuma, različiti nazivi su korišćeni za imenovanje *L.monocytogenes* poput: *Corynebacterium parvulum* (Schultz et al., 1934), *Erysipelothrix monocytogenes* (Wilson and Miles, 1946), *Corynebacterium infantisepticum* (Poter, 1951, tokom prve zabeležene fetalne i neonatalne listerioze u Nemačkoj) (Ryser and Marth, 2007). Godine 1948., *L.monocytogenes* je pod tim imenom uvedena u šesto izdanje Bergey's Manual of Deterinative Bacteriology (Ryser and Marth, 2007).

Listeria monocytogenes se ne vezuje za velike epidemije izazvane hranom koje su obeležile istoriju, obzirom na to da je njeno otkriće skorašnje. Prva potvrđena dijagnoza kod ljudi, na osnovu retrospektivne identifikacije, bila je meningitis vojnika iz Prvog svetskog rata. Pre ovog slučaja, nije bilo potvrđenih slučajeva oboljenja.

Interesantno je to da istoričari dovode u vezu *L.monocytogenes* kao mogućeg uzročnika 17 neuspešnih trudnoća Britanske kraljice Ane (Ryser and Marth, 2007).

Iako je *L.monocytogenes* bila prepoznata kao ozbiljan patogen koji se prenosi hranom, značajnu ulogu dobija tek 80-ih godina prošlog veka, sa prvom dokumentovanom epidemijom listerioze (Bell and Kyriakides, 2009) koji se desio 1981. godine u Kanadi, gde je *L.monocytogenes* izolovana iz salate kupusa. Kasnije zabeleženi slučajevi listerioze dovođeni su u vezu sa kontaminiranim sirom, mesom, mlekom, piletinom i ribom (Thomas et al., 2012). Danas se *L.monocytogenes* smatra jednim od najvažnijih patogenih bakterija prenosivih hranom (Leclercq et al., 2014).

2.1.2 Filogenija i taksonomija roda *Listeria*

Odnos roda *Listeria* u odnosu na ostale bakterije bio je nejasan do 70-tih godina prošlog veka. Odsutan iz prva tri izdanja Berdžijevog ključa za determinaciju, u izdanju iz 1934.godine, rod *Listeria* je bio u okviru reda Kurthia, familije Corynebacteriaceae (Ryser and Marth, 2007). U narednim izdanjima ovog determinišućeg ključa, rod *Listeria* je menjao svoje pozicije u odnosu na ostale rodove bakterija sve do 1984. godine, kada je u Bergey's Manual of systematic Bacteriology klasifikovan, zajedno sa rodovima *Lactobacillus*, *Erysipolothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* i *Carryophanon* u sekciju „pravilnih, nesporulišućih, Gram-pozitivnih štapića“ (Sneath et al., 1986) u okviru Grupe 19. Filogenetska pozicija roda *Listeria* je određena na osnovu malog procentualnog udela G-C baza u celokupnom genomu (Allerberger, 2003). Guanin-citozinski sadržaj, ili G-C udeo, predstavlja udeo azotnih baza u DNK molekulu i obično se izražava u procentima (Madigan and Martinko, 2003). Rodovi Grupe 19 su štapići (različitih veličina, većinom kokoidni, pa do srednjih ili čak izduženih sa filamentima ili trihama) i karakteriše ih pravilan oblik sa malim pleomorfizmom. To su Gram pozitivne, nesporulišuće, retko pigmentisane, mezofilne i hemo-organotrofne bakterije, koje rastu na kompleksnim podlogama. Generalno, kao njihovo prirodno okruženje se navode biljke ili duge organske materije sklone truljenju (Holt et al., 1994). Sa razvojem numeričke taksonomije, hemotaksonomije, DNK/DNK hibridizacije i, naročito, rRNK i DNK sekvenciranja, filogenetska pozicija roda *Listeria* je jasnije

određena (Ryser and Marth, 2007). Prema sadašnjoj taksonomiji, rod *Listeria* je u bliskom srodstvu sa rodom *Brochothrix*; oba zauzimaju poziciju između rodova *Lactobacillus* i *Bacillus* i udaljeni su od rodova *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Kurthis*, *Gemella* i *Erysipelothrix* (Farber and Peterkin, 1991).

Prema nomenklaturi objavljenoj 2012. godine od strane Leibniz Institute DSMZ, Nemačka (Bacterial Nomenclature up-to-date, version Jun 2012), *L.monocytogenes* je svrstana u sledeće taksonomske kategorije:

Carstvo	Bacteria	(Cavalier-Smith, 2002)
Podcarstvo	Posibacteria	(Cavalier-Smith, 2002)
Razdeo	Firmicutes	(Gibbons and Murray, 1978)
Klasa	Bacilli	(Ludwig et al., 2010)
Red	Bacillales	(Prévot, 1953)
Familija	Listeriaceae	(Ludwig et al., 2010)
Rod	<i>Listeria</i>	(Pirie, 1940)
Vrsta	<i>Listeria monocytogenes</i>	(Murray et al., 1926; Pirie, 1940)

Mnogo godina nakon njegovog otkrića, rod *Listeria* je sadržao samo jednu vrstu i to *L.monocytogenes*. Imenovana na osnovu osobine da redukuje nitrate, *L.denitrificans* je dodata ovom rodu 1948. godine i od tad se postepeno, sa njihovom identifikacijom, rodu dodaju *L.grayi*, *L.murray*, *L.innocua*, *L.ivanovii* (Ryser and Marth, 2007) i sve ostale vrste, ukupno njih 17, koliko vrsta danas broji ovaj rod. Jedanaest vrsta ovog roda (*L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, *L. booriae*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis* i *L. cornellensis*) je otkriveno od 2009. godine (Orsi and Wiedmann, 2016). U taksonomiji je razgraničenje različitih vrsta određeno jasnim kriterijumima. Dok je tradicionalni model za granicu razdvajanja vrsta podrazumevao vrednosti DNK-DNK hibridizacije manje od 70%, u skorije vreme su kriterijumi zasnovani na sekvenciranju celokupnog genoma upotrebljeni u te svrhe. Na osnovu njih su razdvojene vrste otkrivene nakon 2009. godine. Međutim, dok su granice za razdvajanje izolata različitih vrsta jasno postavljene, to nije slučaj sa granicama na osnovu kojih se može odrediti pripadnost vrsta različitim rodovima (Qin et al., 2014). Prema fenotipskim i genotipskim

karakteristikama, vrste u okviru roda *Listeria* se dele u dve grupe, na osnovu njihovog odnosa prema *L.monocytogenes*, vrsti koja je prva otkrivena a koja, ujedno, ima i najveći značaj po javno zdravlje i ekonomiju (Orsi and Wiedmann, 2016). Prvu grupu čine, takozvane, listerije u užem smislu (*Listeria sensu strictu*), i predstavljaju usku monofiletsku grupu u okviru roda *Listeria* a sačinjavaju je: *L.monocytogenes*, *L.seeligeri*, *L.marthii*, *L.ivanovii*, *L.welshimeri* i *L.innocua*. Zajedničko za sve vrste ove grupe je: (i) sposobnost rasta na niskim temperaturama, (ii) pokretljivost (najviše do 30°C), (iii) pozitivna reakcija katalaza testa, (iv) nemogućnost redukcije nitrata u nitrite i (v) pozitivna reakcija Voges-Proskauer testa, koja ukazuje na sposobnost produkcije acetona fermentacijom glukoze u butandiolnom putu fermentacije. Takođe, sve vrste ove grupe karakteriše zajednička osobenost sadržaja G-C baza u iznosu od 34,6 – 41,6% ukupnog genoma (tj. 2,8 – 3,2 Mb), zatim, visoka sintetičnost genoma, odnosno osobina da je redosled gena u genomu strogo konzervativan između različitih vrsta (den Bakker et al., 2010). *Listeria sensu lato* (listrije u širem smislu) je grupa u okviru roda *Listria* koja obuhvata *L.grayi* i sve vrste roda *Listeria* koje su otkrivene posle 2009.godine. Sa izuzetkom *L.grayi*, novootkrivene vrste čekaju na sveobuhvatno razjašnjenje njihove distribucije. Fenotipske karakteristike na osnovu kojih se vrste svrstavaju u ovu grupu su: negativna reakcija Voges-Proskauer testa (za sve osim za *L.grayi*), nesposobnost rasta na temperaturama ispod 7 °C, sposobnost redukcije nitrata u nitrite, kao i odsustvo flagelarnih gena kod svih osim kod *L.grayi*, što implicira na nepokretljivost ovih vrsta (Orsi and Wiedmann, 2016). Reklasifikacija na osnovu fenotipskih i genotipskih karakteristika pomoći će u razjašnjavanju dileme da li rod *Listeria* sadrži samo vrste koje pripadaju grupi *Sensu strictu* ili u okviru njega egzistiraju sve *Sensu lato* listerije (Orsi and Wiedmann, 2016).

2.1.3 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je jedina vrsta iz roda *Listeria* koja je prepoznata kao ljudski patogen (Chlebicz and Śliżewska, 2018). U cilju otkrivanja zajedničkih izvora listerioza, vrši se dalja identifikacija *L.monocytogenes* ispod nivoa vrste, najčešće molekularno-genetičkim metodama i/ili serotipizacijom (Montville et al., 2012). Vrsta *L.monocytogenes* je podeljena na 13 serotipova (označenih sa: *1/2a*, *1/2b*, *1/2c*, *3a*, *3b*,

3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7) na osnovu antigenskih determinanti (Dhama et al., 2015) lociranih na površini ćelije, koje obuhvataju termostabilni somatski O antigen i termolabilni flagelarni antigen H (Chlebicz and Śliżewska, 2018). Na osnovu razlika u nukleotidnim sekvencama tri gena (*flaA*, *iap* i *hly*), uspostavljene su četiri (I, II, III i IV) evolutivne linije *L.monocytogenes*. U okviru svake od njih su klasifikovani pripadajući im serotipovi (Chlebicz and Śliżewska, 2018). Serotipovi *1/2b* i *4b*, najčešće povezani sa infekcijama ljudi, svrstani su u liniju I, koju karakteriše prisustvo listeriozina S, odsutnog kod svih ostalih linija. Liniju II čine serotip *1/2a* i drugi serotipovi koji nose nekoliko plazmida otpornih na teške metale (Dhama et al., 2015). Listerioza ljudi može biti izazvana infekcijom svih 13 serotipova, ali više od 90% svih humanih i animalnih slučajeva listerioze bilo je uzrokovano *1/2a*, *1/2b* i *4b* serotipovima. Serotipovi *1/2a* i *1/2b* su predominantno povezani sa gastrointestinalnim oboljenjima, dok je serotip *4b* uglavnom uzročnik listerioza sa manifestacijama poremećaja centralnog nervnog sistema, pobačajima i septikemijama (Schuchat et al., 1991).



Slika 1. *L.monocytogenes* (<https://healthunits.com/listeriosis/listeria-monocytogenes>)

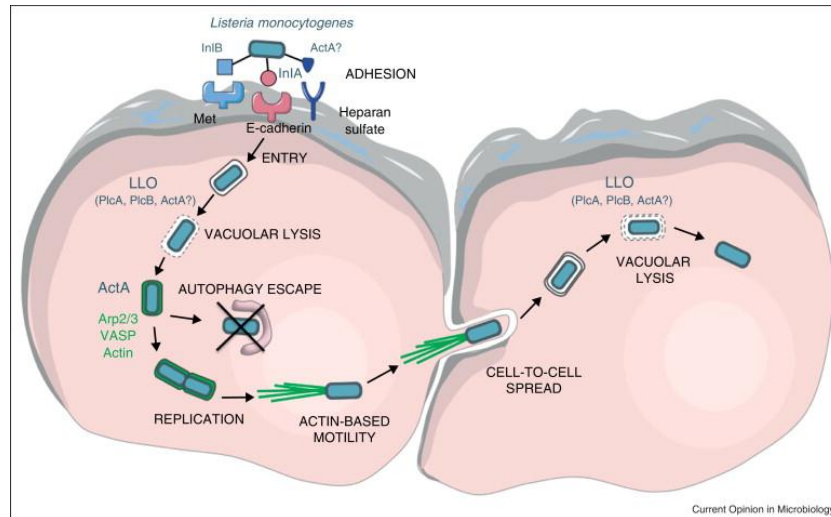
Listerioza je češće vezana za starije ljude i trudnice, kao i za individue sa oslabljenim imunim sistemom: pacijente sa transplatiranim organima, nosioce HIV virusa, obolele od kancera, novorođenčad i decu ispod 5 godina starosti. Infekcije ljudi izazvane *L.monocytogenes* se karakterišu dugim inkubacionim periodom, između jednog do 70 dana (prosečno 8 dana). Kod trudnica, primećeno je da inkubacioni period

može biti i duži. Tačna infektivna doza nije definisana, jer zavisi od stanja inficiranog organizma, kao i od virulentnog faktora različitih serotipova *L.monocytogenes* (Chlebicz and Śliżewska, 2018). Iako se listerioza dovodi u vezu sa osobama inkompromitovanog imunskog sistema, postoje dokumentovani izveštaji o bolestima zdravih, odraslih osoba bez prisustva drugih predisponirajućih faktora (Goulet et al., 1998).

2.1.4 Faktori virulencije i patogenosti *L.monocytogenes*

Listeria monocytogenes sadrži važne virulentne faktore poput: internalina, hemolizina (listeriolizina O), adhezivnih proteina (LAP), površinskog proteina ActA, dve fosfolipaze (PlcA i PlcB) i sekretornih sistema neophodnih za adheziju, intracelularnu multiplikaciju i patogenost (Dhama et al., 2015). Geni koji kodiraju većinu ovih virulentnih faktora su dobro organizovani u klasteru gena, tzv. *Listeria* patogenom ostrvu (LPI-1), lociranom na hromozomskom genomu bakterije (Sophia Kathariou, 2002). Za ovaj klaster se još vezuje i naziv PrfA-zavisan klaster, jer ekspresija svih gena unutar njega je primarno regulisana PrfA proteinom (Tompkin, 2002). Klaster virulentnih gena ima dužinu od 9kb i nalazi se kod obe patogene vrste roda *Listeria*: *L.monocytogenes* i *L.ivanovii* (Schmid et al., 2005). *L. monocytogenes* ima sposobnost prolaska crevne barijere, krvno-moždane barijere, kao i fetoplacentarne barijere. U procesu invazije na ćelije domaćina, listerija koristi različite faze napada što uključuje adheziju, invaziju, lizu vakuola, umnožavanje, izbegavanje mehanizama odbrane ćelije domaćina, kao i širenje sa ćelije na ćeliju (Tompkin, 2002). U početnoj fazi adhezije su uključeni različiti površinski proteini bakterije kao i njihovi receptori na ćeliji domaćinu. Bakterijski proteini kao: *Lap*, *Ami*, *FbpA*, *DltA*, *LapB*, *InlJ*, *ActA*, *InlF* i *RecA* su ključni za adheziju listerije na ćeliji domaćina. Svi ovi proteini variraju u svojim receptorima i odgovarajućim funkcijama, zavisno od vrste ćelija domaćina. Listerija može da napadne i fagocitne i nefagocitne ćelije. U slučaju fagocitnih ćelija, kao što su makrofagi, ulazak bakterija je posredovan fagocitozom, dok je u nefagocitnim ćelijama ulazak posredovan invazivnim proteinima (Dhama et al., 2015). Internalini *L.monocytogenes* su najvažniji proteini za adheziju i invaziju ćelija

domaćina. Usidreni u ćelijskom zidu ili kovalentno vezani za peptidoglikan, vezuju se za svoje receptore na ćeliji domaćina. Najznačajniji među internalinima su internalin A (*InIA*), koji se vezuje za svoj receptor E-kadherin i internalin B (*InIB*), vezan za receptor c-Met (Dhama et al., 2015). Tako vezani za receptore na membrani, vrše reorganizaciju citoskeleta i ulazak u ćelije domaćina, kao i njihovo naseljavanje. Takođe, ovi proteini imaju ulogu i u produkciji biofilmova. Kodirani su operonom *inIAB* lokalizovanim na bakterijskom hromozomu (Chlebicz and Ślizewska, 2018). Nakon infekcije ćelije domaćina, bakterija se ugrađuje u vakuolu. Listeriolizin O (LLO) je toksin kodiran *hly* genom, koji se nalazi na patogenom ostrvu genoma listerije označenom kao LPI-1. Vezuje se za molekule holesterola na membrani i oligomerizacijom formira otvore omogućavajući *L.monocytogenes* da izađe iz vakuole. U citostolu utiče na signalne puteve modulirajući tok infekcije (Sophia Kathariou, 2002), što, između ostalog, postiže i regulacijom ulaska Ca^{2+} jona u ćeliju domaćina. LLO je ključni faktor odgovoran za degradaciju vakuole (Dhama et al., 2015). Pored svog bitnog uticaja u degradaciji vakuole, LLO ima važnu ulogu u ometanju (uništavanju) imunskog sistema domaćina kroz defosforilaciju H3 i deacetilaciju H4 histona ćelije domaćina (Dhama et al., 2015). Podršku efekata listeriozina O svojom aktivnošću daju fosfolipaze C (*PlcA* i *PlcB*). Kodirane genima *plcA* i *plcB*, lociranim na genomskom patogenom ostrvu LPI-1, utiču na izlazak *L.monocytogenes* iz ćelije domaćina i prelazak u susedne ćelije (Chlebicz and Ślizewska, 2018). Širenje bakterije iz jedne u drugu ćeliju je omogućeno tvorevinom od aktinskih filamenata, koja nalikuju repu komete (Slika 2.). U njeno stvaranje je uključen *ActA* protein (Dhama et al., 2015). Površinski proteini *ActA* su produkti ekspresije gena *actA*, lociranog na LPI-1 klasteru hromozomskih gena. *ActA* proteini aktiviraju proces polimerizacije aktina, koji se nalazi oko bakterijske ćelije, formirajući aktinski vrat (most) kojim *L.monocytogenes* prelazi i ulazi u drugu, susednu ćeliju. Pored invazije na okolne ćelije, ovi proteini promovišu agregaciju i formiranje biofilmova (Chlebicz and Ślizewska, 2018). Produkt ekspresije još jednog od gena lociranih na patogenom ostrvcetu hromozomskog genoma bakterije je i protein *OrfX*, koji doprinosi oksidaciji makrofaga i na taj način pospešuje razvoj infekcije (Chlebicz and Ślizewska, 2018).



Slika 2. Invazija *L.monocytogenes* na ćeliju domaćina i njeno širenje na susedne ćelije (Travier, L. and Lecuit, M., 2014.).

2.1.5 Epidemiološki podaci listerioze ljudi

Prvi navodi o epidemiji listerioze datiraju iz 1983. godine, a odnose se na prvu evidentiranu epidemiju, koja se desila 1981. godine u Kanadi (Bell and Kyriakides, 2009), uzrokovana *L.monocytogenes* iz salate. Kasnije su prijavljivani mnogi slučajevi listerioze, kod kojih su kao izvor infekcije bili identifikovani različiti proizvodi od mleka, mesa, ribe, voća i povrća. Tako je u Filadelfiji bila prijavljena epidemija listerioze u periodu od decembra 1986. godine do marta 1987. godine. Podaci iz anamneze su pokazali da su pacijenti konzumirali sladoled i salamu, kupljenu u istom lancu maloprodajnih objekata (Schwartz et al., 1989). Od tada je počelo učestalije prijavljivanje kako sporadičnih slučajeva, tako i epidemija listerioze. Delikates proizvodi od svinjskog mesa su bili uzročnici nekoliko epidemija listerioze u Evropi tokom proteklih nekoliko decenija (Hellström et al., 2010). Istraživanjem epidemija u periodu 90-tih godina prošlog veka, u većini slučajeva identifikovana je *L.monocytogenes* serotipa *4b* kao uzročnik. Jedna od epidemija koju je izazvao ovaj serotip bila je prijavljena u SAD tokom 1998. i 1999. godine, povezana sa konzumacijom viršli (Kathariou, 2002). Međutim, 2008. godine je u SAD prijavljena epidemija sa više različitih geografskih lokacija, pripisana pšeničnim klicama, koje su bile kontaminirane sojem *L.monocytogenes* serotipa *1/2a*. Dvadeset slučajeva listerioze

je tokom ove epidemije bilo potvrđeno, od kojih je njih 16 bilo hospitalizovano. Od ukupnog broja obolelih, 20% njih su činile trudnice. Tokom trajanja ove epidemije nije bilo smrtnih slučajeva niti pobačaja (Garner and Kathariou, 2016). Nasuprot ovoj, u leto 2011. godine prijavljena su 147 slučajeva listerioze u 28 zemalja SAD. Uzročnik je bila dinja sa jedne farme u Koloradu. Ova epidemija je okarakterisana kao jedna od najvećih poslednjih decenija u Sjedinjenim Državama, koja je izazvana patogenima prenosivih hranom. Tom epitetu su doprinela 33 smrtna slučaja i jedan gubitak fetusa (McCollum et al., 2013). U Makedoniji je 2014. godine zabeleženo sedam slučajeva listerioze kod ljudi, a uzročnik pojave ovog oboljenja je bila domaća kobasica od svinjskog mesa. *L.monocytogenes* je uzrokovala pojavu meningitisa kod pet pacijenata, dok je kod preostala dva pacijenta dijagnostifikovana listeriozna sepsa. Od prijavljenih sedam slučajeva, tri su se okončala smrtnim ishodom (MCID, 2014). Među poslednjim epidemijama listerioze u svetu je i ona zabeležena tokom 2017. i 2018. godine u Južnoafričkoj Republici, ujedno i jedna od većih epidemija u skorije vreme, sa preko 1000 laboratorijski potvrđenih slučajeva i više od 200 smrtnih slučajeva (NICD, 2019). U istraživanjima vođenim tokom ove epidemije, sekvenciranjem kompletnog genoma izolata, uzročnik listerioze je identifikovan u barenoj kobasici od svinjskog mesa, čija je konzumacija dovela do oboljenja kod ljudi. Takođe, upotrebom metode sekvenciranja kompletnog genoma, identifikovan je i proizvodni pogon u kom su bili proizvedeni kontaminirani proizvodi od mesa (Desai et al., 2019).

U većini evropskih zemalja prijava slučajeva listerioze je obavezna. Stopa prijavljivanja listerioze ljudi izazvane kontaminiranom hranom dodatno se povećala tokom 2017. godine, uprkos tome što je nalaz *L. monocytogenes* u gotovoj hrani spremnoj za konzumiranje retko prelazio limitirane granice za bezbednost hrane, propisane u Evropskoj Uniji. Prema podacima EFSA-e (European Food Safety Authority), tokom 2017. godine, u 28 zemalja Evropske unije su prijavljena 2480 slučajeva listerioze ljudi, od kojih su se njih 227 završila smrtnim ishodom. Pokazan je statistički značajan trend rasta potvrđenih slučajeva listerioze u zemljama EU tokom posmatranog perioda od 2008. do 2017. godine (EFSA and ECDC, 2018). Procenjuje se da je 99% slučajeva listerioze ljudi povezano sa kontaminacijom hranom, iako dug inkubacioni period otežava identifikaciju izvora infekcije. Stopa prijavljivanja listerioze ljudi izazvane kontaminiranom hranom dodatno se povećala tokom 2017. godine,

uprkos tome što je nalaz *L. monocytogenes* u gotovoj hrani spremnoj za konzumiranje retko prelazio limitirane granice za bezbednost hrane, propisane u Evropskoj Uniji. Uzimajući u obzir podatke o stopi javljanja u RTE proizvodima, dobijenih od 26 zemalja članica EU, u 2017. godini *L.monocytogenes* je u mesu i proizvodima od mesa detektovana sa stopom od 1,8% (EFSA and ECDC, 2018).

Dostupnost i upotreba javno objavljenih podataka, koji dokumentuju trendove epidemiologije *L.monocytogenes*, može značajno doprineti poboljšanju bezbednosti hrane (Desai et al., 2019). Stoga je jasna opravdanost uspostavljanja javno dostupnih platformi sa sveobuhvatnim podacima o izbijanju bolesti izazvanih hranom. Jedan od takvih nadzornih sistema je i Program za nadgledanje izbijanja bolesti (ProMED; The Program for Monitoring Emerging Diseases). Zasnovan na principu neformalnog nadzora bolesti, prikupljajući i šireći podatke o izbijanju različitih bolesti, ovaj neformalni sistem za nadzor pruža mogućnost shvatanja epidemioloških trendova. Osnovan 1994. godine, ProMED redovno izveštava iz 35 zemalja o izbijanjima bolesti i epidemija, posebno kada su one većih razmera nego uobičajeno (Desai et al., 2019). U isto vreme, globalna mreža PulseNet International radi na standardizaciji šema multilokusnih sekvenci *L.monocytogenes*, dobijenih WGS metodom, a sve sa ciljem obezbeđivanja uslova za poređenje podataka na međunarodnom nivou (Nadon et al., 2017).

2.2 *L.monocytogenes* u hrani i proizvodnim pogonima za hranu

L.monocytogenes je sveprisutna bakterija u životnoj sredini (Thomas et al., 2012). Izolovana je iz zemljišta, površinskih i otpadnih voda, poljoprivrednog zemljišta, silaže, sa biljaka, iz pogona za proizvodnju hrane i hrane za životinje (Chlebicz and Śliżewska, 2018). Veliki broj različitih životinjskih vrsta može biti inficiran *L.monocytogenes*, uključujući sisare, ptice, ribe i ljuskare. Ipak, najveći broj klinički evidentiranih listerioza se odnosi na preživare; kod svinja se retko razvija bolest dok su ptice, generalno, subklinički nosioci ovog patogena. Većina infekcija kod životinja su subkliničke, a bolesti mogu da se jave sporadično ili u epidemijama. Procenjuje se da je listerioza životinja pretežno povezana sa uskladištenom stočnom hranom i sa njihovom životnom sredinom. Silaža je najčešći izvor zaraze (Leclercq, 2015).

L.monocytogenes je čest kontaminant pogona za proizvodnju hrane iz kojih je izolovana sa opreme, radnih površina, okoline, sirovine i finalnih proizvoda (Gandhi, M. and Chikindas, M.L., 2007). Ustanovljena je u različitim pogonima za proizvodnju hrane, uključujući mlekare, klanice, kao i pogone za proizvodnju hrane spremne za konzumiranje (RTE) (Tompkin, 2002). Oprema sa koje je izolovana *L.monocytogenes* je, takođe, brojna i raznovrsna, počev od kontejnera, bazena za prihvatanje namirnica, mašina za hlađenje i smrzavanje, pa do mašina za rezanje, sečenje, filtriranje i pakovanje. Posebno su rizični u pogledu kontaminacije i perzistencije *L.monocytogenes*, delovi opreme koji su skriveni i teško dostupni za čišćenje i dezinfekciju, te kao takvi predstavljaju njen stalni izvor u pogonu (Dimitrijević et al., 2008). Poznato je da kada jednom *L.monocytogenes* kontaminira proizvodni pogon, u njemu može da opstane dugi vremenski period, posebno ako je temperatura niska i ako je organizam zaštićen i snadbeven organskim materijama iz hrane (Gómez et al., 2015). U cilju unapređenja kontrole i praćenja *L.monocytogenes* u hrani, neophodno je povećati istraživanja i prikupljanje podataka koji se tiču njene ekologije i perzistencije u celokupnom lancu hrane, počev od farmi, preko magacina i hladnjača, maloprodaje pa sve do komercijalnih kuhinja i onih u domaćinstvima. U brojnim studijama na ovu temu, najveći značaj se pridaje proizvodnom okruženju kao glavnom izvoru *L.monocytogenes* u lancu hrane. U lancu hrane, farme za uzgoj stoke su evidentirane kao mesto gde se *L.monocytogenes* može često detektovati, usled kontaminacija silaže ovom patogenom bakterijom. *L.monocytogenes* je izolovana iz sredine najnižih nivoa primarne proizvodnje hrane, uključujući biljke, seno i povrće koji se koriste za ishranu stoke (Ferreira et al., 2014).

Životna sredina nije često bila predmet proučavanja sa aspekta perzistencije *L.monocytogenes*. Nekoliko postojećih studija na ovu temu ukazuju da je *L.monocytogenes* izolovana iz zemljišta i voda. Pokazano je da izolati iz zemljišta mogu da opstanu u njemu i do 730 dana, a u vodi čak i do 928 dana (Sauders and Wiedmann, 2007). Postoje podaci da su serotipovi povezani sa listeriozama ljudi izolovani iz uzoraka životne sredine, što ukazuje na opasnost da su izvori iz životne sredine primarni izvori kontaminacije hrane i sredine za proizvodnju hrane (Ferreira et al., 2014).

Najveći broj slučajeva listerioze kod ljudi povezan je sa kontaminiranom hranom. Patogeni sojevi *L.monocytogenes* su često izolovani iz različitih vrsta mesa i

proizvoda od mesa (govedina, ćuretina, svinjetina, kuvana šunka, viršle), mleka i mlečnih proizvoda (nezreli i zreli sirevi, maslac, fermentisani mlečni proizvodi od pasterizovanog i nepasterizovanog mleka), ribe i proizvoda od ribe, sladoleda, povrća, voća i žita (Shoukat S. et al., 2017). Iskustvo u istraživanju izvora infekcije ukazuje na to da je unakrsna kontaminacija primarni izvor *L.monocytogenes* u najvećem delu komercijalno pripremljene hrane spremne za konzumiranje (RTE) (Ferreira et al., 2014). Zbog eventualno mogućih slabih mera kontrole kvaliteta procesa proizvodnje i pakovanja, kontaminacija *L.monocytogenes* je izvesna. Hrana spremna za konzumiranje (RTE) je posebno okarakterisana kao zdravstveno nebezbedna po pitanju *L.monocytogenes*, jer ne postoji naknadni antimikrobni korak, tj., dodatna termička obrada, između proizvodnje i konzumacije (Jordan et. al., 2018). Rezanje hrane u maloprodajnim objektima se navodi kao značajan rizik od kontaminacija i procenjuje se da je 1,7 puta više slučajeva listerioze upravo povezano sa rezanim nego sa upakovanim proizvodima od mesa (Endrikat et al., 2010). Primer uticaja unakrsne kontaminacije hrane spremne za konzumiranje (RTE) povezan sa maloprodajnim lancem je velika epidemija listerioze, u Francuskoj 1992. godine u kojoj je bilo obolelo 279 osoba. RTE proizvod - svinjski jezik u želeu je identifikovan kao glavni vektor humane infekcije (Salvat et al., 1995). Međutim, isti PFGE podtip *L.monocytogenes* koji je bio u tom proizvodu nađen je u nekoliko drugih delikates proizvoda prodavanih na istom mestu, kao i kod obolelih pacijenata koji nisu konzumirali kontaminirani svinjski jezik u želeu. Ovo je samo jedan od primera unakrsne kontaminacije kao čestog mehanizma opstanka *L.monocytogenes* u okruženju, pa i onom u maloprodaji i načinu prenošenja putem RTE delikatesnih proizvoda (Ferreira et al., 2014). Površine koje dolaze u kontakt sa hranom mogu predstavljati značajnu opasnost, naročito ako ih naseljavaju bakterije sposobne za formiranje biofilmova, kao što je to *L.monocytogenes* (Gómez et al., 2015).

Zbog svoje ubikvitarne prirode, *L. monocytogenes* predstavlja čestog kontaminanta u industriji hrane, te se unakrsna kontaminacija može desiti pri svakom nivou proizvodnog procesa. Imajući to na umu, jasna je zabrinutost vezana za ovu patogenu bakteriju u smislu očuvanja javnog zdravlja (Dhama et al., 2015). Efekat na javno zdravlje koji imaju kontaminirani objekti za pripremu i služenje RTE hrane, može biti mnogostruko nepovoljniji kada su konzumenti takve hrane imunokompromitovane osobe. Imajući to u vidu, jasna je potreba za unapređenjem preventivnih i korektivnih

aktivnosti u pogledu kontaminacije *L.monocytogenes*, posebno u kuhinjama bolnica i domova za stare (Raheem, D., 2016).

U proizvodnom lancu proizvoda od mesa spremnih za konzumiranje, svaki od koraka može da bude potencijalni izvor kontaminacije listerijom. Kako farme predstavljaju prvi korak u proizvodnji proizvoda od mesa, veoma je važno obezbediti odgovarajući nivo zdravstvene zaštite životinja na farmi (Kurpas et al., 2018). Ako je *L.monocytogenes* prisutna kod svinja na farmi, ne znači nužno da će biti prisutna i u svinjskom mesu. Mišićno tkivo najčešće biva kontaminirano prilikom neadekvatnih postupaka klanja (Hellström et al., 2010), unakrsnom kontaminacijom sa kontaminiranih na nekontaminirane trupove, direktno ili posredno, opremom koja se koristi pri klanju. Prevalencija *L. monocytogenes* se generalno povećava od farme do proizvodnih pogona i to uglavnom zbog unakrsne kontaminacije (Thévenot et al., 2006). Rast *L.monocytogenes* u svežem mesu zavisi od vrste mesa, pH u njemu kao i od prisustva druge mikroflore (Rahimi et al., 2012). Vreme čuvanja mesa, kao i uslovi u kojima se to čini, veoma su važni za sigurnost proizvoda od mesa. Prema preporukama iz EFSA vodiča (EFSA J. 2014:12), vreme čuvanja crvenog mesa ne bi trebalo da prelazi 15 dana, a temperatura za to vreme ne sme biti veća od 7°C. Namenske zone u pogonima za proizvodnju RTE proizvoda od mesa, kao što su skladišta sirovog mesa, prostorije za pripremu i pakovanje, kao i skladišta gotovih proizvoda, predstavljaju mesta mogućeg izvora zagađenja ili unakrsne kontaminacije, kao i puteve širenja *L. monocytogenes* (Kurpas et al., 2018). Tako oprema u određenim zonama pogona, poput dela opreme za rasecanje, pakovanje, soljenje, dimljenje i kuvanje, predstavlja stalni izvor kontaminacije.

Otporna na niske temperature, kao i promene u koncentraciji soli, pH i kapacitetu aktivnosti vode, *L.monocytogenes* uspešno opstaje u usoljenim, sušenim i dimljenim proizvodima od mesa (Thévenot et al., 2006), među koje se ubrajaju i pršut, suva panceta, sušeni vrat, pečenica, kao i različite vrste tradicionalno pripremljenih kobasica od svinjskog mesa. Iako se može pojaviti primarna kontaminacija, prisustvo *L.monocytogenes* u RTE mesnim proizvodima uglavnom je posledica ili unakrsne kontaminacije proizvoda pre njegovog konačnog pakovanja ili kasnijeg rukovanja, tokom njegove komercijalizacije ili upotrebe u kući. Iz razloga kontrole i sprečavanja izbijanja oboljenja, neophodno je uspostaviti dobre pravne regulative i međunarodne

standarde u oblasti bezbednosti hrane. Na nivou Evropske unije, kriterijumi za prisustvo *L. monocytogenes* u RTE hrani su navedeni u Uredbi Evropske Komisije (EC) br. 2073/2005. Utvrđeno je da su subjekti u poslovanju s hranom odgovorni za primenu relevantnih kriterijuma za različite vrste hrane. Broj *L. monocytogenes* ne sme prelaziti granicu od 100 cfu/g tokom roka trajanja hrane koja ne može podržati rast ovih bakterija, ili je *L. monocytogenes* odsutna u 25g RTE hrane koja je sposobna da podrži rast ovih mikroorganizama ((EC) No 2073/2005).

2.2.1 Faktori koji utiču na rast i preživljavanje *L.monocytogenes* u hrani

L.monocytogenes može rasti i preživljavati u različitoj hrani, zavisno od različitihih uslova, koji podrazumevaju temperaturu, pH, aktivnost vode, koncentraciju soli, modifikovanu atmosferu (Thévenot et al., 2006). Za uspešno preživljavanje *L.monocytogenes* u različitim staništima, počev od zemljišta i voda, preko vegetacije i pogona industrije hrane, pa sve do organizma domaćina, zadužen je veliki broj regulatornih mehanizama. Ukupno 7% od celokupnog kodirajućeg dela genoma *L.monocytogenes* je zaduženo za rad i regulaciju mehanizama zaštite na različite nepovoljne uslove sredine. Sistem regulatornih mehanizama *L.monocytogenes* obuhvata: 331 transportnih proteina, 133 površinska i 86 sekretorna proteina, kao i veliki broj virulentnih faktora (Dussurget et al., 2004). Razumevanje faktora koji utiču na rast i preživljavanje *L.monocytogenes* u hrani može doprineti unapređenju principa koji se primenjuju u cilju postizanja bezbednosti hrane.

Glavni regulator odgovora na stres okoline kod *L.monocytogenes* je energetski zavisani sigma faktor (σ^B) (Oliver et al., 2010). On predstavlja jedan od ukupno četiri alternativna sigma faktora pronađena kod *L.monocytogenes*. Sigma faktor se vezuje za telo RNK polimeraze u odgovarajućim uslovima sredine i prepoznajući specifične promotorske regione, pomaže inicijaciju i regulaciju transkripcije određenih gena (Chaturongakul et al., 2008). Ustanovljeno je da je σ^B faktorom pozitivno regulisano najmanje 168 gena, dok broj gena koji su pod negativnom regulacijom ovog faktora iznosi 128. Šta više, nađeno je i to da je broj gena koji su pod regulacijom σ^B faktora zavistan od serotipa *L.monocytogenes* (Oliver et al., 2010). U normalnim uslovima

rasta, σ^B se održava neaktivnim kroz povezanost sa anti-sigma faktorom, RsbW. Kada se ćelija nalazi u stresnim situacijama, fosforilacija anti-anti-sigma faktora (RsbV) dovodi do njegovog vezivanja sa RsbW, što rezultira oslobađanjem σ^B faktora, omogućavajući mu na taj način da reguliše ekspresiju gena uključenih u stres regulaciju (Chaturongakul et al., 2008).

2.2.2.1 Temperatura

Optimalna temperatura rasta *L.monocytogenes* je pri temperaturi od 30°C do 37°C, dok u hrani može da raste pri temperaturama od 0,5°C do 45°C različitim intenzitetom, u zavisnosti od sastava hrane i uticaja drugih faktora. U hranljivom medijumu, *L.monocytogenes* može rasti na temperaturi od -2°C (Chan and Wiedmann, 2008). Generacijsko vreme *L.monocytogenes* značajno opada kako temperatura raste od -1,5°C do 30°C. Proračunato generacijsko vreme ovog patogena u vakum-pakovanju rezane pečene govedine, na temperaturi od -1,5°C, bilo je 100h (Bigot et al., 2011). U mlečnim proizvodima, generacijsko vreme *L.monocytogenes* na temperaturi od 4°C je procenjeno na 28,5h - 46h, na 21°C iznosilo je 1,8h, a na temperaturi od 35°C svega 0,7h (Johansson et al., 2002).

Poznato je da je za ekspresiju nekoliko ključnih gena virulencije, kao što su *hly* gen, kodirajući gen listerionog hemolizina O i *actA* gen, kodirajući gen za protein koji posreduje u polimerizaciji aktina, neophodnih za intracelularnu patogenezu, optimalna temperatura 37°C, dok je ista supresovana na 30°C (Schirm et al., 2004). Nasuprot njima, ekspresija kodirajućih gena za flagelin, pokretljivost i hemotaksu je suzbijena na temperaturi od 37°C. Optimalna ekspresija ovih gena je konstatovana na temperaturama nižim od 25°C (Azizoglu et. al., 2009). Sposobnost rasta ovog patogena na niskim temperaturama, posebno onima u hladnom lancu skladištenja hrane, predstavlja problem industriji hrane. Zahvaljujući posebnim mehanizmima organizacije fosfolipidnog sloja ćelijske membrane, ćelije ovog patogena uspevaju održati fluidnost membrane i na niskim temperaturama. Na temperaturi od 5°C smanjen je udeo dugih alifatičnih lanaca masnih kiselina na račun povećanja kraćih C-lanaca (Liu et al., 2002) U tom slučaju, očekivalo bi se povećanje asimetričnih grananja lanaca u membrani ćelije. Međutim, njihovo povećanje onemogućavaju van der Waals-ove veze, što sve doprinosi tome da

je dobro pakovanje fosfolipida membrane na niskim temperaturama smanjeno čime se olakšava održavanje fluidnosti membrane. Lui i sar. (2002) su pokazali da je rast *L.monocytogenes* na 10°C, u poređenju sa rastom na 37°C, regulisan genima uključenima u: adaptivni odgovor na niske temperature (*flaA* i *flp*), regulatorne adaptivne odgovore (*rpoN*, *lhkA*, *ycyJ*, *bglG*, *adaB* i *psr*), opšte mehanizme regulacije stresnih stanja (*groEL*, *clpP*, *clpB*, *flp* i *trxB*), metabolizam amino kiselina (*hisJ*, *trpG*, *cysS* i *aroA*) i metabolizam razgradnje (*eutB*, *celD* i *mleA*). Za rast na niskim temperaturama, neophodne su oligopeptidne permeaze (OppA) i visoko-afinitetni sistem za unos kalijuma (Kdp) (Borezee et al., 2000; Brondsted et al., 2003). Iako ne raste, *L.monocytogenes* u hrani može da preživi mnogo niže temeprature od -1,5°C. Tako je *L.monocytogenes* izolovana posle tri meseca boravka na temperaturi od -18°C do -20°C iz inokulisanih uzoraka ribe, škampi, mlevene govedine, mlevene ćuretine, kukuruza i sladoleda. Sastojci hrane mogu pomoći u zaštiti ćelija *L.monocytogenes* od loših efekata zamrzavanja i oštećenja prilikom odmrzavanja. Tako je prepoznato da kazein, laktoza i masnoća iz mleka, štite ćeliju *L.monocytogenes* od oštećenja usled delovanja nepovoljnog efekta prilikom zamrzavanja i odmrzavanja. Glicerol, takođe, ostvaruje isti krioprotektivni efekat (Ryser and Marth, 2007). Adaptacija *L.monocytogenes* na subletalne nivoe stresogenih faktora okoline, kao što su kiselina, etanol, natrijum hlorid, toplota ili gladovanje, povećava preživljavanje patogena tokom zamrzavanja i ciklusa zamrzavanje-odmrzavanje. Ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja dovode do oštećenja ćelije i smanjivanja njene vijabilnosti, povećavajući tako osetljivost ćelije na listeristatičke i listeriocidne agense (Cheng et al., 2015).

Rast *L. monocytogenes* na niskim temperaturama stimulisan je, takođe, prisustvom tzv. krioprotektivnih supstanci u hrani, kao što su na primer, betain, glicin i karnitin. Listerija unosi i akumulira ove supstance iz okoline, zahvaljujući aktivnosti sigma faktora σ^B tokom rasta na niskoj temperaturi. Kao odgovor na hladni šok, σ^B kontroliše transkripciju kodirajućih gena *BetL*, *Gbu* i *OpuC* za sisteme uključene u akumulaciju glicina, betaina i karnitina (Pereira et al., 2018).

2.2.2.2 Kiseloš sredine

Poput većine drugih bakterija, *L.monocytogenes* optimalno raste na neutralnoj pH, od 6,0 do 8,0. Iako je zabeležen njen rast u pH opsegu od 4,0 do 9,6 (Ryser and Marth, 2007), slabo kisela sredina se, ipak, može smatrati idealnom za rast *L.monocytogenes*, a sa opadanjem pH ispod 6,5 značajno se produžavaju lag faza i generacijsko vreme. Postoje indicije ka tome da *L.monocytogenes* može da preživi i pH < 4,0. Pokazano je da je u narandžinom soku (pH 3,6), čuvanom na 4°C, *L.monocytogenes* preživljavala četiri dana (Jay et al., 2008). Efekat pH na valijabilnost ćelija, snažno zavisi od drugih parametara sredine u kojoj se nalazi, kao i od fiziološkog stanja samog mikroorganizma. Posmatrajući parametre okruženja, ustanovljeno je da temperatura ima uticaja u ostvarivanju efekta pH sredine na vijabilnost ćelije *L.monocytogenes*. Niža temperatura omogućava patogenu preživljavanje nižih pH vrednosti sredine. Tako je evidentiran opstanak *L.monocytogenes* u salami (pH~4,4), čuvanoj u frižideru i u inokulisanom jogurtu, čak i do 27 dana (Ryser and Marth, 2007). Osetljivost *L.monocytogenes* na nisku pH se povećava sa povećanjem temperature, naročito kada je medijum nepogodan za rast. Otpornost na kiselinu značajno varira od fiziološkog stanja patogena. Izloženost stresu, na primer, može izazvati adaptivni odgovor koji povećava toleranciju *L. monocytogenes* na kiselinu. Ukazano je da ćelije *L.monocytogenes* stiču adaptaciju na kiselu sredinu i da, nakon izlaganja stresu, mnogo bolje podnose sredine sa niskom pH (Koutsoumanis et al., 2003).

L.monocytogenes je sposobna da preživi visoku kiselost u ljudskom želudcu i u makrofagnim fagozomima (Thévenot et al., 2006). Sistem glutamat dekarboksilaza (GAD), koji modifikuje intracelularni pH kod nekih Gram-pozitivnih ćelija, smatra se jednim od ključnih mehanizama postizanja homeostaze *L.monocytogenes* u kiseloj sredini (Cotter and Hill, 2003). Pored GAD sistema, sistemi arginin diaminaza (ADI) i F0F1ATPaza čine glavne komponente odbrambenog sistema *L.monocytogenes* od nepovoljnih pH uslova sredine (Stack et al., 2008). Sistemi glutamat dekarboksilaze i arginin su sastavljeni od različitih komponenti, a ekspresija gena, koji kodiraju za većinu od njih, je zavisna od kiselosti sredine kao i od aktivnosti σ^B faktora. Sojevi sa smanjenom aktivnošću GAD sistema pokazuju veću senzitivnost na kiselost gastrične tečnosti. GAD sistem je važan i tokom logoritamske i stacionarne faze rasta i neophodan je za uspostavljanje acido-tolerantnog odgovora (Thévenot et al., 2006).

Tokom eksponencijalne faze raste, što je i očekivano, ćelije su mnogo osjetljivije na uticaj niske pH nego li u stacionarnoj fazi.

Organske kiseline, generalno, ostvaruju veći inhibitorni efekat na rast *L.monocytogenes* u odnosu na neorganske, zahvaljujući njihovoj lipolitičkoj prirodi. Na temperaturi od 4°C ustanovljeno je da inhibiciju rasta *L.monocytogenes* ostvaruju: propionska pri pH vrednosti 5,0, sirćetna i mlečna pri 4,5 i limunska kiselina pri 4,0 (Lani and Hassan, 2016). Treći sistem uključen u zaštitu od nepovoljnih pH uslova je složena enzimska F0F1ATPaza. Njegova funkcija je u sintezi i/ili hidrolizi adenozin trifosfata (ATP) i translokaciji protona. U aerobnim uslovima, ovaj sistem služi za sintezu ATPa, koristeći protonski influks u ćeliju, dok u anaerobnim uslovima služi za generisanje pokretačke sile protona, pri čemu se protoni izbacuju iz ćelije. Kod bakterija kojima nedostaje respiratorni lanac, uloga sistema F0F1ATPaza je u kreiranju protonskog gradijenta nastalog hidrolizom ATPa i izbacivanju nastalog vodoničnog jona, što za uzvrat ima uspostavljanje pH homeostaze (Stack et al., 2008).

2.2.2.3 Aktivnost vode

Optimalna vrednost aktivnosti vode (a_w) za rast *L.monocytogenes* iznosi $a_w \geq 0,97$. Za većinu sojeva, minimalna vrednost aktivnosti vode je 0,93, ali postoje sojevi koji rastu i na vrednostima nižim od 0,90 (Thomas et al., 2012). Efekat vrednosti a_w na rast *L.monocytogenes* zavisi od ostalih uslova sredine u kojoj raste, u prvom redu od temperature, ali i od prirode i sastava sredine u kojoj se nalazi.

Rast *L.monocytogenes* u sredinama sa vrednošću $a_w \leq 0,90$ nije zabeležen, međutim, na niskim temperaturama ona može da opstane i u takvim sredinama duži vremenski period. *L.monocytogenes* preživljava u fermentisanim suvim salamama ($a_w: 0,79-0,86$) na 4°C više od 84 dana (Johnson et al., 1988). Niska vrednost aktivnosti vode ($a_w < 0,90$) deluje bakteriostatski na listeriju, ali nakon povećanja vrednosti ($a_w > 0,97$), pokazan je nagli rast bakterije. Tako se hrana koja ima karakteristike smanjene aktivnosti vode dok se čuva na hladnom režimu i kod koje se pre konzumacije vrednost aktivnosti vode povećava, poput sireva u salamuri ili slično, može smatrati potencijalnim izvorom unakrsne kontaminacije (Kakey et al., 2013).

Preživljavanje *L.monocytogenes* u uslovima niskih vrednosti a_w zavisi od sastava medijuma u kojem se nalazi. Svojstvo *L.monocytogenes* da raste u medijumima sa smanjenom a_w se ogleda u njenoj sposobnosti da akumulira u ćeliji osmoprotektante poput: betaina (trimetil-glicina), karnitina i peptida sa glicinom i prolinom, koji održavaju njen unutarćelijski pritisak (Madeo et al., 2012). Transporteri ovih supstanci su odgovorni za njihov unos u ćeliju niz osmotski gradijent, ostvarujući dugotrajnu osmotoleranciju i preživljavanje visokog salaniteta ($\geq 6\%$). Glicin betain se obično nalazi u biljnim tkivima, ribama i pecivima, dok je karnitin uglavnom prisutan u tkivima sisara. U *L.monocytogenes* su identifikovana tri važna ATP zavisna transportera ovih osmoregulatornih supstanci: BetL i Gbu za transport glicin betaina i OpuC odgovoran za transport karnitina (Sleator et al., 2003b). Pored ovih osmoregulatornih supstanci, brojni drugi proteini su uključeni u borbu ćelije protiv osmotskog stresa. Zato osmoregulacija predstavlja složen proces koji je regulisan na transkripcionom, translacionom i post-translacionom nivou. Mesta vezivanja σ^B faktora su pronađena uzvodno od *betL*, *gbu* i *opuC* gena, što navodi na mogućnost regulacije ekspresije navedenih gena od strane ovog faktora (Sleator et al., 2003b).

2.2.2.4 Koncentracija soli (NaCl)

Listeria monocytogenes toleriše izuzetno visoku koncentraciju soli. Odgovor mikroorganizma na osmotski stres predstavlja osmoadaptaciju i podrazumeva fiziološke promene kao i varijacije u ekspresiji gena (Pereira et al., 2018). *L.monocytogenes* može da raste u prisustvu 10 – 12% NaCl. Snižavanjem temperature povećava se sposobnost preživljavanja većih koncentracija soli (Thomas et al., 2012). Kao i u slučaju ispitivanja drugih faktora okoline, i uticaj koncentracije NaCl na rast *L.monocytogenes* je ispitan u korelaciji sa uticajem ostalih faktora. Tako je ustanovljeno da ćelije koje su izložene šoku visoke temperature imaju smanjenu sposobnost preživljavanja visokih koncentracija NaCl, kao i to da niske koncentracije NaCl (4-6%) doprinose preživljavanju ovih bakterija u sredinama sa graničnim vrednostima pH, dok visoke koncentracije iste soli (>10%) smanjuju njeno preživljavanje na istim pH vrednostima (Lani and Hassan, 2016). Povećanje koncentracije NaCl u sredini (do 4,5%) doprinosi termotoleranciji na temperaturama do 60°C. Preživljavanje listerije pri niskim

vrednostima pH i visoke koncentracije NaCl, najviše zavisi od temperature sredine (Ryser and Marth, 2007).

Proteini za adaptaciju osmotskog stresa, kao što su GbuA, AppA, Ctc, DnaK, HtrA i OpuC, identifikovani su kod *L.monocytogenes* (Abram et al., 2008). Jedan od glavnih mehanizama adaptacije na osmotski stres kod *L. monocytogenes* je nakupljanje supstanci, tzv. intracelularnih osmolita. BetL, Gbu i OpuC transportni sistemi učestvuju u transportu glicina, betaina i karnitina, važnih osmolita za rast bakterija pod osmotskim stresom (Fraser et al., 2003).

2.2.2.5 Pakovanje u modifikovanoj atmosferi

Modifikovana atmosfera predstavlja gasovito okruženje izmenjenog sastava sa osnovnim ciljem da produži rok trajanja hrane (Kirtil and Oztop, 2016). Pakovanje u modifikovanoj atmosferi se najčešće koristi za sveže meso, povrće i voće, čuvano na temperaturi frižidera. Izmenjeni sastav vazduha koji okružuje prehrambeni proizvod tokom njegovog čuvanja i skladištenja, može povoljno uticati na očuvanje njegovog kvaliteta na taj način što će smanjiti fiziološke promene u njemu, ublažiti oksidativne reakcije i suprimirati rast mikroorganizama (Mastromatteo et al., 2014). *Listeria monocytogenes* dobro raste i u aerobnom i u anaerobnih uslova na temperaturama hlađenja. Ova svojstva čine je potencijalno opasnom po bezbjednost hrane pakovane u modifikovanoj ambalaži (Lado and Yousef, 2007).

Ugljen dioksid u pakovanjima sa modifikovanom atmosferom utiče na smanjeni rast *L.monocytogenes*. Tako je u svežoj pastrmci, upakovanoj u ambalaži sa modifikovanom atmosferom sa 60% CO₂ : 40% N₂, sprečen rast *L.monocytogenes* na 5°C za više od dve nedelje, iako je pod aerobnim uslovima, detektovana već posle 4 dana. U pakovanju sa 100% CO₂, evidentirano je odsustvo rasta *L.monocytogenes* i nakon 160 dana čuvanog uzorka dimljenog bakalara na -1,5°C (Lani and Hassan, 2016).

Sistem pakovanja sa modifikovanom atmosferom može značajno smanjiti brzinu rasta *L.monocytogenes* kada je inkubirana na 3 °C. Takođe, inhibicija rasta ove bakterije je primećena u atmosferama sa visokim nivoom ugljen dioksida, ali samo na niskim temperaturama. Studije su pokazale da je kombinovani uticaj niske temperature (4°C) i

atmosfera sa 100% CO₂, imao najveći inhibitoryni efekat na rast *L.monocytogenes* (Lani and Hassan, 2016).

Prisustvo 10% kiseonika u atmosferi bogatoj azotom (npr. 80% azota) nije zadovoljavajuće inhibiralo rast *L.monocytogenes*. Povećanje količine ugljen dioksida produžava lag fazu i generacijsko vrijeme. Za ostvarivanje efekta usporavanja rasta *L.monocytogenes* se preporučuje atmosfera sa više od 80% ugljen dioksida. Inhibicija rasta ugljen dioksidom izraženija je na 4°C nego na 10°C, u uslovima pH od 5,5 od 6,5 (Whitley et al., 2000). U ogledu kojim je praćen rast inokulisane populacije *L.monocytogenes* u svežem siru u pakovanjima sa različitim sadržajem CO₂, primećeno je da nakon 7 i 14 dana nema statistički značajnog porasta broja bakterija u pakovanjima sa 70% i 100% CO₂ (Brown et al., 2018). Primetan porast broja *L.monocytogenes* u pakovanjima sa ovim procentom CO₂ je primećen nakon 21 dana, ali je isti, u poređenju sa pakovanjima sa manjim sadržajem CO₂, bio značajno manji. Efikasnost MAP u kontroli rasta mikroorganizama raste sa porastom procentnog sadržaja CO₂ u njima (Alam et al., 2011). Khoshgozaran i saradnici (2012) navode da antimikrobni efekat ugljen dioksid ostvaruje kroz narušavanje funkcija ćelijske membrane, fizičko-hemijskim izmenama proteina i lipida u membrani, inhibicijom enzimskog sistema, inhibicijom zaštitnih mehanizama ćelije i izmenom morfologije ćelije. Povećana koncentracija CO₂ u atmosferi pakovanja inhibira lipolizu, proteolizu i oksidaciju masti, što utiče na očuvanje upakovanog proizvoda duže vreme (Brown et al., 2018).

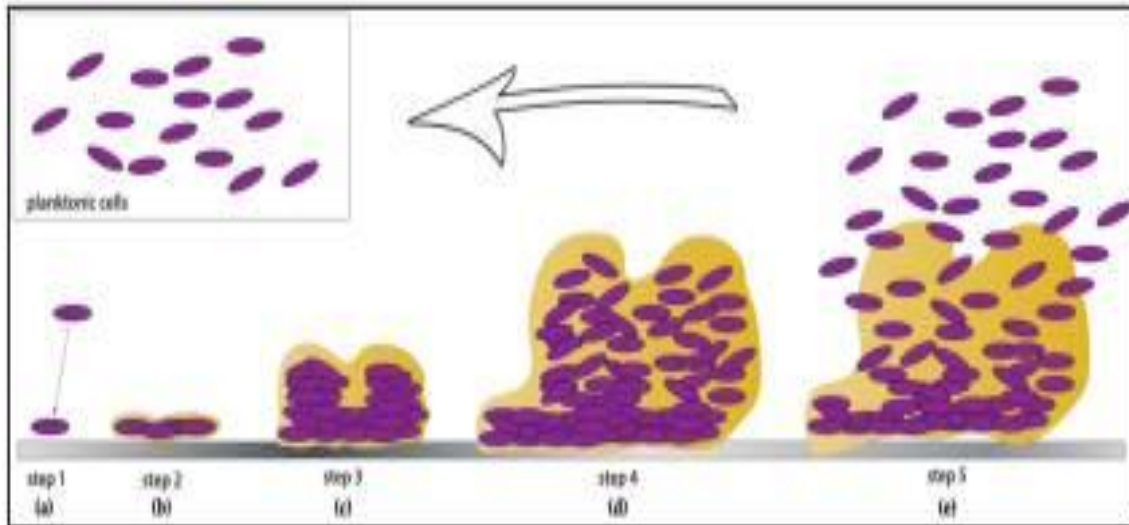
U studijama koje su se odnosile na praćenje rasta *L.monocytogenes* u pakovanjima svežeg svinjskog mesa, nije primećen efekat inhibicije niti vakum pakovanja niti pakovanja sa modifikovanom atmosferom. Na 4°C, u pakovanju sa 100% CO₂, potpuno je inhibiran rast *L.monocytogenes* u svežoj svinjetini (Howard et al., 2011). Rast *L.monocytogenes* u fermentisanim, dimljenim i sušenim proizvodima od svinjskog mesa, upakovanim u pakovanjima sa modifikovanom atmosferom, nije bio inhibiran sve do nivoa CO₂ od 80% i to na temperaturama od 4,7°C do 10°C. (Augustin et al., 2005). Ni vakum pakovanje niti modifikovana atmosfera sa 100% CO₂ nisu inhibirali listeriozni rast u šunki na temperaturama 4°C i 10°C. Iako postoje dokazi o tome da povećana koncentracija CO₂ produžava lag fazu rasta populacije *L.monocytogenes* i usporava njen rast u puferizovanom hranljivom bujonu, taj efekat

povećana koncentracija ugljen dioksida u modifikovanoj ambalaži narezane pršute nije pokazala (Michaelsen et al., 2006).

2.3 Sposobnost formiranja biofilmova

Biofilmovi predstavljaju složene mikrobiološke ekosisteme koje formira jedna ili više vrsta mikroorganizama, uronjenih u ekstracelularni matriks različitog sastava i porekla (Galié et al., 2018). Biofilmovi doprinose preživljavanju mikroorganizama u nepovoljnim sredinama, obezbeđujući im fenotipsku raznovrsnost i ekološke prednosti, uključujući: (i) zaštitu od okoline ekstracelularnim matriksom, (ii) poboljšanu dostupnost hranljivih materija i kooperaciju metabolizama kroz razmenu hranljivih materija i uklanjanje potencijalno toksičnih metabolita i (iii) sticanje novih genetskih osobina (npr. geni za rezistenciju na antibiotike) horizontalnim genskim transferom (Ferreira et al., 2014).

Formiranje biofilmova je dinamičan proces i sastoji se od nekoliko koraka. Inicijalno, slabe elektrostatičke i van der Velsove sile uključene su u prijanjanje planktonskih (pojedinačnih) ćelija za površinu i njihovo međusobno vezivanje. Ovaj prvi korak formiranja biofilmova se odigrava brzo i zavistan je od prirode podloge. Na neki način on predstavlja pripremu podloge u smislu podešavanja njenih fizičko-hemijskih osobina, najčešće izmenom hidrofobnosti i elektrostatičkog naboja, za kasnije etape razvoja biofilma (Slika 3.). Drugi korak formiranja biofilma predstavlja vezivanje ćelija mikroorganizma za izmenjenu površinu. Tokom ovog koraka, ćelije se mogu lako ukloniti. Ireverzibilno vezivanje ćelija se dešava u trećoj fazi formiranja biofilma i tad za njegovo uklanjanje treba primeniti mnogo veći napor. Tokom ove faze, pričvršćene ćelije proizvode ekstracelularnu polimernu supstancu (EPS). Na taj način se razvija biofilm sa više slojeva ćelija utopljenih u ekstracelularni matriks (Di Ciccio et al., 2012). Poslednji korak razvoja biofilma podrazumeva njegovo sazrevanje i tad je moguće da pojedinačne njegove ćelije napuste formaciju i krenu u osvajanje novih sredina (Colagiorgi et al., 2017).



Slika 3. Šematski prikaz faza razvoja biofilma (Colagiorgi et al., 2017)

Prednosti koje biofilm donosi ćelijama se ogledaju u njihovoj odbrani od štetnih uticaja okoline, kolonizaciji poželjnih niša, iskorišćenju benefita zajednice, u zaštiti od nepovoljnog okruženja koje može sadržati toksine, antibiotike, deterdžente i sanitaciona sredstva, kao i u moćnosti komunikacije između ćelija i transfera genetičkih informacija, uključujući i gene rezistencije (Di Ciccio et al., 2012).

Biofilmovi patogene *L.monocytogenes* su ozbiljan problem u industriji hrane budući da predstavljaju stalni izvor kontaminacija (Cherifi et al., 2017). *L.monocytogenes* je sposobna da se veže za mnoge površine koje su u kontaktu sa hranom, kao što su nerđajući čelik, polistiren i staklo (Di Bonaventura et al., 2008). Utvrđeno je da može biti prisutna i nekoliko godina u pogonu za proizvodnju hrane, gde izaziva ponovnu unakrsnu kontaminaciju prehrambenog proizvoda. Šta više, pojava epidemija i sporadičnih slučajeva listerioze, može biti u značajnoj meri pripisana povećanoj sposobnosti *L.monocytogenes* da preživi usled formiranja biofilмова (Chae et al., 2006).

Jedan od mehanizama uz pomoć kojeg *L.monocytogenes* opstaje u različitim nepovoljnim uslovima je, između ostalih, i formiranje biofilмова na različitim površinama. Na njenu sposobnost da gradi biofilmove snažno utiču temperatura, vreme inkubacije, medijum i priroda površine na koju prijanjaju ćelije. Takođe, sposobnost formiranja biofilмова je zavisna i od serotipa, iako ta zavisnost još nije u potpunosti razjašnjena (Colagiorgi et al., 2016). Još jedna karakteristika zavisna od serotipova koji

učestvuju u izgradnji biofilmova jeste i arhitektura biofilma. Tako se biofilmovi različitih serotipova razlikuju u njihovom biovolumenu, debljini i hrapavosti. U većini dokumentovanih radova opisuje se morfotip biofilma sličan saću, kojeg karakterišu slojevi kohezivnih, heterogeno raspoređenih ćelija, sa šupljinama i džepovima, dekorisanim mrtvim ćelijama i ekstracelularnom DNK (eDNK) (Colagiorgi et al., 2017). Ćelije su u biofilmu ugrađene u ekstracelularni matriks koji same produkuju i koji je sastavljen od različitih biopolimera, jednim imenom nazvanih ekstracelularnim polimernim supstancama (EPS). Matriks biofilma može da čini i 90% ukupne suve mase biofilma. Izgrađuju ga polisaharidi, proteini i DNK. Ovi molekuli su uključeni u adheziju površina, koheziju unutar biofilma i agregaciju bakterijskih ćelija. Osim toga, sprečavanje isušivanja, zaštita od antimikrobnih sredstava, apsorpcija organskih i neorganskih jedinjenja i enzimaska aktivnost, samo su neke od aktivnosti EPS-a u bakterijskim biofilmovima (Gray et al., 2018). Teihoinjska kiselina predstavlja najveću komponentu matriksa biofilma i doprinosi, između ostalog, agregaciji ćelija, smanjenju pokretljivosti u polučvrstim medijumima i veoma povećanoj toleranciji na sredstva dezinfekcije i dehidratacije, a time i opstanku ćelija u uslovima sredine. *L.monocytogenes* je sposobna da kodira za više od 130 vezujućih proteina, među kojima su najzastupljeniji: Internalin A (InlA), biofilm-vezujući protein (BapL), flagelin (FlaA), penicilin-vezujući protein (PBP), aktin vezujući-induktivni protein (ActA), koji predstavljaju samo neke od identifikovanih proteina u matriksu biofilma *L.monocytogenes* za koje je dokazano da učestvuju u vezivanju ćelija za površine i izgradnji biofilmova (Colagiorgi et al., 2016). Ekstracelularna DNK (eDNK) je važna strukturna komponenta EPS-a, koja zajedno sa proteinima i polisaharidima obezbeđuje strukturni integritet biofilmova. Pretpostavlja se da je eDNK oslobođena iz liziranih ćelija a da su joj uloge da u matriksu izgradi mesta usidrenja ćelija nastalih deljenjem ćelija u mikrokolonijama i da, zahvaljujući strukturi, služi kao sakupljač u regrutaciji planktonskih ćelija u biofilmu. Pored ovih strukturnih uloga, eDNK služi biofilmu kao izvor energije i nutritijenata. Nadalje, eDNK služi kao rezervoar gena koji se horizontalnim genskim transferom mogu prenositi među ćelijama (Borucki et al., 2003).

Nasuprot brojnoj literaturi koja ističe kao posebnu karakteristiku *L.monocytogenes* njenu sposobnost formiranja biofilmova, nije retka ni ona koja govori o nemogućnosti ovog patogena da formira biofilmove. Neki autori navode da

L.monocytogenes može isključivo zajedno sa drugim vrstama formirati biofilmove. U prilog ovim navodima stoji i činjenica da je vrlo malo direktnih mikroskopskih dokaza koji potvrđuju prisustvo biofilma na površini. Skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) uglavnom su zabeležene pojedinačne ćelije *L.monocytogenes* na različitim površinama (Kalmokoff et al., 2008).

Unutar pogona za proizvodnju hrane, jedno od najčešće korišćenih dezinfikacionih sredstava su kvaternarna amonijum jedinjenja, i među njima, posebno, benzalkonijum hlorid. Poznato je da izolati *L.monocytogenes* iz ovakvih sredina imaju razvijenu toleranciju prema ovim dezinficijensima (Stoller et al., 2019). Pored toga, sposobnost formiranja biofilmove može povećati preživljavanje, posebno u nišama u kojima je teško postići u potpunosti postupak čišćenja. Sojevi *L.monocytogenes* široko rasprostranjeni u pogonima za proizvodnju hrane, kakvi su oni iz klonalnih kompleksa (CC) 21 i (CC)121, uz veliku sposobnost formiranja biofilmove, najčešće u svom genomu sadrže *qecH* i *brcABC* gene, odgovorne za rezistenciju na benzalkonijum hlorid (Stoller et al., 2019).

Pored toga, bakterijske vrste koje formiraju biofilm mogu imati genomske varijacije u odnosu na ključne gene koji su uključeni u karakteristike biofilma, što dovodi do razvoja potpuno različitih biofilmove pod različitim uslovima. Ova složenost, zajedno sa velikom raznovršnošću pogođenih sredina i raznolikosti kolonizujućih bakterijskih vrsta, komplikuje iskorenjivanje biofilma u prehrambenoj industriji (Galié et al., 2018). Detaljnija i dublja znanja o sastavu i načinima formiranja biofilmove su ključni preduslov za razvoj efektivnije strategije sa ciljem minimalizacije perzistentnosti *L.monocytogenes* u industriji hrane (Ripolles-Avila et al., 2018).

2.4 Otpornost *L.monocytogenes* na dejstvo kvaternarnih benzalkonijum hlorida

Pored formiranja biofilmove, rezistencija na dezinfekciona sredstva, predstavlja jedan od osnovnih fenotipskih faktora koji doprinosi preživljavanju i opstanku *L.monocytogenes* u sredinama za proizvodnju hrane (Mullapudi et al., 2008). U procesu čišćenja i sanitacije pogona za proizvodnju hrane, široku upotrebu imaju jedinjenja kvaternarnih amonijum soli, kakav je benzalkonijum hlorid (BC). Kvaternarna amonijum jedinjenja su uobičajeno korišćena sredstva za dezinfekciju kako u

medicinskom, tako i u okruženju za proizvodnju hrane. To su soli kvaternarnih amonijum jona, koje imaju osobinu da ostaju permanentno naelektrisane bez obzira kakav je pH sredine u kojoj se nalaze. Svoje baktericidno dejstvo ostvaruju tako što, vezujući se za membranu, vrše disocijaciju fosfolipidnog sloja što rezultira poremećajem njene permeabilnosti i curenjem ćelijskog sadržaja. Izmenom naelektrisanja sredine dovode do disocijacije biomolekulskih kompleksa ćelijskog zida ali i do inaktivacije enzima i denaturacije proteina i nukleinskih kiselina (Meier et al., 2017). Kvaternarna amonijum jedinjenja su prvenstveno aktivna prema Gram-pozitivnim bakterijama. Iako blažu, naučna literatura beleži i aktivnost prema Gram-negativnim bakterijama, nekim virusima, gljivama i protozoama (Monica et al., 2002).

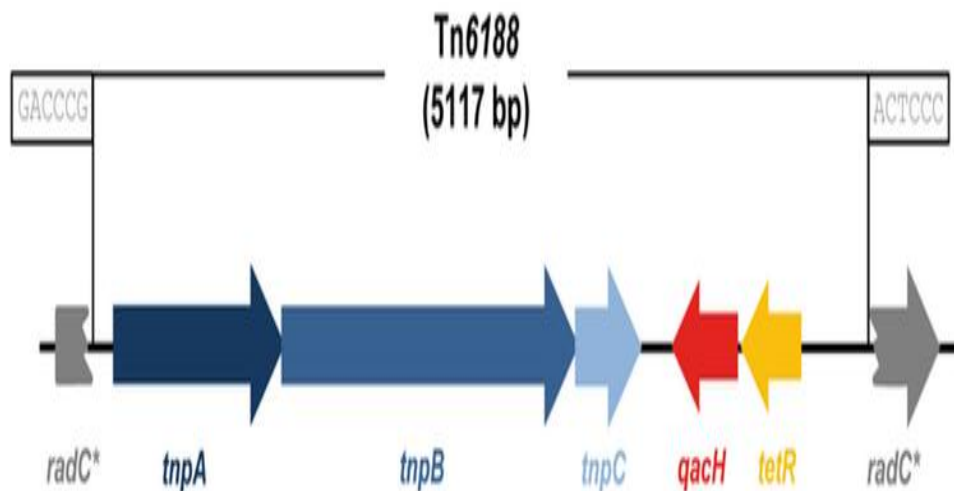
U cilju obezbeđivanja mikrobiološke bezbednosti, benzalkonijum hlorid (BC) ima široku primenu u dezinfekciji pogona za proizvodnju hrane. Benzalkonijum hlorid (BC) je najčešće primenjivano jedinjenje kvaternarnih amonijum jona sa tipičnom C12-C16 dužinom alkilnih lanaca (Møretrø et al., 2017). Bakteriostatsku ili bakteriocidnu aktivnost ostvaruje u zavisnosti od svoje koncentracije. Brzo-delujuće je baktericidno sredstvo sa modifikovanom produženom aktivnošću delovanja. U visokoj koncentraciji, delujući sa karboksilnim grupama, izazivaju koagulaciju komponenti bakterijske citoplazme (Monica et al., 2002).

Smanjena osetljivost *L.monocytogenes* na dejstvo kvaternarnih amonijumovih soli, posebno benzalkonijum hlorida (BC), koji ima široku primenu u pogonima za proizvodnju hrane, predstavlja rastući problem po javno zdravlje i zabrinutost kada je u pitanju bezbednost hrane (Meier et al., 2017). Upotreba dezinficijensa u preporučenim koncentracijama može u potpunosti inaktivirati *L.monocytogenes*, međutim, različiti faktori, kao što su ostaci hrane, biofilmovi, neadekvatni programi pranja i dezinfekcija ili nepravilno doziranje, mogu značajno umanjiti efikasnost dezinficijensa. Između 10 – 46% izolata *L.monocytogenes* iz hrane i pogona za proizvodnju hrane se može smatrati rezistentnim na dejstvo benzalkonijum hlorida (Müller et al., 2013). Zabrinjava i činjenica da su kvaternarna amonijum jedinjenja slabo razgradiva, što produžava njihov kontakt sa bakterijama a za posledicu ima izloženost mikrobiološke zajednice subinhibitornim koncentracijama dezinficijensa. Subinhibitorne koncentracije BC mogu da izmene morfologiju i arhitekturu biofilmova. Šta više, subinhibitorne doze

kvaternarnih amonijum jedinjenja mogu stimulatивно delovati na formiranje biofilmova (Ortiz et al., 2014).

Među poznatim molekularnim mehanizmima BC rezistencije su aktivnost efluks-pumpe kodirana *brcABC* kasetom gena i ekspresija *qacH* gena u Tn6188 transpozonu (Meier et al., 2017). Pokazalo se da je preovlađujući sekvencijski tip *L.monocytogenes* sa rezistencijom na BC u Evropi veoma konzervativan i da sadrži transpozon Tn6188 (Møretreth et al., 2017).

Transpozon Tn6188 se opisuje kao jedan od odgovornih za razvoj rezistencije na benzalkonijum hlorid kod *L.monocytogenes*. Integrisan hromozomski unutar *radC* gena, Tn6188 transpozon ima veličinu od 5117 bp i sadrži tri transpozazna gena (*tnpA*, *tnpB*, *tnpC*), kao i gene transkripcione regulacije (*qacH* i *tetR*). Unutar Tn6188 transpozona se nalazi i *qacH* gen koji kodira QacH protein iz porodice malih proteina rezistentnih na različite lekove. Ovaj protein se smatra odgovornim za rezistenciju na BC kod *L.monocytogenes* a pokazuje visoku sličnost u amino-kiselinskom sastavu sa, za rezistenciju odgovornim proteinima, Smr/QacC kod *S.aureus* i EmrE kod *E.coli* (Müller et al., 2013).



Slika 4. Transpozon Tn6188 (Müller et al., 2013)

L.monocytogenes sa genskim determinantama rezistencija na BC, *qacH* i *bcrABC*, ima visoku prevalencu u prehrambenoj industriji (Møretrø et al., 2017). Potvrđeno je da je QacH odgovoran za porast tolerancije prema BC kod izolata *L.monocytogenes* koji u svom genomu sadrže Tn6188 transpozon (Müller et al., 2014). Ovaj složeni transpozon, plazmidskog porekla, odgovoran za rezistenciju na BC, identifikovan je u *L.monocytogenes*, koja je 1998/1999 godine izazvala epidemiju u SAD. U tom slučaju, razvoj tolerancije na BC je bio posredovan aktivnošću *bcrA* transkripcionog regulatora, sadržanog u *bcrABC* kaseti gena i *bcrBC* transportera iz porodice malih proteina rezistentnih na lekove, takođe činilaca pomenute kasete gena. U okviru iste studije je pokazano da je transkripcija *bcrABC* rezistentnih gena porasla u prisustvu subletalnih koncentracija BC, međutim mehanizam na koji je transkripcija regulisana u prisustvu dezinficijensa i dalje ostaje nepoznat (Elhanafi et al., 2010).

2.5 Osetljivost *L.monocytogenes* na antimikrobne lekove

Iako je listerioza ljudi retko obolenje, kada se desi, može da izazove ozbiljne zdravstvene probleme, posebno među osetljivim grupama populacije: starijim osobama, trudnicama, novorođenčadima i imunokompromitovanim pojedincima (Gunes Altuntas et al., 2012). Primarni izbor antibiotske terapije za lečenje listerioze ljudi podrazumeva upotrebu β -laktama (penicilina i ampicilina) samog ili u kombinaciji sa aminoglikozidom, poput gentamicina ili streptomocina. Kod pacijanata koji su alergični na penicilin u upotrebi je terapija trimetoprima sa sulfonamidom. Eritromicin se koristi za lečenje trudnica, a kao terapija za listeriozu koriste se još i: vankomicin, rifampicin, tetraciklin, hloramfenikol i fluorohinoloni (Olaimat et al., 2018).

Rezistencija patogena na antibiotike je značajna briga javnog zdravlja. Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije (WHO, 2018), rezistencija na antimikrobne lekove predstavlja sposobnost mikroorganizma da preživi koncentraciju antibiotika koja se koristi u kliničkoj praksi, gde je organizam promenio svoj odgovor na antibiotik. Prvi soj *L. monocytogenes* otporan na antibiotike je prijavljen 1988. godine. Od tada je

prijavljen sve veći broj rezistentnih sojeva izolovanih iz hrane, životinja i ljudi (Altuntas et al., 2012). Ispitivanja govore da sojevi *L.monocytogenes* pokazuju rezistentnost na: cefalotin, nalidiksičnu kiselinu, cefalosporin, cefotaksim, cefepim, fosfomicin, oksacilin i linkozamid (Olaimat et al., 2018). Zabrinjavajući je porast rezistencije na antibiotike *L.monocytogenes* u svetu (Yan et al., 2010). Pretpostavlja se da povećana upotreba antibiotika u terapijske svrhe kod životinja i ljudi može dovesti do razvoja rezistencije na antibiotike. Antibiotici se u velikoj meri koriste kod životinja da bi se sprečile, kontrolisale i lečile bolesti, ali i sa svrhom povećanja rasta životinja (Wilson et al., 2018). U Evropi, antibiotici su korišćeni kao aditiv za stočnu hranu od pedesetih godina prošlog veka; međutim, Evropska unija od januara 2006. godine zabranjuje njihovu upotrebu u hrani za životinje (Castanon, 2007). Iako postoji nekoliko mogućih načina kojima se sojevi rezistentni na antibiotike mogu preneti između životinja i ljudi, najverovatniji način je prenos duž lanca ishrane. *L.monocytogenes* se obično susreće sa niskim nivoima antibiotika i drugih antimikrobnih sredstava u lancu proizvodnje hrane. Ovo može poslužiti kao preekspoziciona adaptacija, koja kasnije omogućava *L.monocytogenes* da se odupre višim koncentracijama antibiotika ili antimikrobnih supstanci (Olaimat et al., 2018).

Mesto vezivanja i prvo mesto delovanja antimikrobnih supstanci jeste površina bakterijske ćelije. Ćelijski zid i membrana predstavljaju target mesta antimikrobnih peptida (AMP). U cilju odbrane od njihovog dejstva, mikroorganizmi su tokom evolucije razvili brojne mehanize zaštite. Bakterije često modifikuju komponente ćelijske površine kako bi se suprotstavile efektima AMP smanjenjem neto negativnog naboja ćelije, promenom fluidnosti membrane ili direktnim modifikovanjem AMP target-vezivnih mesta (Nawrocki et al., 2014). Mnogi antimikrobni proteini ciljaju bakterijske ćelije putem elektrostatičkih interakcija sa površinom ćelije. Neto naboj površine bakterijske ćelije generišu anjonske komponente ćelijske membrane i ćelijskog zida, kao što su fosfolipidi i teihonska kiselina. S druge strane, pozitivno naelektrisani AMP privlači negativno naelektrisana površina bakterijskih ćelija. Dakle, da bi se ograničila elektrostatička interakcija antimikrobnih proteina sa površinom ćelije, neophodno je menjati naelektrisanje površine ćelije (Nawrocki et al., 2014). Izmenu naelektrisanja fosfatidilglicerola u ćelijskom zidu većine Gram pozitivnih bakterija vrši MprF peptid- Multipeptidni faktor rezistencije (Multipeptide resistance factor protein,

eng). MprF protein, poznat još pod imenom fosfatidilglicerol lizintransferaza, katalizuje transfer pozitivno naelektrisane lizin-grupe u membranski fosfatidilglicerol gradeći tako lizinfosfatidilglicerol (Lis-PG), najveću komponentu bakterijske membrane sa pozitivnim neto naelektrisanjem (Staubitz et al., 2004). Kod *L.monocytogenes*, kao i kod mnogih drugih Gram pozitivnih bakterija, MprF protein aminoacidilacijom fosfatidilglicerola doprinosi razvoju rezistencije na dejstvo širokog spektra pozitivno naelektrisanih antimikrobnih proteina, među koje se ubrajaju i komponente ljudskog odbrambenog sistema, kao i brojni antibiotici i dezinficijensi (Slavetinsky et al., 2012).

Protein fosfomicinske rezistencije (FosX) predstavlja još jedan od odbrambenih mehanizama *L.monocytogenes*. Izolovan iz serotipa 1/2a, FosX protein katalizuje reakciju hidrolizacije fosfomicina. Lociran u citoplazmi, svoju katalitičku aktivnost u obezbeđenju antimikrobne rezistencije na fosfomicin, ispoljava tek nakon vezivanja sa Mg^{2+} jonima, koji predstavljaju kofaktor ovog enzimatskog kompleksa (Fillgrove et al., 2003). Familiju proteina fosfomicinske rezistencije čini veliki broj Fos enzima, izolovanih kod različitih vrsta bakterija. Protein FosX je karakterističan isključivo za *L.monocytogenes* (Falagas et al., 2019).

2.6 Sekvenciranje celokupnog genoma

Uporedo sa razvojem molekularnih metoda za detekciju i tipizaciju bakterijskih vrsta, nalazila se njihova primena u oblasti bezbednosti hrane. Pored praćenja bolesti, upotreba tradicionalnih metoda molekularne tipizacije doprinela je boljem razumevanju prenosa, izvora i rezervoara patogena koji se prenose hranom duž lanca hrane, počev od farmi, preko postrojenja za preradu pa sve do maloprodajnih objekata (Stasiewicz et al., 2015). Usled potrebe ranog otkrivanja klastera kojem priprada izazivač oboljenja, kao i njegovog izvora, uspostavljen je veliki broj metoda identifikacije i tipizacije *L.monocytogenes*. Serotipizacija somatskih i flagelarnih antigena je metoda koja je među prvima korišćena u svrhu tipizacije *L.monocytogenes*, ali je zamenjena molekularno zasnovanom PCR serotipizacijom. Unapređenje identifikacije se dalje kreće u smeru upotrebe metode tipizacije multilokusnih sekvenci (Multilocus sequence typing - MLST) za sedam “housekeeping” gena (Halbedel et al., 2018). Gel elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE) je, sve do početka primene WGS, predstavljala zlatni standard za tipizaciju *L.monocytogenes* (Nadon et al., 2017).

Nasuprot dugotrajnom, skupom i metodu teškom za standardizaciju, kakav je PFGE metod (Ruppitsch et al., 2015), sekvenciranje celokupnog genoma je prepoznato kao metoda superiornije osetljivosti i specifičnosti, koja pruža mogućnost sakupljanja epidemioloških rezultata u realnom vremenu (Nadon et al., 2017).

Sekvenciranje celokupnog genoma (eng. Whole genome sequencing -WGS) je prepoznato kao moćna tehnologija za poređenje izolata u analizi epidemije (Kwong et al., 2016). U pogledu karakterizacije *L.monocytogenes* i u istraživanjima izolata odgovornih za izbijanje epidemija, sekvenciranje celokupnog genoma predstavlja ultimativnu tehniku današnjice (Ruppitsch et al., 2015). Ispitivanja epidemija listerioze pružaju jedinstvenu priliku za sticanje novih naučnih saznanja o prisutnosti *L.monocytogenes* u okruženju za preradu hrane (Pietzka et al., 2019).

Sekvenciranje celog genoma (WGS) se poslednjih godina pojavilo kao metoda izbora za epidemiološki nadzor i istraživanje epidemija uzrokovanih bakterijskim patogenima. Analizom polimorfizama jednog nukleotida (SNP) unutar celokupnog genoma, moguće je otkriti detaljne informacije o filogenetskim odnosima unutar vrste u rezoluciji koja se ne može dobiti pomoću klasičnih metoda molekularne tipizacije kao što su PFGE (Gel elektroforeza u pulsirajućem polju) i MLST (Tipizacija multilokusnih sekvenci) (Fagerlund et al., 2016). Sekvenciranje celokupnog genoma ne pruža samo informacije o filogenetskoj udaljenosti, već i dodatno, informacije o serotipu, kao i genima virulentnosti i rezistencije (Pietzka et al., 2019). Tipizacija baza skeniranog genoma, na osnovu procene pojedinačnih nukleotidnih izmena (SNP) ili pomoću analize alelskog statusa za svaki pojedinačni gen “jezgralnog” (eng. core) genoma (cgMLST), atraktivna je alatka za karakterizaciju bakterijskih vrsta (Ruppitsch et al., 2015). Jedna od razvijenih šema cgMLTS koristi set od 1701 lokusa na genomu prisutnih kod većine izolata *L.monocytogenes* (Halbedel et al., 2018). Zasnovana na alelskoj sličnosti, tj., broju identičnih u odnosu na broj različitih alela, ova metoda omogućava grupisanje izolata odgovornih za izbijanje epidemija, razdvajanje nesrodnih sojeva i olakšava komunikaciju među laboratorijama usled toga što se analizom šema obezbeđuje automatski izgradnja cgMLST nomenklature (Ruppitsch et al., 2015). Korišćenje cgMLTS šeme je prvi put upotrebljeno u ispitivanju povezanosti slučajeva listerioza u Austriji i Nemačkoj u periodu od 2011. do 2013. godine. Tada su ovom metodom razdvojeni izolati *L.monocytogenes* poreklom iz humanih uzoraka i iz hrane u različite

klastera, a koji su, na osnovu podataka prethodno dobijenih upotrebom PFGE metode, bili okarakterisani kao pripadnici istog klastera (Schmid et al., 2014). Ograničenost upotrebe rezultata PFGE metoda u epidemiološkim istragama se ogleda u njoj osobini da razlike između izolata temelji na jednobendnim varijacijama, ne razdvajajući, pri tom, one razlike nastale usled malih genetičkih razlika, poput tačkastih mutacija, od onih krupnijih, poput insercije dela genoma pomoću mobilnih genetičkih elemenata (Morganti et al., 2016). Upravo ove veće i značajnije izmene na genomu mogu poslužiti kao pouzdani markeri u otkrivanju klonova *L.monocytogenes* u epidemiološkim istragama (Wang et al., 2015). Metoda sekvenciranja kompletnog genoma ima sposobnost da uoči prisustvo mobilnih genetičkih elemenata, što njene rezultate čini pouzdanim i korisnim u procesima otkrivanja izvora kontaminacije, ali i u procesima uspostavljanja adekvatnih mikrobioloških monitoringa unutar prehrambenih pogona (Morganti et al., 2016). Iako je PFGE metoda imala široku primenu u epidemiološkim istragama, njena ograničenja na nivou molekularne karakterizacije i podtipizacije bakterija, kao i nedovoljno dobra preciznost, ukazala su na potrebu upotrebe sofisticiranijih molekularnih metoda. Najnovija tehnološka dostignuća pružaju sposobnost sekvenciranja kompletnog bakterijskog genoma, na vremenski i ekonomično prihvatljiv način. Tako je metoda sekvenciranja kompletnog genoma prepoznata kao trenutno najkorisnija molekularna metoda prikupljanja informacija o patogenu na nivou DNK i gena sa izuzetno velikom preciznošću (Allard et al., 2018).

Retrospektivu upotrebe WGS u naučne i druge svrhe treba otpočeti 1977. godine, sa prvom, originalnom tehnologijom sekvenciranja, nazvanom po njenom utemeljivaču, Sanger sekvenciranje. To je bila revolucionarna metoda za precizno sekvenciranje relativno kratkih DNK fragmenata, a skupoća i dužina trajanja analiza nisu obezbeđivali njenu praktičnu primenu. Kontinuirani tehnološki napredak u molekularnoj biologiji doveo je do uspostavljanja metode Sekvenciranja nove generacije (eng. Next-generation sequencing, NGS), koja je mnogo jeftinija i čijom upotrebom je moguće sekvencirati cele genome za svega nekoliko dana (Brown et al., 2019). Upotrebom NGS, kompletan bakterijski genom može biti sekvenciran u malim nasumičnim fragmentima (od manje od 100 bp do nekoliko 1000 bp) više puta u jednoj reakciji, nakon čega se cela DNK sekvenca određuje elektronskim putem povezivanja

fragmenata sa nizovima koji se preklapaju, korišćenjem softvera za upoređivanje sekvenci (Vincent et al., 2017).

Podaci u nukleotidima u genomu bakterija, dobijeni nakon sekvenciranja, moraju biti analizirani sa ciljem upoređivanja dva bakterijska izolata (Fagerlund et al., 2016). Postsekvencionu obradu sirovih podataka o nukleotidima se ostvaruje na dva načina. Prvi pristup se ogleda u određivanju razlika u nukleotidima na specifičnim mestima u genomu ispitivanog soja u odnosu na sekvencu referentnog soja. Ovaj pristup upoređuje bazu po bazu i naziva se Analiza pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama (eng. Single-nucleotide polymorphism, SNP) (Stasiewicz et al., 2015). Drugi pristup se zasniva na anlizi gen po gen, tj., analizi varijacija u kodirajućim delovima gena (ili lokusa) i nosi naziv Tipizacija multilokusnih sekvenci (eng. Multilocus sequence typing, MLST) (Maiden et al., 2013). Analiziraju se sve razlike u genomu (tj. pojedinačni nukleotidni polimorfizmi, insercije, delecije i rekombinacije), što ovaj pristup čini vrlo fleksibilnim, jer se broj i priroda procenjenih gena mogu prilagoditi bilo kojoj situaciji i genima o kojima je reč (Brown et al., 2019). PulseNet International je globalna mreža uspostavljena sa ciljem standardizacije upotrebe podataka dobijenih sekvenciranjem kompletnog genoma patogenih bakterija koje se prenose hranom i njihove dostupnosti u realnom vremenu širom sveta. Uz standardizaciju protokola, razvoj baze podataka i nomenklature, podaci dobijeni WGS metodom bi bili pogodni za potrebe otkrivanja izvora epidemija i njihovih nadzora, kao i za odgovore na naučna pitanja koja se odnose na atribuciju izvora, antimikrobnu otpornost, obrasce prenošenja i virulenciju patogena iz hrane, što će dalje omogućiti zaštitu i poboljšanje javnog zdravlja u pogledu bolesti prenosivih hranom (Nadon et al., 2017). PulseNet trenutno primenjuje tri nivoa diskriminacije: (1) multilokusna tipizacija sedam „housekeeping“ gena: (7-gen) MLST; (2) multilokusna tipizacija centralnog „core“ genoma: cgMLST, kojom se procenjuju geni prisutni u gotovo svim sojevima date vrste i (3) multilokusna tipizacija celog genoma: wgMLST, kojom se procenjuju skoro svi geni koji su prisutni u bilo kom soju ispitivane vrste (Brown et al., 2019).

Konstantno unapređenje tehnologije izaziva promenu paradigme u načinu na koji naučnici identifikuju patogene i njihove izvore. Razvoj drugih oblasti, kao što su mikrobiološka ekologija, evolucionarna biologija, epidemiologija, bioinformatika i informaciona tehnologija, omogućili su široku dostupnost malih, lako korišćenih

sekvenci i pružili sposobnost korišćenja informacija o genomskim sekvencama u cilju poboljšanja bezbednosti hrane i javnog zdravlja (Allard et al., 2018). Širokoj upotrebi metode sekvenciranja kompletnog genoma u nacionalnim i međunarodnim sistemima nadzora bezbednosti hrane i javnog zdravlja, doprinosi brzina njenog izvođenja, kao i isplativost. Pored toga, WGS metoda može zameniti mnoge tradicionalne mikrobiološke metode identifikacije i karakterizacije bakterija, kao na primer, serotipizaciju, antimikrobnu rezistenciju (AMR) i određivanje faktora virulencije i to sve u jednom WGS procesu (Brown et al., 2019).

U današnjem svetu, gde globalizacija i potreba za što efikasnijom proizvodnjom i preradom hrane dovode do progresivno složenih lanaca hrane, epidemiološki podaci koji povezuju infekcije sa specifičnim uzorcima hrane, čine se ključnim za suzbijanje i lečenje oboljenja izazvanih patogenima iz hrane. U ovom segmentu, u sprovođenju nadzora javnog zdravlja, upotreba metode sekvenciranja celokupnog genoma ima nezamenljivu ulogu (Fagerlund et al., 2016). Može se koristiti za karakterizaciju patogenih izolata koji se prenose hranom, pružajući nove uvide u biologiju i transmisiju patogena (Ortiz et al., 2015). Rutinska upotreba sekvenciranja kompletnog genoma u ispitivanjima patogena u hrani je postala realnost (Wang et al., 2016). Tako Administracija za hranu i lekove Sjedinjenih Amričkih Država (FDA) koristi WSG kao deo svojih programa bezbednosti hrane još od 2008. godine (US FDA, 2015). Centar za bezbednost hrane i ishranu u okviru FDA (CFSAN) ustanovio je 2013. godine prvu integrisanu mrežu WSG podataka (Genome Trakt WGS Network) državnih i federalnih laboratorija sa ciljem unapređenja aktivnosti otkrivanja i suzbijanja epidemija izazvanih patogenima iz hrane i podrške naučnim ispitivanjima (Stevens et al., 2017). U zemljama Evropske Unije je upotrebom WSG metode istraženo nekoliko epidemija listerioze, a njena upotreba gotovo da je postala obavezna u nacionalnim referentnim laboratorijama (Wang et al., 2016).

Sveobuhvatna i pravovremena karakterizacija *L. monocytogenes*, zasnovana na sekvenciranju kompletnog genoma je neophodna za optimizaciju i napredniju identifikaciju klastera bolesti i njihovih izvora na nacionalnom i globalnom nivou (Halbedel et al., 2018). Povećana javna dostupnost podataka o genomima dobijenih iz sistematskog nadgledanja patogena u okruženju prehrambene industrije, nesumnjivo bi povećala tačnost praćenja prenosa tokom scenarija izbivanja epidemija (Fagerlund et al.,

2016). Ipak, široka upotreba pristupa zasnovanih na WGS još uvek je otežana zbog nedostatka standardizovane nomenklature koja bi olakšala globalnu razmenu podataka (Ruppitsch et al., 2015).

Da bi podaci dobijeni sekvenciranjem celokupnog genoma *L.monocytogenes* imali primenljiv značaj, a time i mere zaštite javnog zdravlja bile uspešne, neohodna je konstantna saradnja autoriteta iz domena zaštite javnog zdravlja, bezbednosti hrane, mikrobiologije hrane, epidemiologije (Pietzka et al., 2019). Pored unapređenja istraga o epidemijama i njihovim uzročnicima, WGS će verovatno promeniti atribuciju mikrobioloških izvora kontaminacije i uzročnika oboljenja. Sve to će doprineti proširenju epidemioloških znanja i zaštiti javnog zdravlja (Carleton and Gerner-Smidt, 2016).

3. CILJEVI I ZADACI RADA

Cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je da se primenom sekvenciranja kompletnog genoma (Whole Genome Sequencing-WGS) analiziraju sojevi *Listeria monocytogenes* izolovani u procesu prerade mesa, kako iz proizvoda, tako i sa površina iz proizvodnog pogona, tokom četvorogodišnjeg perioda uzorkovanja. Nakon detekcije i izolacije sojeva *L.monocytogenes*, ovim radom se ciljano želi izvršiti njihova molekularna karakterizacija primenom metode sekvenciranja kompletnog genoma. Sagledavajući ogroman potencijal koji primena ove metode u sistemu bezbednosti hrane ima, cilj ovog rada je da se na osnovu podataka dobijenih sekvenciranjem genoma, odredi filogenetska srodnost među izolatima, odredi njihova pripadnost određenim serotipovima, ali i potvrdi eventualno prisustvo markera rezistencije na antimikrobne lekove (*mprF* i *fosX* gena) i dezinfekciona sredstva (Tn6188 i *bcrABC*). Nadalje, cilj ovog rada je da se kod izolovanih sojeva *L.monocytogenes* ispita sposobost formiranja biofilmova.

Za ostvarenje ovih ciljeva u okviru doktorske disertacije postavljeni su sledeći zadaci:

- Prikupiti uzorke suvomesnatih proizvoda, kao i briseva sa površina proizvodnog pogona za preradu mesa tokom četvorogodišnjeg perioda.
- Izvršiti izolaciju i detekciju *Listeria monocytogenes*.
- Izvršiti DNK ekstrakciju, sekvenciranje kompletnog genoma (WGS), serotipizaciju
- Ispitati prisustvo gena za osetljivost na antimikrobne lekove.
- Rezultate nukleotidnih sekvenci obraditi u European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena>).
- Uraditi PCR skrining na prisustvo markera za otpornost na dezinficijense.
- Ispitati sposobnost izolovanih sojeva *L. monocytogenes* na stvaranje biofilma.

- Sistematizovati, statistički obraditi rezultate i uraditi njihovu uporednu analizu.

4. MATERIJAL I METODE

4.1 Prikupljanje uzoraka proizvoda i briseva iz proizvodnog pogona

Proizvodi i uzorci sredine proizvodnog pogona su uzorkovani tokom četvorogodišnjeg perioda od 2011. do 2014. godine. Uzorkovanje proizvoda je izvršeno uz poštovanje principa standarda MEST ISO 7218:2008 Mikrobiologija lanca hrane – Opšti zahtjevi i uputstvo za mikrobiološka ispitivanja. Po pet jedinica proizvodne serije svakog ispitivanog proizvoda je uzorkovano u skladu sa odredbama Pravilnika o mikrobiološkim kriterijumima za bezbjednost hrane (Sl.CG br. 53/12). Uzorci briseva sa površina iz proizvodnog pogona, uzeti su nakon čišćenja, pranja i dezinfekcije, u skladu sa standardom MEST ISO 18593:2004 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalne metode za tehnike uzimanja uzoraka sa površine pomoću kontaktnih ploča i briseva. Uzorci su dostavljani laboratoriji na ispitivanje u roku od do 2 sata od uzorkovanja, a transportovani su u ručnom frižideru na kontrolisanoj temperaturi od 2 °C do 4 °C.

4.2 Mikrobiološke metode

Mikrobiološka ispitivanja su se izvodila uz poštovanje standardne metode MEST EN ISO 7218:2008 Mikrobiologija lanca hrane – Opšti zahtjevi i uputstvo za mikrobiološka ispitivanja. Uzorci su pripremljeni za ispitivanje prema standardu MEST EN ISO 6887-2:2003 Mikrobiologija lanca hrane - Pripremanje uzoraka za ispitivanje, početne suspenzije i decimalnih razblaženja za mikrobiološko ispitivanje - Dio 2: Specifična pravila za pripremanje mesa i proizvoda od mesa. Ispitivanje prisustva *L.monocytogenes* u uzorcima vršeno je u skladu sa standardizovanom metodom MEST ISO/IEC 11290-1:2010. Horizontalna metoda za detekciju *Listeria monocytogenes* - Dio 1: Metoda detekcije i obuhvatilo je sledeće faze:

1. Primarno obogaćenje u selektivnoj tečnoj hranjivoj podlozi uz smanjenu koncentraciju selektivnih inhibitora (1/2 Fraser bujona): 25g uzorka je pomešano sa 225ml polukoncentrovanog Frazer bujona (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) i na taj način

se pripremlilo razblaženje od 1:10. Brisevi su pomešani sa 10ml iste selektivne hranljive podloge. Inkubirani su 25 ± 1 sati na 30°C .

2. Sekundarno obogaćenje u selektivnoj tečnoj hranljivoj podlozi sa punom koncentracijom selektivnih inhibitora (Fraser bujon): 0,1ml primarnog obogaćenja se inokuliše u 10ml Fraser bujona (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). Inokulisani bujon za sekundarno obogaćenje se inkubira 24 časa na 37°C .

3. Zasejavanje na selektivne hranljive ploče iz primarnog obogaćenja: iz primarne bujonske kulture (Fraser $\frac{1}{2}$) inkubirane tokom 25 ± 1 sata pri 30°C , ezom su zasejane površine selektivnih hranljivih podloga: Listeria agar, prema Ottaviani i Agosti (ALOA, Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) i Palcam agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) tehnikom iscrpljenja tako da se dobiju pojedinačne odvojene kolonije.

4. Zasejavanje na selektivne hranljive ploče iz sekundarnog obogaćenja: iz sekundarne bujonske kulture (Fraser bujon) ezom su zasejane površine selektivnih hranljivih podloga: Listeria agar, prema Ottaviani i Agosti (ALOA Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) i Palcam agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) tehnikom iscrpljenja u cilju dobijanja pojedinačnih odvojenih kolonija.

Selektivne ploče zasejane iz oba obogaćenja su inkubirane 24 sata i (ako je porast slab ili je nakon 24 sata izostao) naknadnih 24 ± 2 sata nakon čega su pregledane na prisustvo kolonija karakterističnih morfoloških osobina za *Listeria spp.*

Tipične kolonije *L.monocytogenes* na ALOA podlozi su zeleno-plave, okružene neprozirnom zonom (aureolom). Na Palcam agaru, iste su tamne, veličine oko 2 mm, sa crnom zonom i centralnim ulegnućem. Nakon izolacije karakterističnih kolonija, sledi sprovođenje potvrdnih testova za *L.monocytogenes*.

5. Izolacija i identifikacija: karakteristične kolonije su zasejane na neselektivni tripton agar s ekstraktom soje i kvasca (TSYEA, Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) na način kojim se omogućava porast pojedinačnih kolonija (tehnika iscrpljenja). Ploče sa zasejanim agarom su inkubirane na 37°C tokom 18 do 24 sata. Tipične kolonije *L.monocytogenes* na TSYEA su veličine 1 mm do 2 mm, konveksne, bezbojne i neprozirne sa potpunim rubom. Na svetlosti (veštačkoj ili prirodnoj), pod uglom od približno 45 stepeni, kolonije pokazuju plavo-sivu boju i granularnu površinu.

6. Potvrda *Listeria monocytogenes*: za potvrđne testove su korišćene pojedinačne karakteristične kolonije sa TSYEA uz upotrebu pozitivne i negativne kontrole.

U tabeli 1. su prikazani testovi koji su se izvršili u svrhu dokazivanja *L.monocytogenes* i njihovo tumačenje, a sve u skladu sa MEST ISO/IEC 11290-1:2010.

Tabela 1. Potvrđni testovi za dokazivanje *L.monocytogenes*

Test	<i>L.monocytogenes</i> potvrđni testovi	Rezultati
Obavezni	Mikroskopsko ispitivanje	Sitni tanki kokoidni bacili
	Beta hemoliza	+
	L-Ramnoza	+
	D-Ksilaza	-
Neobavezni – po izboru	Katalaza	+
	Pokretljivost na 25°C	+
	CAMP test	+

Za krajnju potvrdu, korišćeni su komercijalni testovi za biohemijsku identifikaciju *L.monocytogenes* (API Listeria, BioMérieux SA, France), a u skladu sa MEST EN ISO 7218:2008.

4.3 Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilmova

Svi izolati *L.monocytogenes* ispitivani su na sposobnost formiranja biofilma pomoću testa u mikrotitarskim pločicama (The microplate biofilm assay) (Borucki et al., 2003). Svaki izolat je inokulisan u 3 ml TSB (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) i inkubiran na 37°C tokom 18 sati. Sledećeg dana, 20µl svake izolovane suspenzije je inokulisano u bunarčiče (4 bunarića za svaki soj) sterilnog ravnog dna mikrotitarske ploče (Nunc, Roskilde, Danska) sa 150 µl odgovarajućeg hranljivog medijuma: Tripton soja bujona (TSB; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) ili Luria Bertani bujona, (LB; Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) i inkubirano 72h na 30°C. Set od osam bunara ispunjenih samo sa testiranim medijumom je korišćen kao negativna kontrola. Posle inkubacije na 30°C tokom 72h, ploče su isprane tri puta sterilnim slanim rastvorom i ostavljene da se osuše na sobnoj temperaturi. Bakterije pričvršćene za površinu su

fiksirane 20 minuta na sobnoj temperaturi dodavanjem 200 μ l metanola u svaki bunarčić.

Ploče su obojene sa 200 μ l 0.3% vodenog rastvora kristal violeta (Cristal Violet, Fluka) tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Posle bojenja, ploče su isprane pod mlazom tekuće vode tako da na njima nije bilo vidljivog traga mrlje. Boja vezana za bakterije je isprana dodavanjem 200 μ l 96% etanola. Optička gustina (OD) je merena spektrofotometrijski (Labsystems Multiscan® MCC / 340) korišćenjem 595 nm filtera. Granična vrednost optičke gustine (Cut-off optical density; OD_c) je definisana kao tri standardne devijacije iznad srednje OD negativne kontrole.

Sposobnost formiranja biofilмова je nakon inkubacije određivana merenjem optičke gustine (OD) spektrofotometrijski. Na osnovu optičke gustine produkovanih biofilмова, izolati su klasifikovani na sledeći način: izolati koji ne proizvode biofilmove ($OD \leq OD_c$); slabi proizvođači biofilma ($OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$); umereni proizvođači biofilma ($2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$) ili jaki proizvođači biofilma ($4 \times OD_c < OD$) (Stepanovic et al., 2004). Na osnovu rezultata dobijenih iz testa na mikrotitarskim pločama, jedan izolat *L.monocytogenes*, okarakterisan kao dobar proizvođač biofilma, izabran je za vizualizaciju biofilma uz pomoć skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM).

4.4 Vizuelizacija biofilma uz pomoć skenirajućeg elektronskog mikroskopa

Suspenzija izolata pripremljena je u Tripton soja bujonu (TSB; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) i inkubirana 72 sata na 30°C. Za pripremu biofilma korišćeni su kuponi (1cm x 1cm x 1mm) od nerđajućeg čelika. Suspenzija izolata je u količini od 100 μ l inokulisana na površinu kupona i inkubirana tokom 5 dana na temperaturi od 25°C. U intervalima od 24h, na površinu kupona dodavana je odgovarajuća sveža podloga u količini od 100 μ l (kupon nije potapan u podlogu). Posle isteka perioda inkubacije, kupon je ispran pod mlazom sterilnog fiziološkog rastvora, da bi se otklonile nevezane ćelije i ostaci podloge. Inaktivacija bakterija i fiksacija izvedena je potapanjem u 4% rastvor glutaraldehida, preko noći, na temperaturi frižidera. Kupon je dehidriran potapanjem u rastvore etanola rastućih koncentracija: 30%, 50%, 70% i 95%,

u trajanju od 10 minuta, posle čega je osušen na vazduhu. Osuseni preparati napareni su zlatom na uređaju Sputter Coater (radno vreme 100s, korišćena struja 30mA) pre SEM analize (JEOL JSM 6390 LV, Japan).

4.5 Ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove

Ispitivanje antimikrobne osetljivosti je rađeno na svih 20 izolata *L.monocytogenes* pomoću standardnog testa difuzije diska na agaru Mueller Hinton (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK), u skladu sa smernicama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde. Korišćeni su sledeći antibiotici: penicilin (P, 10U), amoksicilin + klavulanska kiselina (AMC, 20/10µg), ampicilin (AMP, 10µg), ceftriakson (CRO, 30µg), cefotaksim (CTKS, 30µg), ciprofloksacin (CIP, 5µg), eritromicin (ERI, 15µg), hloramfenikol (CHL, 30µg), nalidiksična kiselina (NA, 30µg) i trimetoprim + sulfametoksazol (SKST, 1,25/23,75µg) (Bio Rad, Marnes-la-Coquette France).

4.6 Ekstrakcija DNK

Svi sojevi su kultivisani preko noći na 37°C na RAPIDL. Mono agar (Bio-Rad, Beč, Austrija) zarad potvrđivanja vrste. Takođe, izolati su bili subkultivisani i na Columbia krvnom agaru (BioMerieux, Marci l'Etoile, Francuska) pre visoko kvalitetne ekstrakcije DNK pomoću MagAttract HMW DNA kompleta, u skladu sa uputstvima proizvođača (Qiagen, Hilden, Nemačka).

4.7 Sekvenciranje kompletnog genoma i analiza podataka

Biblioteka fragmenata za sekvenciranje je pripremljena korišćenjem Nextera XT chemistry (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Sekvenciranje oba kraja fragmenta u dužini od 300 bp (2x300 bp), uz minimalnu pokrivenost od 70x, prema preporučenim standardnim protokolima, je izvršeno na uređaju Illumina MiSeq. Rezultujuće FASTQ

datoteke su prvo obrađene uklanjanjem sekvenci adaptera, a zatim raspoređene uz pomoć programa Velvet assembler (Zerbino and Birney, 2008), integrisanog u Ridom SeqSphere software (version 3.1; Ridom GmbH, Münster, Germany) (Ruppitsch et al., 2015). Sekvencirani fragmenti su skraćeni na 5' i 3' kraju do postizanja prosečne PHRED vrednosti od 30 na segmentu od 20 baznih parova. Raspoređivanje fragmenata uz pomoć Velvet assembler-a je izvršeno uz k-mer vrednosti i graničnu pokrivenost optimizovane automatski za svaki genom, a zasnovano na prosečnoj dužini fragmenata do >1000 bp. Fragmenti dužine manje od 200 bp ili pokrivenosti manje od 5 su isključeni iz analize. Genomi sastavljeni od sekvenciranih fragmenata su upoređeni sa nedavno definisanom MLST šemom esencijalnog genoma, koristešćenjem SeqSphere+ (Ruppitsch et al., 2015). Minimalno razapinjuće stablo je prikazano u SeqSphere+ i obojeno u InkScape v. 0.91.

Određivanje serogrupe je izvršeno uz pomoć informacija dobijenih sekvenciranjem kompletnog genoma (Hyden et al., 2016) i uz pomoć petostrukog PCR-a (Doumith et al., 2004). Korišćenjem The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (McArthur et al., 2013) identifikovani su geni antimikrobne rezistencije. Sekvencioniranjem celokupnog genoma, obezbedile su se i informacije o profilima gena odgovornih za antibiotsku rezistenciju. U svrhu određivanja potencijala antimikrobne rezistencije, karakteristični proteini su analizirani u odnosu na sveobuhvatnu bazu antibiotske rezistencije (Comprehensive Antibiotic Resistance Database - CARD) uz pomoć BLASTp programa (programa za upoređivanje nukleotidnih ili proteinskih sekvenci sa sekvencama iz baza podataka i proračun statističke značajnosti njihovog podudaranja).

Svi dobijeni podaci su dostavljeni Evropskom arhivu nukleotida (<http://www.ebi.ac.uk/ena/>) pod pristupnim brojevima: 3003770 i 3000198.

4.8 PCR-skrining na prisustvo markera za otpornost na dezinficijense: Tn6188 i brcABC

Svih 20 izolata *L. monocytogenes* je ispitano na prisustvo transpozona Tn6188 koji se odnosi na toleranciju na benzalkonijum hlorid (BC). Korišćeni su PCR prajmeri

dizajnirani na osnovu dostupnosti sekvence za transpozon Tn6188 u genomu *L.monocytogenes* i to konkretno za ciljani *qacH* gen i *radC* gene u okviru kojeg je inkorporiran Tn6188 transpozon (Muller et al., 2013). PCR uslovi su bili podešeni na sledeći način: 0.2 pmol/ml od svakog prajmera, 2 mM MgCl₂, 1 mM dNTP-Miks, 0.625U Platinum Taq DNK polimeraze (Life Technologies). Ciklusi PCR su bili sledeći: početna denaturacija 5 min na 95°C; umnozavanje DNK fragmenata u 30 ciklusa na 94°C za 40s, vezivanje prajmera na 56°C tokom 40s i elongacija na 72°C (za *qacH* 25s; za *radC* 165s); konačno elongacija na 72°C tokom 5 min. Veličine analiziranih fragmenata su određivane upoređivanjem dužine puta sa DNK fragmentima pozitivne kontrole referentnog soja *L. monocytogenes* ATCC 6179. Elektroforeza PCR produkata je rađena na horizontalnim agaroznim gelovima uz dodavanje SYBR Safe (Life Technologies) ili etidijum bromid boje.

Istih 20 sojeva je, takođe, pregledano na prisustvo *bcrABC* markera otpornosti uz korišćenje BcF5 i BcR prajmera za target *bcrABC* gene (Muller et al., 2013). PCR uslovi su bili kao i gore opisani uslovi uz upotrebu temperature za vezivanje prajmera od 62°C i elongacije tokom 45s. Dobijeni PCR proizvodi su sekvencirani pomoću LGC Genomics.

4.9. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada dobijenih rezultata urađena je u softveru MINITAB, verzija 16.0, kao i u statističkom paketu PrismaPad 6.00.

“Box plots” analiza je korišćena da ilustruje srednje vrednosti merenja, kao i razlike u dobijenim rezultatima o sposobnosti formiranja biofilmova izolata *L.monocytogenes*, uzgajanih u različitim (TSB i LB) medijumima.

5. REZULTATI

5.1 Prikupljanje uzoraka

Proizvodni pogon za preradu mesa u kom je vršeno uzorkovanje proizvoda i briseva sa površina je manjeg proizvodnog kapaciteta, sa godišnjim obimom prerade mesa do 100 tona. Celokupan proizvodni proces se zasniva na tradicionalnom načinu proizvodnje proizvoda od svinjskog mesa, karakterističnih za područje podlovcenske regije: Njeguškog pršuta, suve pancete, suvog vrata, suve pečenice i tradicionalno pripremljene Njeguške kobasice.

Za period od 2011. do 2014. godine prikupljeno je ukupno 671 uzoraka iz ovog pogona i to 531 proizvod i 140 briseva površina, uzorkovanih u poslednjem kvartalu svake godine, kada se i obavlja proizvodnja prema tradicionalnom načinu pripreme proizvoda. U Tabeli 2. je prikazan obim i vrsta uzoraka po godinama uzorkovanja i ispitivanja.

Tabela 2. Vrste i obim uzoraka

Godina uzorkovanja	2011	2012	2013	2014	Σ
Njeguška suva kobasica	18	20	34	18	90
Suva pečenica	25	32	10	20	87
Njeguški pršut	82	77	15	15	189
Suva panceta	15	16	30	25	86
Suvi vrat	22	17	10	30	79
Brisevi površina	40	58	22	20	140
Σ	202	220	121	128	671

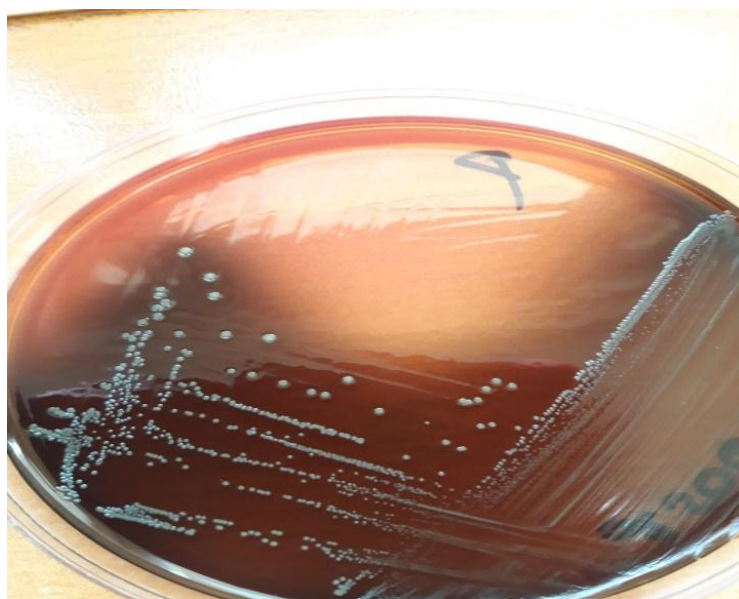
5.2 Izolacija i detekcija *L.monocytogenes*

Uzorci prikupljeni tokom četvorogodišnjeg perioda uzorkovanja, ispitivani su prema MEST ISO/IEC 11290-1:2010. Horizontalna metoda za detekciju *Listeria monocytogenes* – Deo 1: Metoda detekcije. U skladu sa metodom, sumnjive kolonije karakterističnog rasta na selektivnim čvrstim podlogama, prenesene su na neselektivni tripton agar s ekstraktom soje i kvasca i sa njega rađeni dodatni testovi potvrde.



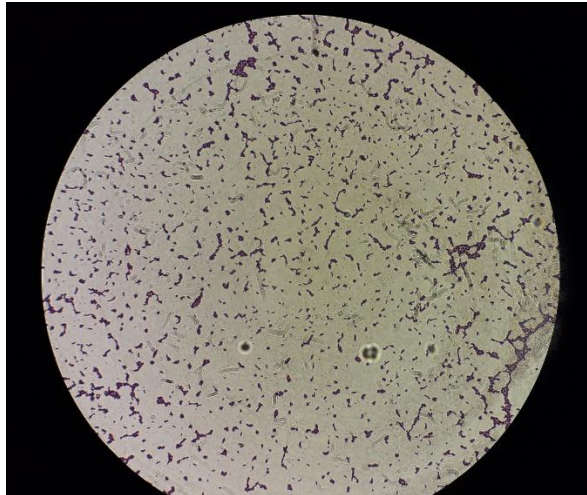
Slika 5. Izgled kolonija *L.monocytogenes* na selektivnoj podlozi ALOA

Na ALOA podlozi, kolonije *L.monocytogenes* se prepoznaju kao sjajne, zelenoplave kolonije, pravilnih ivica, okružene neprozirnom zonom. Na PALCAM agaru, iste su tamne, sjajne, pravilnih ivica, veličine oko 2 mm, s crnom zonom i centralnim ulegnućem. Rastom na PALCAM agaru, menjaju njegovu boju iz crvene u tamno smeđu (Slike 5. i 6.).



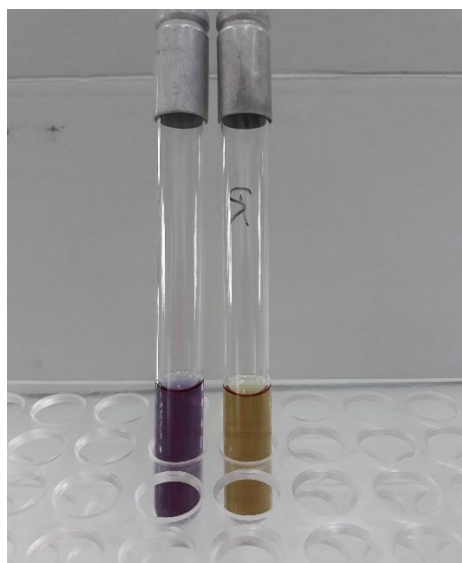
Slika 6. Izgled kolonija *L.monocytogenes* na selektivnoj podlozi PALCAM

U cilju identifikacije, od karakteristične kolonije je napravljen mikroskopski preparat obojen po Gramu. Posmatrane pod mikroskopom, ćelije *L.monocytogenes* su sitni, tanki, Gram-pozitivni kokoidni štapići, pojedinačni, ređe vezani u diploforme i kraće lance (Slika 7.).



Slika 7. Izgled ćelija *L.monocytogenes* pod svetlosnim mikroskopom

U katalaza testu, *L.monocytogenes* daje pozitivnu reakciju. Inkubirana na 25°C u agaru za ispitivanje pokretljivosti, *L.monocytogenes* pokazuje pokretljivost što se evidentira pojavom tvorevine nalik kišobranu u ispitivanoj epruveti sa inokulisanim hranljivim medijumom. U testu iskorišćenja ugljenih-hidrata, samo *L.monocytogenes* od svih drugih vrsta roda *Listeria* daje pozitivan rezultat na test fermentacije D-ramnoze i negativan rezultat na test fermentacije D-ksiloze (Slika 8.).



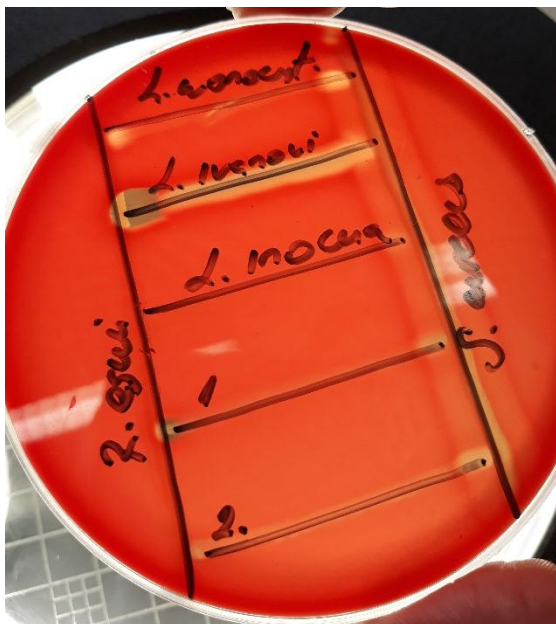
Slika 8. Fermentacija D-ramnoze i D-ksiloze od strane *L.monocytogenes*

L.monocytogenes na krvnom agaru stvaraju usku, jasnu, prozirnu zonu hemolize (β -hemoliza) (Slika 9.).

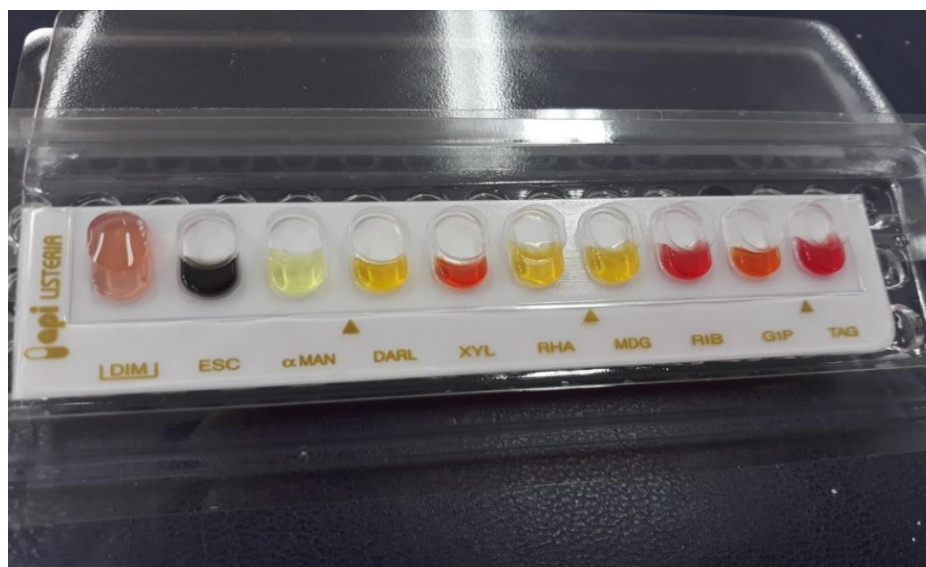


Slika 9. Hemoliza *L.monocytogenes*

CAMP test se preporučuje radi jasne potvrde da je hemoliza posledica aktivnosti listeriolizina. Pojačana zona β -hemolize na preseku ispitujućih sojeva sa svakom od kultura *S.aureus* i *R.equi* se smatra pozitivnom reakcijom (Slika 10).

Slika 10. CAMP test za *L.monocytogenes*

Kao krajnja potvrda u identifikaciji izolata korišćen je komercijalni test za biohemijsku identifikaciju *L.monocytogenes* (API Listeria, BioMérieux SA, France) (Slika 11.).



Slika 11. Rezultat API Listeria

Za period od 2011. do 2014. godine, u toku kojeg se vršilo uzorkovanje, iz posmatranog pogona, kao i proizvoda od mesa poreklom iz pomenutog pogona, od ukupno 671 ispitanog uzorka, primenom navedene standardizovane metode, izolovano

je 20 (2,98%) izolata *L.monocytogenes* i to njih 18 (3,39%) iz uzoraka proizvoda od mesa i 2 izolata iz briseva sa površina proizvodnog pogona za preradu mesa (1,43%). U tabeli 3. su prikazane oznake izolata, njihovo poreklo i godina uzorkovanja.

Tabela 3. Oznake pozitivnih izolata, poreklo i godina uzorkovanja

Redni broj	Oznaka izolata	Poreklo	Godina uzorkovanja
1.	152/1	Suva domaća kobasica	2013.
2.	152/3	Suva domaća kobasica	2013.
3.	256/2	Mleveni fil iz topa za punjenje kobasica	2013.
4.	256/3	Mleveni fil iz mešalice	2013.
5.	256/4	Gotova sveza kobasica iz topa za oblikovanje	2013.
6.	256/5	Crnogorska suva kobasica	2013.
7.	328/1	Suva panceta - rezana	2013.
8.	728/49	Domaća kobasica	2012.
9.	728/50	Panceta - komad	2012.
10.	728/51	Rezani pršut	2012.
11.	1208	Suva pečenica	2013.
12.	2018/1-5	Suva pečenica	2014.
13.	2019/1-5	Suva panceta	2014.
14.	2020/1-5	Suvi vrat	2014.
15.	2052/43	Suvi vrat	2014.
16.	3564/3	Domaća kobasica	2011.
17.	3565/7	Bris daske za piježenje usoljene pršute	2011.
18.	3565/15	Bris poda u prostoriji za soljenje	2011.
19.	3356/1	Pršut rezani	2011.
20.	3356/4	Pršut seckani	2011.

5.3 Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma izolata *L.monocytogenes*

Ispitivanjem sposobnosti formiranja biofilma pomoću testa na mikrotitarskim pločama, utvrđeno je da svih 20 izolata *L.monocytogenes* formiraju biofilme. Uočena je varijabilnost u formiranju biofilмова unutar kompleksa, ali varijacije u kapacitetu formiranja biofilma na nivou serogrupe nisu primećene (Tabela 4.).

Tabela 4. Oznake i poreklo izolata *L.monocytogenes*, sposobnost formiranja biofilma i srednja vrednost optičke gustine

Redni broj	Poreklo	Sposobnost formiranja biofilma	Srednja OD \pm SD*	Godina uzorkovanja
1.	Suva domaća kobasica	snažna ¹	0,724 \pm 0029	2013.
2.	Suva domaća kobasica	snažna ¹	0,738 \pm 0055	2013.
3.	Mleveni fil iz topa za punjenje kobasica	snažna ¹	0,707 \pm 0066	2013.
4.	Mleveni fil iz mešalice	umerena ²	0,386 \pm 0032	2013.
5.	Gotova sveza kobasica iz topa za oblikovanje	umerena ²	0,467 \pm 0042	2013.
6.	Crnogorska suva kobasica	umerena ²	0,577 \pm 0024	2013.
7.	Suva panceta – rezana	umerena ²	0,542 \pm 0051	2013.
8.	Domaća kobasica	umerena ²	0,417 \pm 0056	2012.
9.	Panceta – komad	umerena ²	0,331 \pm 0054	2012.
10.	Rezani pršut	umerena ²	0,408 \pm 0053	2012.
11.	Suva pečenica	snažna ¹	0,704 \pm 0073	2013.
12.	Suva pečenica	umerena ²	0,472 \pm 0057	2014.
13.	Suva pancetta	umerena ²	0,555 \pm 0065	2014.
14.	Suvi vrat	umerena ²	0,380 \pm 0026	2014.
15.	Suvi vrat	umerena ²	0,357 \pm 0101	2014.
16.	Domaća kobasica	umerena ²	0,404 \pm 0056	2011.
17.	Bris daske za piježenje usoljene pršute	umerena ²	0,377 \pm 0043	2011.
18.	Bris poda u prostoriji za soljenje	umerena ²	0,361 \pm 0049	2011.

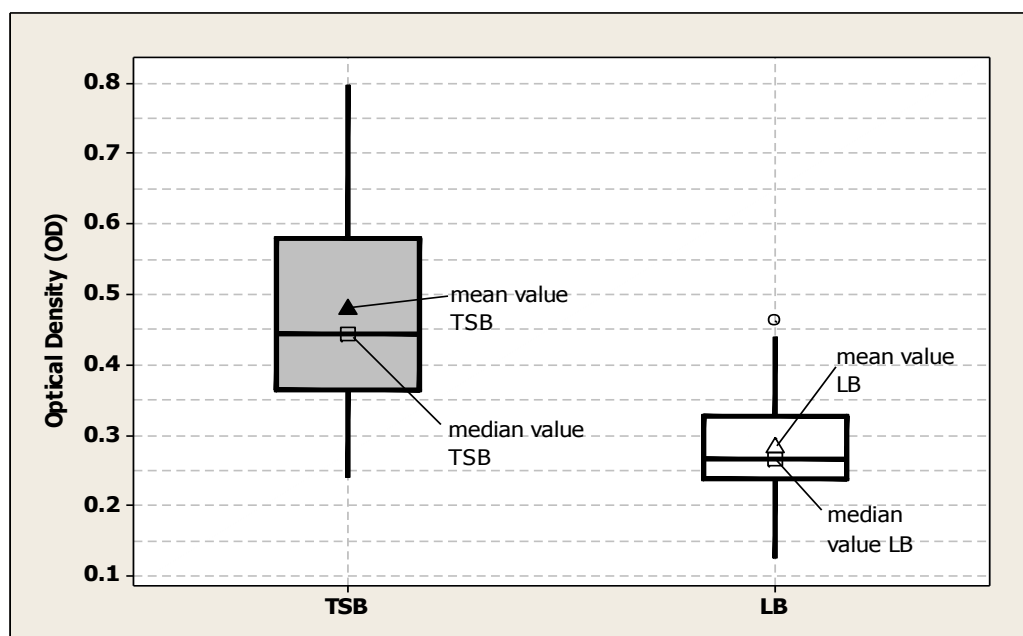
19.	Pršut rezani	umerena ²	0,410 ± 0036	2011.
20.	Pršut seckani	umerena ²	0,333 ± 0019	2011.

* Vrednosti optičke gustine su prikazane za Tripton sojin bujon (TSB) inkubiran 72 h na 30 °C; ODc (TSB) = 0,161.

¹ Snažni proizvođač biofilma: OD > 0.644.

² Umereni proizvođač biofilma: 0.322 < OD ≤ 0.644.

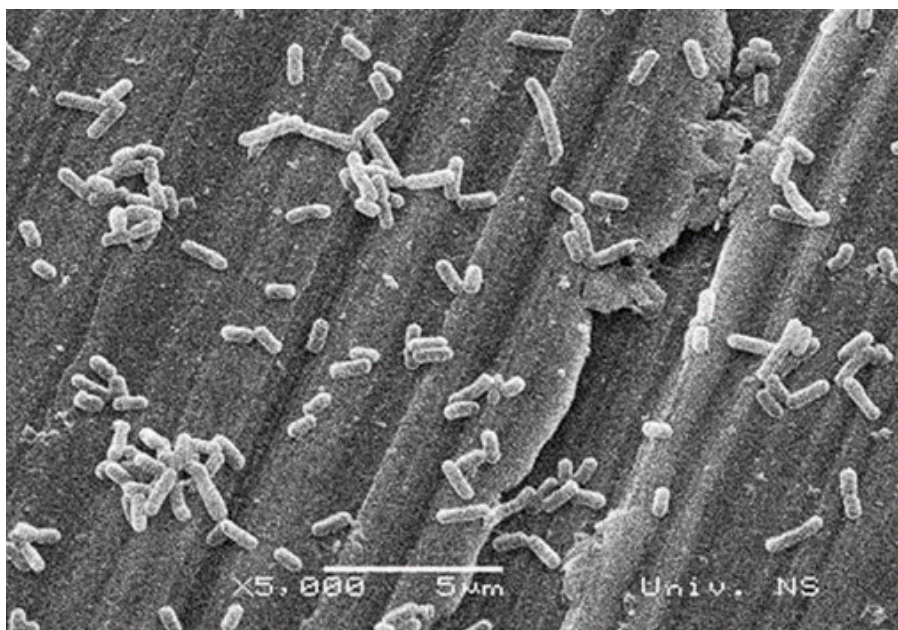
Rezultati istraživanja su pokazali snažan uticaj hranljivih materija iz medijuma na proizvodnju biofilma *L.monocytogenes*. Statistička analiza rezultata izvršena je softverskim paketom MINITAB, verzija 16.0. Koncentracije su bile izražene kao srednje vrednosti, standardne devijacije, medijana i minimum-maksimum opseg. Za procenu statističkih razlika ispitivanih promenljivih između dve grupe analiziranih uzoraka korišćen je t-test za dva uzorka i interval pouzdanosti. Primećene su značajne razlike između dve grupe izolata ($p = 0,000$; $p < 0,05$) u njihovoj sposobnosti da formiraju biofilmove. “Box plots” analiza je korišćena da ilustruje srednje vrednosti merenja, kao i razlike u dobijenim rezultatima o sposobnosti formiranja biofilmova izolata *L.monocytogenes*, uzgajanih u TSB i LB medijumima (Slika 12.).



Slika 12. “Box plot” dijagram formiranja biofilma 20 izolata *L. monocytogenes* uzgajanih u TSB i LB medijumu.

5.4 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Odabrani izolat (152/1, izolovan iz suve kobasice), identifikovan kao jak proizvođač biofilma, nije bio u stanju da formira biofilm na nerđajućem čeliku (slika 13.). Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je na površini nerđajućeg čelika zabeležila pojedinačne ćelije i diplo-forme V ili Y oblika nakon inkubacije izolata *L. monocytogenes* u TSB u trajanju od 72h na 30°C (JEOL JSM 6390 LV, Japan).



Slika 13. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) izolata *L.monocytogenes*

5.5. Ispitivanje osetljivosti na antibiotike izolata *L.monocytogenes*

Svih 20 izolata *L.monocytogenes* je u disk difuznom testu pokazalo osetljivost na antibiotike sa terapijskom ulogom u lečenju listerioze: penicilin, amoksicilin + klavulanska kiselina, ampicilin, ciprofloksacin, eritromicin, hloramfenikol i trimetoprim + sulfametoksazol. Sa druge strane, kod istih izolata *L.monocytogenes* evidentirana je rezistencija na dejstvo cefalosporina (ceftriakson i cefotaksim) i nalidiksične kiseline (Tabela 5.). Ni jedan od ispitivanih izolata oko diska sa nalidiksičnom kiselinom (Bio Rad, Marnes-la-Coquette France) nije formirao zonu inhibicije. Da bi se potvrdila osetljivost izolata na ceftriakson i cefotaksim (Bio Rad, Marnes-la-Coquette France),

prema uputstvu proizvođača, potrebno je da zone inhibicije budu veće ili jednake: za ceftriakson (30 μ g) \geq 21mm i za cefotaksim (30 μ g) \geq 23mm. Kako u vodiču Instituta za standarde kliničkih laboratorija (CLSI-Clinical Laboratory Standard Institute) nisu opisane zone rezistencije za listeriju, u tumačenju rezultata testa antimikrobne osetljivosti korišćen je vodič za određivanje osetljivosti bakterija iz roda *Streptococcus* na antibiotike.

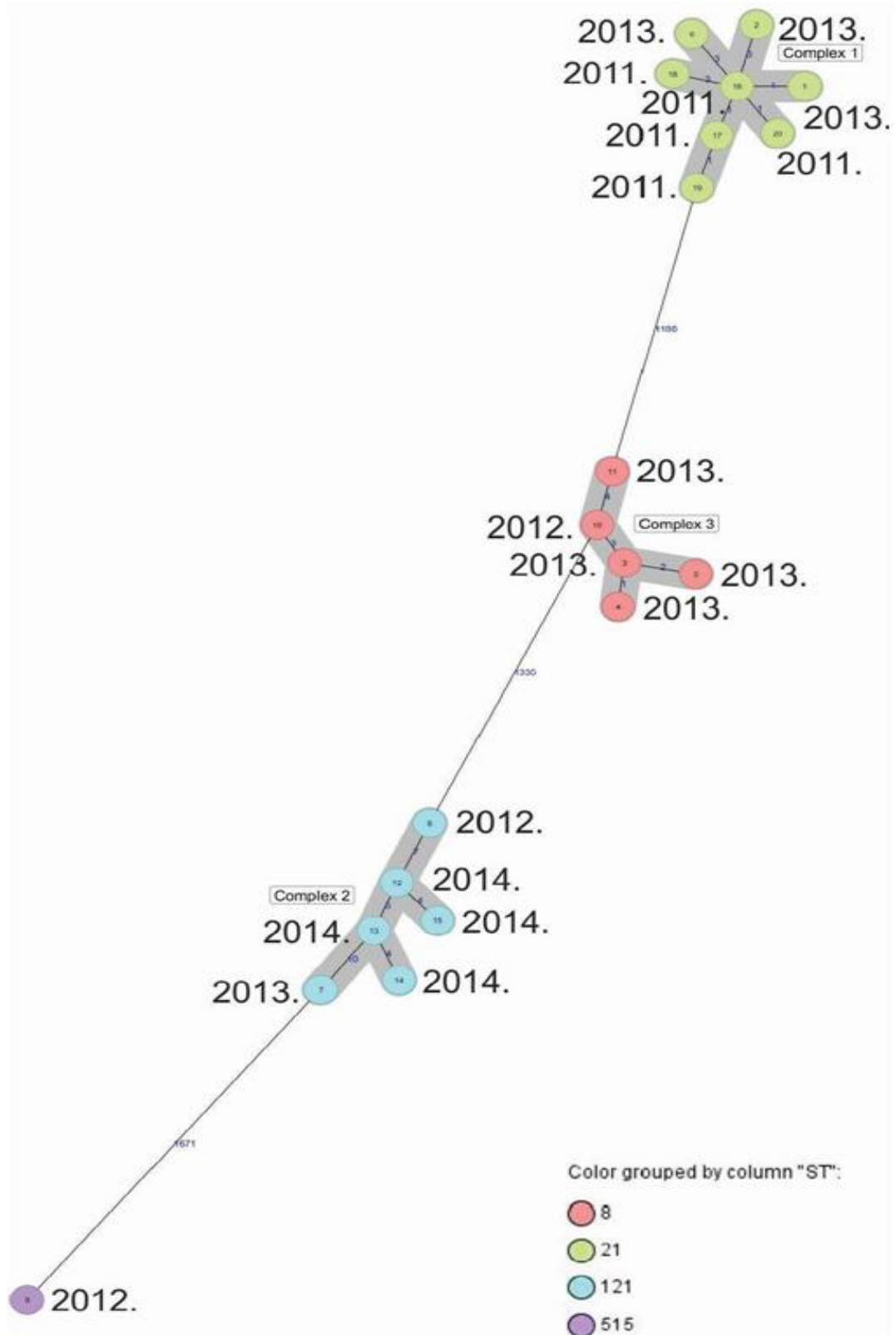
Tabela 5. Rezultati testa difuzije diska na agaru

R.br.	P	AMP	AMC	CRO	CTX	VAN	NAL	CIP	ERY	CHL	SXT
1.	30	31	33	19	21	23	R	25	35	31	40
2.	30	27	33	17	18	23	R	25	35	32	40
3.	27	30	32	14	14	23	R	22	29	30	33
4.	30	32	34	18	13	23	R	23	31	30	39
5.	30	30	31	16	13	20	R	20	32	27	38
6.	27	29	30	17	15	21	R	24	34	24	39
7.	30	31	32	14	13	24	R	22	35	28	38
8.	30	31	35	19	17	23	R	22	34	35	40
9.	28	27	29	17	17	20	R	21	31	31	39
10.	28	31	34	17	16	23	R	25	37	35	40
11.	29	29	31	19	13	20	R	21	33	30	38
12.	29	31	35	16	11	24	R	20	32	28	40
13.	27	32	35	15	13	22	R	25	31	29	40
14.	30	30	36	17	13	21	R	22	33	29	38
15.	30	31	33	17	15	22	R	24	32	31	39
16.	30	30	32	18	16	23	R	22	30	29	38
17.	29	30	34	19	16	21	R	24	31	31	39
18.	28	32	36	17	15	20	R	23	34	33	40
19.	28	31	32	19	17	23	R	20	32	34	40
20.	28	29	33	19	17	23	R	22	33	29	38

5.6 Sekvenciranje kompletnog genoma izolata *L.monocytogenes*

Metodom sekvenciranja kompletnog genoma, na osnovu sedam konstitutivnih (eng. *housekeeping*) gena (*abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh* i *lhkA*). utvrđeno je da ispitivani izolati *L.monocytogenes* potiču iz četiri tipa sekvence (ST515, ST8, ST21, ST121), grupisane u četiri glavna klonalna kompleksa (CC1, CC8, CC21, CC121).

Na Slici 14. su grafički prikazani rezultati metode tipizacije multilokusnih sekvenci “core” genoma (eng. Core genome multilocus the sequence typing – cgMLST) izolata *L.monocytogenes*. Svaki krug predstavlja alelni profil zasnovan na analizi sekvenci 1701 gena. Na povezujućim linijama prikazanog stabla minimalnog račvanja (eng. Minimum spanning tree - MST) upisani su brojevi koji ilustruju broj ciljnih gena sa različitim alelima. Izolati koji pripadaju jednom klasteru svrstani su u "kompleks" srodnih genotipova (≤ 10 alela razlike) i na slici osijenčeni sivom bojom. Izolati grupisani u okviru istog tipa sekvence su prikazani istom bojom sa naznakom godine njihove izolacije.



Slika 14. Stablo minimalnog račvanja nastalo cgMLST analizom alelskih profila 20 izolata *L.monocytogenes*

Kompleks 1, najveći kompleks, čine izolati iz serogrupe IIa (linija II), klaster tipa CT5746, tipa sekvence ST21 i klonalnog kompleksa CC21. Unutar ovog kompleksa se nalaze izolati koji se međusobno razlikuju sa maksimalnom alelskom razlikom u tri gena. Izolati *L. monocytogenes* koji pripadaju tipu sekvence ST21 su izolovani iz suve kobasice, pršute i briseva proizvodnog pogona, uzorkovanih tokom 2011. i 2013. godine. Dva izolata *L. monocytogenes*, poreklom od briseva iz proizvodnog pogona, od njih 140 koliko ih je ukupno bilo uzorkovano tokom četvorogodišnjeg perioda, genetski su identična i izolovani su sa daske za presovanje usoljene pršute i sa poda u prostoriji za soljenje pršute, tokom 2011. godine.

Kompleks 2 sadrži izolate koji pripadaju serograpi IIa (linija II), klaster tipovima CT5747 i CT5750, tipu sekvence ST121 i klonalnom kompleksu CC121. Ovim kompleksom su obuhvaćeni izolati sa maksimalnom alelskom razlikom u deset gena. Izolati koji formiraju ovaj kompleks, potiču iz suve kobasice, suve pancete, suve pečenice i suvog vrata. Uzorkovani su u periodu od 2012. do 2014. godine.

Kompleks 3 sadrži izolate serogrupe IIa (linija II), različite tipove klastera: CT295, CT1358 i CT5748, tip sekvence ST8 i klonalni kompleks CC8. Izolati unutar ovog kompleksa se razlikuju maksimalnom alelskom razlikom četiri gena. Pršut, suva kobasica, mleveni fil za punjenje kobasica i suva pečenica su proizvodi iz kojih su izolovane *L.monocytogenes* iz kompleksa 3 sa tipom sekvence ST8.

Od svih ispitivanih izolata, samo jedan je pripadao klaster tipu CT5749, tip sekvence ST515, klonalni kompleks CC1, bio je PCR-pozitivan za serogrupu IVb (linija D). *L.monocytogenes* iz IVb serogrupe je izolovana iz suve pečenice u komadu, 2012. godine.

5.7. Identifikacija gena rezistencije na antimikrobne lekove

Sekvencioniranjem celokupnog genoma, obezbedile su se i informacije o profilima gena odgovornih za antibiotsku rezistenciju. U svrhu određivanja potencijala antimikrobne rezistencije, karakteristični proteini su analizirani u odnosu na sveobuhvatnu bazu antibiotske rezistencije (Comprehensive Antibiotic Resistance Database - CARD) uz pomoć BLASTp programa (programa za upoređivanje

nukleotidnih ili proteinskih sekvenci sa sekvencama iz baza podataka i proračunu statističke značajnosti njihovog podudaranja).

Izolati unutar kompleksa 1 (CC21) su se karakterisali posedovanjem dva gena za enzime koji modifikuju ciljna mesta delovanja antibiotika na ćelijskom zidu: *mprF* gen koji kodira enzim zadužen za promenu naelektrisanja ćelijskog zida i *fosX* gen - za enzim koji određuje rezistenciju na fosfomicin. Navedene gene su takođe posedovali i izolati svrstani u okviru kompleksa 2 (CC121). Izolati *L.monocytogenes*, svrstane u okviru kompleksa 3 (CC8), posedovali su samo *mprF* gen antimikrobne rezistencije, a prisustvo ovog gena je ustanovljeno i kod jedinog izolata *L.monocytogenes* koji je pripadao *IVb* serograpi i kompleksu CC1.

Izolati unutar kompleksa 1 (CC21) se karakterišu posedovanjem dva gena za enzime koji modifikuju ciljna mesta delovanja antibiotika na ćelijskom zidu: *mprF* gen kodira enzim koji vrši promenu naelektrisanja ćelijskog zida i *fosX* gen za enzim koji određuje rezistenciju na fosfomicin. Navedene enzime poseduju i izolati u okviru kompleksa 2 (CC121). Izolovane *L.monocytogenes*, svrstane u okviru kompleksa 3., poseduju samo *mprF* gen antimikrobne rezistencije. Navedene gene su takođe posedovali i izolati svrstani u okviru kompleksa 2 (CC121). Izolati *L.monocytogenes*, svrstane u okviru kompleksa 3 (CC8), posedovali su samo *mprF* gen antimikrobne rezistencije, a prisustvo ovog gena je ustanovljeno i kod jedinog izolata *L.monocytogenes* koji je pripadao *IVb* serograpi i kompleksu CC1 (Tabela 6).

Tabela 6. Izolati *L. monocytogenes* sa navodima njihovog porekla, godine izolacije, antimikrobne rezistencije, ARO pristupnog broja i tipa sekvence

Br.	Poreklo	AMR	ARO Kategorija	ARO br. pristupa	Tip sekvence
1	Suva domaća kobasica	<i>mprF</i>	Enzim izmene mesta vezivanja antibiotika	3003770	(ST)21
2	Suva domaća kobasica	<i>mprF</i>	Enzim izmene mesta vezivanja antibiotika	3003770	(ST)21
3	Mleveni fil iz topa za punjenje kobasica	<i>mprF</i>	Enzim izmene mesta vezivanja antibiotika	3003770	(ST)8
4	Mleveni fil iz mešalice	<i>mprF</i>	Enzim izmene mesta vezivanja antibiotika	3003770	(ST)8

5	Gotova sveža kobasica iz topa za oblikovanje	<i>mprF</i>	Enzim izmene mesta vezivanja antibiotika	3003770	(ST)8
6	Crnogorska suva kobasica	<i>mprF</i>	Enzim izmene mesta vezivanja antibiotika	3003770	(ST)21
7	Suva panceta - rezana	<i>mprF</i>	Enzim izmene mesta vezivanja antibiotika	3003770	(ST)121
8	Domaća kobasica	<i>fosX</i>	Detreminanta rezistencije na fosfomicin	3000198	(ST)121
9	Panceta - komad	<i>mprF</i>	Enzim izmene mesta vezivanja antibiotika	3003770	(ST)515
10	Rezani pršut	<i>mprF</i>	Enzim izmene mesta vezivanja antibiotika	3003770	(ST)8
11	Suva pečenica	<i>mprF</i>	Enzim izmene mesta vezivanja antibiotika	3003770	(ST)8
12	Suva pečenica	<i>fosX</i>	Detreminanta rezistencije na fosfomicin	3000198	(ST)121
13	Suva panceta	<i>fosX</i>	Detreminanta rezistencije na fosfomicin	3000198	(ST)121
14	Suvi vrat	<i>mprF</i>	Enzim izmene mesta vezivanja antibiotika	3003770	(ST)121
15	Suvi vrat	<i>mprF</i>	Enzim izmene mesta vezivanja antibiotika	3003770	(ST)121
16	Domaća kobasica	<i>mprF</i>	Enzim izmene mesta vezivanja antibiotika	3003770	(ST)21
17	Bris daske za piježenje usoljene pršute	<i>mprF</i>	Enzim izmene mesta vezivanja antibiotika	3003770	(ST)21
18	Bris poda u prostoriji za soljenje	<i>mprF</i>	Enzim izmene mesta vezivanja antibiotika	3003770	(ST)21
19	Pršut rezani	<i>fosX</i>	Detreminanta rezistencije na fosfomicin	3000198	(ST)21
20	Pršut seckani	<i>fosX</i>	Detreminanta rezistencije na fosfomicin	3000198	(ST)21

5.8 PCR-skrining na prisustvo markera za otpornost na dezinficijense: Tn6188 i *brcABC*

PCR skringom svih 20 izolata *L.monocytogenes* na prisustvo Tn6188 i *brcABC* markera rezistencije na dezinficijense, dobijeni su rezultati prikazani u tabeli 7.

Tako, transpozon Tn6188 poseduje šest izolata iz klonalnog kompleksa CC121, sekvencionog tipa ST121, koji su na osnovu PCR-a klasifikovani u serogrupu IIa. Transpozon Tn6188 je izgrađen od gena za tri transpozaze (tnpABC), kao i (*tetR*), (*QacH*) i (*SMR*) gena rezistencije. Detekcijom ovih gena kod šest izolata *L.monocytogenes* potvrđeno je prisustvo transpozona Tn6188 u njihovim genomima. Geni svrstani u *brcABC* kasetu, odgovorni za plazmid-vezanu genetsku karakteristiku otpornosti prema kvaternarnim amonijum solima, nisu detektovani (Tabela 7., Prilog I).

Tabela 7. Molekularna karakterizacija izolata sa nekim markerima rezistencije na dezinficijense

ID	ST	Klaster tip	Sero grupa	CC	Profil	<i>abcZ</i>	<i>bglA</i>	<i>cat</i>	<i>dapE</i>	<i>dat</i>	<i>ldh</i>	<i>lhkA</i>
1	21	5746	IIa	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	7	7	3	10	5	6	1
2	21	5746	IIa	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	5	6	3	10	5	6	1
3	8	295	IIa	CC8	5, 6, 2, 9, 5, 3, 1	5	6	2	9	5	3	1
4	8	1358	IIa	CC8	5, 6, 2, 9, 5, 3, 1	5	6	2	9	5	3	1
5	8	1358	IIa	CC8	5, 6, 2, 9, 5, 3, 1	7	7	2	9	5	3	1
6	21	5746	IIa	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	7	6	3	10	5	6	1
7	121	5747	IIa	CC121	7, 6, 8, 8, 6, 37, 1	7	6	8	8	6	37	1
8	121	5750	IIa	CC121	7, 6, 8, 8, 6, 37, 1	3	1	8	8	6	37	1
9	515	5749	IVb	CC1	3, 1, 1, 39, 3, 1, 3	5	6	1	39	3	1	3
10	8	5748	IIa	CC8	5, 6, 2, 9, 5, 3, 1	5	6	2	9	5	3	1
11	8	1358	IIa	CC8	5, 6, 2, 9, 5, 3, 1	7	6	2	9	5	3	1
12	121	5750	IIa	CC121	7, 6, 8, 8, 6, 37, 1	7	6	8	8	6	37	1
13	121	5747	IIa	CC121	7, 6, 8, 8, 6, 37, 1	7	6	8	8	6	37	1
14	121	5750	IIa	CC121	7, 6, 8, 8, 6, 37, 1	7	6	8	8	6	37	1
15	121	5750	IIa	CC121	7, 6, 8, 8, 6, 37, 1	7	7	8	8	6	37	1
16	21	5746	IIa	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	7	7	3	10	5	6	1
17	21	5746	IIa	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	7	7	3	10	5	6	1
18	21	5746	IIa	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	7	7	3	10	5	6	1

19	21	5746	Ila	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	7	7	3	10	5	6	1
20	21	5746	Ila	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	7	7	3	10	5	6	1

ST: Sekvencioni tip; CC: Klonalni kompleks; *abcZ* (ABC transporter), *bglA* (beta-glukozidaza), *cat* (katalaza), *dapE* (sukcinil diaminopimelat desukcinilaza), *dat* (D-amino acid aminotransferaza), *ldh* (laktat dehidrogenaza), *lhkA* (histidin kinaza)

ID	ST	Klaster tip	Serogrupa	CC	<i>brcA</i>	<i>brcB</i>	<i>brcC</i>	<i>tetR</i>	<i>qacH</i>	<i>tnpC</i>	<i>tnpB</i>	<i>tnpA</i>
1	21	5746	Ila	CC21	-	-	-	-	-	-	-	-
2	21	5746	Ila	CC21	-	-	-	-	-	-	-	-
3	8	295	Ila	CC8	-	-	-	-	-	-	-	-
4	8	1358	Ila	CC8	-	-	-	-	-	-	-	-
5	8	1358	Ila	CC8	-	-	-	-	-	-	-	-
6	21	5746	Ila	CC21	-	-	-	-	-	-	-	-
7	121	5747	Ila	CC121	-	-	-	+	+	+	+	+
8	121	5750	Ila	CC121	-	-	-	+	+	+	+	+
9	515	5749	IVb	CC1	-	-	-	-	-	-	-	-
10	8	5748	Ila	CC8	-	-	-	-	-	-	-	-
11	8	1358	Ila	CC8	-	-	-	-	-	-	-	-
12	121	5750	Ila	CC121	-	-	-	+	+	+	+	+
13	121	5747	Ila	CC121	-	-	-	+	+	+	+	+
14	121	5750	Ila	CC121	-	-	-	+	+	+	+	+
15	121	5750	Ila	CC121	-	-	-	+	+	+	+	+
16	21	5746	Ila	CC21	-	-	-	-	-	-	-	-
17	21	5746	Ila	CC21	-	-	-	-	-	-	-	-
18	21	5746	Ila	CC21	-	-	-	-	-	-	-	-
19	21	5746	Ila	CC21	-	-	-	-	-	-	-	-
20	21	5746	Ila	CC21	-	-	-	-	-	-	-	-

ST: Sekvencioni tip; CC: Klonalni kompleks; *bcrABC* (benzalkonium hlorid kasetna rezistencije), *tetR* (transkripcijski regulator), *qacH* (protein rezistencije na kvaternarna amonijum jedinjenja), *tnpABC* (transpozaze), + prisutan; - odsutan.

6. DISKUSIJA

6.1 Prikupljanje izolata *L.monocytogenes*

U toku četvorogodišnjeg perioda praćenja prisustva *L.monocytogenes* u pogonu za proizvodnju tradicionalnih proizvoda od mesa, izvršena je analiza 671 uzorka ukupno. Od ukupno 531 ispitanih uzorka različitih proizvoda od mesa iz posmatranog proizvodnog pogona, u njih 18 je, primenom standardizovane metode MEST ISO/IEC 11290-1:2010, ustanovljeno prisustvo *L.monocytogenes*. Analizirani tradicionalno pripremljeni proizvodi od mesa, se ubrajaju u kategoriju proizvoda spremnih za konzumiranje (RTE). To znači da se ovi proizvodi najčešće pre konzumacije ne podvrgavaju termičkoj obradi, te da nema primene visoke temperature koja bi, eventualno prisutnu *L.monocytogenes*, mogla eliminisati. Prevalenca *L.monocytogenes* u proizvodima, tokom posmatranog perioda, je iznosila 3,4%. EFSA navodi da je srednja pojava *L.monocytogenes* u RTE proizvodima u Evropi oko 4% (EFSA, 2013). Ispitujući 432 uzorka hrane, Leong i sar. (2014) su ustanovili prisustvo *L.monocytogenes* u njima sa prevalencom od 5,3%. Autori navode manju prevalencu *L.monocytogenes* u uzorcima briseva iz proizvodnog pogona u odnosu na prevalencu ovog patogena u hrani. Sa ovakvim rezultatima se slažu i rezultati našeg istraživanja. Naime, prilikom analize briseva površina za navedeni četvorogodišnji period, ustanovljena je prevalenca *L.monocytogenes* od 1,4%. Za navedeni period praćenja prisustva *L.monocytogenes* u posmatranom pogonu, uzorkovanje je izvršeno tokom zimskih meseci, kada se i odvija proizvodnja na tradicionalan način. S tim u vezi, nije bilo moguće primetiti tokom ove četiri godine, sezonsku varijaciju u prevalenci *L.monocytogenes*. Na ovu temu postoje oprečni podaci u naučnoj literaturi. Naime, dok se sa jedne strane nalaze literarni navodi o nepostojanju sezonske prevalencu *L.monocytogenes*, sa druge strane je literatura koja za *L.monocytogenes* navodi dokaze o jasnoj sezonskoj varijaciji u prevalenci, kako za zimske tako i za letnje mesece (Leong et al. 2014).

Listeria monocytogenes može u sredini proizvodnog pogona preživeti duži vremenski period. Imajući u vidu osobine ovog patogena da opstane u nepovoljnim uslovima sredine, kao i opasnosti u slučajevima njegovog prisustva u pogonu, u

proizvodnji bezbednih proizvoda od svinjskog mesa neophodna bi bila primena opštih preventivnih mera, kao što su principi dobre higijenske prakse, dobre proizvođačke prakse i principi analize kritičnih kontrolnih tačaka (Thévenot et al., 2006).

6.2 Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma izolata *L.monocytogenes*

Sposobnost formiranja biofilмова je još jedna od osobina *L.monocytogenes* koja doprinosi njenoj snažnoj adaptaciji i opstanku u mnogim sredinama. Na sposobnost formiranja biofilмова utiču prevashodno osobine samog soja, ali i priroda same površine na kojoj se nalazi *L.monocytogenes*, kao i uslovi koji vladaju u njenom okruženju. U toku ispitivanja ustanovljeno je za svih 20 ispitivanih izolata da imaju sposobnost formiranja biofilмова. Kod nekih izolata, ta sposobnost je umerena, dok se četiri izolata karakterišu snažnom sposobnošću formiranja biofilмова. Dva izolata sa snažnom sposobnošću formiranja biofilмова pripadali su klonalnom kompleksu CC21, dok su druga dva bili iz klonalnog kompleksa CC8. Rezultati su pokazali varijabilnost u formiranju biofilмова unutar kompleksa, ali varijacije u kapacitetu formiranja biofilma na nivou serogrupe nisu primećene. Razlike u sposobnosti formiranja biofilмова između različitih klonalnih kompleksa nisu primećene ni u studiji koja je analizirala izolate *L.monocytogenes*, poreklom iz pogona mesne industrije (Stoller et al., 2019). Naime, u ovoj studiji, tokom četvorogodišnjeg praćenja prisustva *L.monocytogenes* u pogonu i u proizvodima, izolovani sojevi su pokazali veliku sposobnost formiranja biofilмова. Pripadali su klonalnim kompleksima koji su široko rasprostranjeni u okruženju proizvodnih pogona prehrambene industrije, međutim, razlika u formiranju biofilмова između njih nije primećena. Imajući u vidu da je svaki od ispitanih izolata, pokazao sposobnost formiranja biofilмова, jedan od mogućih zaključaka bi mogao biti da je upravo sposobnost izgradnje biofilмова odgovorna za perzistentnost ovog patogena u lancu hrane. Međutim, brojni literarni izvori različito govore o uticaju sposobnosti formiranja biofilмова na prisustvo i preživljavanje *L.monocytogenes* u proizvodnom pogonu. Postoje literaturni navodi koji negiraju sposobnost vrste *L.monocytogenes* za formiranje biofilмова, dok drugi čak navode da su u okruženjima proizvodnih pogona perzistentniji sojevi koji nemaju sposobnost formiranja biofilмова

(Stoller et al., 2019). Chen i sar. (2006) izdvajaju nalaze prema kojima su izolati *L.monocytogenes* iz linije I, koje karakteriše 100 puta veća verovatnoću da izazovu listeriozu nego sojevi linije II, takođe sposobniji da formiraju biofilme u odnosu na izolate linije II, kojoj uglavnom pripadaju sojevi rasprostranjeni u hrani i postrojenjima za njenu proizvodnju.

Snažnoj sposobnosti preživljavanja *L.monocytogenes* u pogonima prehrambene industrije, može doprineti i smanjena osetljivost biofilмова na dejstvo dezinfekcionih sredstava. Tako, Fagerlund i sar. (2017) navode da fenotipske osobine, kao što su sposobnost formiranja biofilma i preživljavanje biocidnog delovanja dezinficijensa, mogu biti odgovorne za produženo postojanje određenih sojeva na površinama postrojenja za preradu hrane. Pokazalo se da se pojedini sojevi *L.monocytogenes* međusobno razlikuju po svojoj sposobnosti da formiraju biofilme i po toleranciji prema dezinfekcionim sredstvima. Međutim, nije utvrđena nijedna genetska determinanta ili individualna osobina odgovorna za perzistenciju *L.monocytogenes* (Fagerlund et al. 2017).

6.3 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Tokom naših ispitivanja, izolat *L.monocytogenes*, koji je na mikrotitarskoj ploči pokazao snažnu sposobnost formiranja biofilma, na površini nerđajućeg čelika nije bio u mogućnosti da formira isti. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je na površini nerđajućeg čelika zebeležila pojedinačne ćelije i diplo-forme V ili Y oblika. Ovakav rezultat su u svojim istraživanjima potvrdili Midelet i Carpentier (2002), koji su prijavili bolju adheziju ćelija *L. monocytogenes* na površinama polivinil hlorida i poliuretana u odnosu na površinu nerđajućeg čelika. Slične rezultate su uočili Kalmokoff i sar. (2002), koji su proučavali formiranje biofilma od strane različitih sojeva *L. monocytogenes* na površini nerđajućeg čelika. Posle 72 sata kontakta sa supstratom, na površini nerđajućeg čelika, skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je pokazala ravnomerno raspoređene pojedinačne ćelije bez formiranih biofilмова. U radu o ispitivanju sposobnosti formiranja biofilma od strane *L. monocytogenes* ATCC 19117 na nerđajućem čeliku, Oliveira i sar. (2010) navode da je primećena veoma brza adhezija pojedinačnih ćelija za površinu nerđajućeg čelika, ali i da je na istoj, tek nakon

240 sata primećeno postojanje biofilma. Autori navode brzu adheziju za površinu nerđajućeg čelika kao potencijalnu opasnost u pogledu kontaminacije površina koje dolaze u kontakt sa hranom. Naime, brza adhezija za površinu vodi ka brzom prelasku iz reverzibilnog u ireverzibilno prijanjanje ćelije za površinu, što predstavlja prvi korak u formiranju biofilma (Oliveira et al. 2010). Stoga je jasna zabrinutost prehrambene industrije zbog formiranja biofilmova od strane *L.monocytogenes*, jer se generišu ponavljajući rizici kontaminacije gotovih namirnica, posebno povećanjem otpornosti prema dezinfekcionim tretmanima tokom sanitacionih postupaka (Di Bonaventura et al., 2008).

6.4 Ispitivanje osetljivosti na antibiotike izolata *L.monocytogenes*

Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike pružaju korisne informacije o rezistenciji bakterija *L. monocytogenes* izolovanih iz hrane na antibiotike i potencijalno se mogu koristiti za razvoj preventivnih i korektivnih aktivnosti baziranih na upotrebi antimikrobnih supstanci, a sve u cilju zaštite od opasnosti povezanih sa ovim patogenom u hrani. Rezultati naših ispitivanja osetljivosti na antibiotike svih 20 izolata *L.monocytogenes* su pokazali njihovu osetljivost na antibiotike koji se terapijski koriste u lečenju listerioze. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa radom Gunes Altuntas i sar. (2010), koji su pokazali potpunu osetljivost na penicilin, ampicilin, rifampicin, vankomicin, gentamicin, tetraciklin, trimetoprim, hloramfenikol, eritromicin i delimičnu na streptomycin. Ovi autori navode da je primećena potpuna rezistencija izolata *L.monocytogenes* na fosfomicin. Ampicilin i penicilin su antibiotici sa velikim afinitetom prema penicilin-vezujućem proteinu na ćelijskom zidu listerije. Vezujući se za ove proteine, blokiraju njihovu enzimsku aktivnost, što rezultira njihovim baktericidnim dejstvom (Hof et al., 1997).

Svi naši izolati su pokazali rezistentnost na dejstvo ceftriaksona i cefotaksima. Taj rezultat nije neočekivan, posebno kada se ima u vidu smanjena osetljivost na cefalosporine, grupu antibiotika kojoj pripradu ceftriakson i cefotaksim. Naime, pretpostavlja se da je za smanjenu osetljivost prema cefalosporinima odgovoran njihov slab afinitet prema penicilin-vezujućem proteinu 3 (PBP3), jednom od sedam penicilin-

vezujućih proteina identifikovanih kod *L.monocytogenes*, za koji se veže aktivnost prema β -laktamima (Van de Velde et al., 2009). Dodatno, smanjena osetljivost prema velikom broju antibiotika iz grupe cefalosporina pokazana je i u istraživanju koje je demonstriralo ulogu histamin-senzorne komponente složenog sistema transporta signala kod *L.monocytogenes* (LisRK). Pored velike uloge koju ovaj signal-transportni sistem ima u odgovoru na stres izazvan dejstvom etanola, niske pH i vodonik-peroksida, pokazano je da učestvuje u obezbeđenju ćelijske tolerancije na važne antibiotike sa upotrebom u terapeutske svrhe, kakvi su nizin i antibiotici iz familije cefalosporina (Cotter, et al., 2002). Veoma smanjena osetljivost na dejstvo cefalosporina karakteriše pored *L.monocytogenes* i druge vrste iz roda *Listeria* (Kovacevic et al, 2013). Izolati *L.monocytogenes* iz hrane, okruženja za proizvodnju hrane i humanih uzoraka, njih ukupno 259, pokazali su rezistenciju na cefalosporine, ali i na tetraciklin, gentamicin i trimetoprim + sulfametoksazol (Noll et al., 2017). N. Yücel i sar. (2005) su ukazali na gotovo potpunu rezistenciju izolata *L.monocytogenes* iz mesa i pogona za proizvodnju proizvoda od mesa na cefalosporine i nalidiksičnu kiselinu. Rezistentnost na nalidiksičnu kiselinu karakteristična je osobina izolata *L.monocytogenes* uzorkovanih iz piletine i klanica živine (Sakaridis et al., 2011). Sa ovim i drugim navodima iz literature se slažu i naši rezultati. Naime, ni jedan od ispitivanih izolata *L.monocytogenes* nije reagovao na dejstvo nalidiksične kiseline (30 μ g). Izolati *L.monocytogenes* izolovani iz hrane, okarakterisani kao pripadnici IIa i IVb serogrupe, pokazuju rezistenciju na dejstvo nalidiksične kiseline, što predstavlja njihovu prirodnu osobinu. Imajući u vidu značaj izolata ovih serogrupa po izazivanje listerioze kod ljudi, jasna je važnost ispitivanja antimikrobne osetljivost sojeva *L.monocytogenes* poreklom iz hrane po ukupno javno zdravlje (Karadal, F. and Yildirim, Y. 2014).

6.5 Sekvenciranje kompletnog genoma izolata *L.monocytogenes*

Rezultati sekvenciranja kompletnog genoma svrstali su naše ispitivane izolate *L.monocytogenes* u tri različita kompleksa srodnih genotipova i jedan singleton. Takođe, rezultati sekvenciranja celokupnog genoma pokazali su veliku povezanost izolata unutar ST kompleksa. Ovakvi rezultati navode na zaključak da su ispitivani izolati *L.monocytogenes* perzistirali u proizvodnom pogonu duže vreme. Dugoročno

preživljavanje sojeva u pogonu za preradu hrane povećava rizik od prenosa bakterija na hranu, kao i rizik od izlaganja ljudi patogenu (Leong et al., 2014). Vrlo verovatno je da dugoročnom preživljavanju sojeva u prehrambenim pogonima doprinose adaptacije na dezinfekciona sredstva, niske temperature i visoke koncentracije soli, kao i sposobnost formiranja biofilmova (Holch et al., 2013).

Filogenetskom analizom smo ustanovili da ispitivani izolati *L.monocytogenes* pripadaju dvema evolutivnim linijama I i II. Osam ispitivanih izolata *L.monocytogenes*, koji se karakterišu maksimalnom alelskom razlikom u tri gena, obuhvaćeno je Kompleksom 1. Ovi izolati su iz serogrupe IIa (linija II), sa tipom sekvence ST21 i klonalnim kompleksom CC21. Najveću zastupljenost (40%) izolata *L.monocytogenes* tokom četvorogodišnjeg perioda u posmatranom pogonu činili su upravo sojevi klonalnog kompleksa CC21, koju u najvećoj meri čini serogrupu IIa, kao i drugi serotipovi koji nose nekoliko plazmida otpornih na teške metale. Slične podatke u svom radu navode Leong i sar. (2014), koji su od ukupno 370 izolata *L.monocytogenes*, poreklom iz različitih sektora prehrambene industrije, potvrdili da 41% njih pripada serotipu 1/2a. Nucera i sar. (2010) navode da je skoro polovina izolovanih *L.monocytogenes* iz hrane i pogona njene proizvodnje pripadalo upravo serotipu 1/2a, dok su ostali izolati bili iz 4b/4e, 1/2b i 1/2c serotipova. Čini se da većina izolata *L.monocytogenes* pripada linijama I i II, u kojima se nalaze serotipovi koji se češće povezuju sa kliničkim slučajevima kod ljudi, uključujući serotip 1/2a (linija II) i serotipovi 1/2b i 4b (linija I). Sojevi linije II su uobičajeni u namirnicama (Orsi et al., 2011). Serotip 1/2a čini više od 50% izolata *L. monocytogenes* poreklom iz hrane i životne sredine, dok je većina glavnih epidemija ljudske listerioze izazvana sojevima serotipa 4b (Pan et al., 2009). U svojoj raznovrsnosti sojeva *L.monocytogenes* izolovanih iz hrane i okruženja za njenu proizvodnju, najzastupljeniji su ipak sojevi sekvencionog tipa ST121 (Schmitz-Esser et al., 2015). U našem istraživanju, sojeve sa sekvencionim tipom ST121, izolovali smo iz uzoraka proizvoda od mesa pripremljenih u posmatranom pogonu za proizvodnju, u periodu od 2012. do 2014. godine. Prevalenca sojeva sa ovim sekvencionim tipom tokom posmatranog perioda je iznosila 30%. Široku rasprostranjenost sojeva *L.monocytogenes* ST121 u prehrambenoj industriji i uopšte u životnoj sredini, autori pripisuju brojnim njenim mehanizmima adaptacije na različite uslove okruženja. Izuzetnu selektivnost tokom vremena potvrđuje izuzetna

očuvanost profaga i plazmida u genomu ovog serotipa, koji doprinose osobinama za bolju adaptaciju na uslove sredine. Pored toga, genomi sekvencionog tipa ST121 imaju zajedničke adaptacije koje bi mogle biti povezane sa njihovom postojanošću u okruženjima za proizvodnju hrane kao što je prisustvo Tn6188, transpozona odgovornog za povećanu toleranciju prema kvaternarnim amonijum jedinjenjima (Schmitz-Esser et al., 2015). *L.monocytogenes* CC121 je najčešće izolovana iz okruženja za proizvodnju hrane, posebno pogona za proizvodnju proizvoda od mesa. Njih karakteriše visoka adaptiranost na uslove u okruženju proizvodnje hrane zahvaljujući efikasnom formiranju biofilma i toleranciji prema dezinfekcionim sredstvima, najverovatnije zbog visoke prevalencije gena odgovornih za toleranciju na benzankolijum hlorid. Sa druge strane, sojevi iz ovog serotipa pokazuju malu adaptaciju na domaćina (Maury et al., 2019).

Tokom našeg četvorogodišnjeg monitoringa, iz posmatranog pogona za proizvodnju izolovani su i sojevi sa tipom sekvence ST8 i klonskim kompleksom CC8, svrstani u Kompleks 3, na osnovu njihove alelske razlike u četiri gena. Tokom 2012. i 2013. godine, njihova prevalencija u posmatranom pogonu iznosila je 25%. Sojevi sekvencionog tipa ST8, takođe članovi evolutivne linije II, su veoma rasprostranjeni i konzervativni sojevi *L.monocytogenes*, sa visokim patogenim potencijalom, ali i sposobnošću i predispozicijama da postanu rezident različitih okruženja za proizvodnju hrane (Maury et al., 2019). Kako se navodi u izveštaju EFSA-e, u prolongiranoj epidemiji listerioze, u kojoj su zabeležena 22 slučaja u pet zemalja Evropske unije, nakon izvršenog sekvenciranja celokupnog genoma, utvrđeno je da je uzročnik oboljenja bila *L.monocytogenes* klonalnog kompleksa CC8 (ECDC/EFSA; 2019). Svi slučajevi su bili povezani sa konzumacijom hladno-dimljenih proizvoda od ribe. Listerioza sama za sebe, ili kao dodatna komplikacija već postojećih oboljenja, uzrokovala je tokom ove epidemije pet smrtnih slučajeva. Prvi slučaj listerioze u okviru ove epidemije sa *L.monocytogenes* CC8 evidentiran je u Estoniji, u julu 2014. godine, a najnoviji slučaj se dogodio u Danskoj, u februaru 2019. godine. Osam pacijenata, od dvanaest za koje je istorija konzumacije hrane bila dostupna, potvrdili su konzumaciju hladno dimljenih ribljih proizvoda. Postoje podaci i o listeriozi iz 2017. godine, koja se, takođe, desila u Danskoj ali i u nekoliko okolnih zemalja, poput Nemačke i Francuske. Zabeleženo je 12 slučajeva humane listerioze, čiji je uzročnik bila *L.monocytogenes*,

klonalnog kompleksa CC8 izolovana iz hladno dimljenog lososa, proizvedenog u Poljskoj (ECDC/EFSA; 2018). Za evolutivnu liniju II, karakteristično je da se nalazi u pogonima za proizvodnju i preradu svinjskog mesa. Tako su Benjamin i sar. (2018) izolovali i okarakterisali, pored ostalih sojeva iz serogrupe II, i *L.monocytogenes* CC8 u brisevima sa farme svinja, iz pogona za preradu svinjskog mesa, kao i u gotovim proizvodima od tog mesa.

U našim ispitivanjima jedan izolat *L.monocytogenes*, poreklom iz suve pečenice, imao je tip sekvence ST515 i klonalni kompleks CC1. Ovaj singleton pripada evolutivnoj liniji I, tj. serogrubi IVb. *L.monocytogenes* CC1 je okarakterisana kao hipervirulentna, sa velikom sposobnošću preživljavanja unutar domaćina, dok je, sa druge strane, karakteriše smanjena adaptacija na uslove sredine proizvodnog pogona i retko posedovanje gena rezistencije na benzalkonijum hlorid (Maury et al., 2019). Pretpostavka da ovaj klonalni kompleks ima veću virulentnost u odnosu na druge, podržana je i nalazom istraživanja u kojem su izolati *L.monocytogenes* CC1 imali snažnu povezanost sa kliničkim slučajevima listerioze kod ljudi (Jennison Amy et al., 2017). Kada je u pitanju globalna distribucija sojeva *L.monocytogenes*, ispitujući 300 izolata, iz 42 zemlje i sa pet kontinenata, Chenal-Francisque i sar. (2011) su pokazali da je klonalni kompleks CC1, serotipa 4b, bio dominantan u svim delovima sveta, osim u severnoj Africi. I pored sve češćih literarnih navoda, da serotip 1/2a biva dominantno zastupljen u izolatima iz hrane i okruženja za njenu preradu, podaci ukazuju na ukupnu prevagu serotipa 4b iz različitih izvora i geografski razuđenih regiona (Kishnani et al., 2019). Sojevi *L.monocytogenes*, klonalnog kompleksa CC1, iako najčešće dovođeni u vezu sa kliničkim izolatima, pokazali su veliku rasprostranjenost u okruženju za proizvodnju hrane, odakle bivaju preneseni na hranu. Sveprisutnost ovog klonalnog kompleksa ukazuje na njegovu veliku sposobnost prilagođavanja različitim uslovima, ali i na to da ga treba shvatiti kao ozbiljnu potencijalnu opasnost za pogone prehrambene industrije (Kishnani et al., 2019).

6.6 Identifikacija gena rezistencije na antimikrobne lekove

Od velikog broja opisanih gena koji doprinose fiziološkoj adaptaciji *L.monocytogenes* na različite uslove sredine u kojoj se nalazi, prilikom sekvenciranja

celokupnog genoma ispitivanih izolata, ispitano je prisustvo *mprF* i *fosX* gena. Kod svih ispitanih izolata je potvrđeno prisustvo jednog ili oba gena uključena u antimikrobni odgovor bakterijske ćelije. Izolati klonalnog kompleksa CC21 i CC121, sa sekvencionim tipom ST21 i ST121, u svom genomu sadržali su oba tražena gena. Prisustvo *mprF* gena je potvrđeno i kod izolata klonalnog kompleksa CC1 kao i kod singletona iz serogrupe 4b. Tako je, na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja prisustva gena antimikrobne rezistencije, utvrđeno prisustvo *mprF* gena u svim ispitivanim izolatima. Ovakav rezultat ne iznenađuje, posebno kada se ima u vidu da su sojevi *L.monocytogenes* sa širokom rasprostranjenošću u hrani i sredini za proizvodnju hrane nosioci upravo ovih sekvencionih tipova. Prisustvo *mprF* gena je, nakon sekvenciranja celokupnog genoma, potvrđeno u sojevima *L.monocytogenes* ST121, izolovanim iz pogona za proizvodnju proizvoda od mesa (Pasquali et al., 2018). U 46 ispitivanih izolata *L.monocytogenes*, poreklom iz klanice, svinjkog mesa i humanih uzoraka, potvrđeno je prisustvo *mprF* gena (Moreno et al., 2014). Ekspresija *mprF* gena je pod kontrolom jednog od ključnih regulatora virulentnosti kod *L.monocytogenes* (VirR). Ovaj nalaz navodi na mogućnost ispitivanja uloge *mprF* gena u virulentnosti *L.monocytogenes* (Camejo et al., 2009). Pokazano je da Multipeptidni factor rezistencije (MprF), katalizirajući transfer lizina sa lizil-tRNK, igra bitnu ulogu u bakterijskoj rezistenciji. Nije isključivo karakterističan samo za genom *L.monocytogenes*. Njegovo prisustvo je potvrđeno i kod drugih vrsta roda *Listeria*, ali i kod *S.aureus* i nekih vrsta unutar rodova *Lactobacillus*, *Bacillus* i *Vagococcus* (Thedieck et al., 2006).

Izolati naših ispitivanih klonalnih kompleksa CC21 i CC121 su imali gen *fosX*. Isti nije pronađen među izolatima klonalnog kompleksa CC8. Gen *fosX* nije posedovao ni izolat klonalnog kompleksa CC1. Naši rezultati se slažu sa rezultatima rada Toledo i sar. (2018), koji navode postojanje gena *fosX* među izolatima *L.monocytogenes* klonalnog tipa CC121.

Familija proteina fosfomicinske rezistencije je karakteristična za Gram pozitivne bakterije. Međutim, FosX protein, izolovan iz *L.monocytogenes*, nađen je i kod Gram negativnih bakterija (npr. *Brucella melitensis*). Kada se zna da je enzimska aktivnost ovih proteina plazmidski regulisana, opravdano je postojanje zabrinutosti za širenje ove genske determinante rezistencije široko među različitim rodovima bakterija (Aghamali et al., 2018). Dodatno, njihovo koegzistiranje sa drugim genima koji daju rezistenciju na

druge klase antibiotika, uključujući β -laktame, fluorohinolone, tetracikline, makrolide, sulfonamide i aminoglikozide, pogoršava nastanak sojeva rezistentnih na različite antibiotike (Falagas et al., 2019).

6.7 PCR-skrining na prisustvo markera za otpornost na dezinficijense: Tn6188 i *brcABC*

U toku istraživanja ustanovljeno je da su izolati kod kojih je PCR skriningom konstatovano prisustvo transpozona Tn6188, njih 6, pripadali sekvencionom tipu ST121, široko rasprostranjenom u hrani i pogonima za proizvodnju hrane. Brojna je naučna literatura koja navodi da su vrste sa transpozonom Tn6188 predominantno izolovane iz hrane i okruženja u kojoj se ona proizvodi. Tako su Ortiz i sar. (2014), ispitujući izolate *L.monocytogenes*, uzorkovane tokom tri godine u pogonu za proizvodnju tradicionalnih Iberijskih proizvoda od mesa, potvrdili prisustvo transpozona Tn6188 u izolatima svrstanim u seroliniju II, kojoj pored ostalih priprada i sekvencioni tip ST121. Müller i sar. (2014) su u izolatima *L.monocytogenes* iz hrane i pogona za njenu proizvodnju, koji su predominantno pripadali seroliniji II, potvrdili prisustvo transpozona Tn6188. Takođe, pokazali su da je minimalna inhibitorna koncentracija benzalkonijum hlorida (MIC) značajno veća kod izolata koji imaju transposon Tn6188 u odnosu na one koji isti ne sadrže u svom genomu. Koristeći se tehnikom kvantitativne RT-PCR, isti autori su pokazali značajan rast ekspresije gena *qacH* u prisustvu benzalkolijum hlorida. U genomu izolata koji pripadaju sekvencionom tipu ST121, uzorkovanih iz industrija za proizvodnju proizvoda od mesa i ribe, ukazano je na prisustvo transpozona Tn6188 (Møretro et al., 2017). Takođe, u svim izolatima *L.monocytogenes* iz klonalnog kompleksa CC121, sekvencionog tipa ST121, Meier i sar. (2017) su potvrdili prisustvo *qacH* gena. U saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju su i rezultati Ebner., (2015), u kojem su svi izolati rezistentni na benzalkodijum hlorid (BC) poreklom iz serolinije II. U pomenutom radu, većina benzalkodijum hlorid rezistentnih izolata poseduje *qacH* gen. Međutim, u jednom broju rezistentnih izolata nije nađen ni ovaj niti geni u okviru *brcABC* kasete gena, što je, takođe, u skladu sa našim nalazima. Rezistencija na BC izolata *L.monocytogenes*, kod kojih nedostaju determinante genske rezistencije, kao što su *qacH* i *brcABC* geni, je

primećena u dosadašnjim istraživanjima (Ortiz et al., 2014). Kao moguće razloge ovakvih rezultata, Ebner, (2015) navodi modifikacije na ćelijskom zidu koje smanjuju pristup benzalkonijum hlorida ciljnim mestima na ćelijskoj membrani i mutacije u genima koji kodiraju efluks-pumpe. Nedostatak gena rezistencije na ovo dezinfikaciono sredstvo navodi na sumlju mogućnosti prisustva, do sada, nepoznatih mehanizama rezistencije na benzalkonijum hlorid (Meier et. al., 2017). Rezistencija na BC nije vezana samo za pripadnike serolinije II. Literatura navodi da je rezistentnost na ovo dezinfikaciono sredstvo rasprostranjena među izolatima serolinije I i II (Mullapudi et al., 2008). Geni koji su odgovorni za povećanje tolerancije na kvaternarna amonijum jedinjenja su široko rasprostranjeni među *L.monocytogenes* izolovanim iz hrane i pogona za proizvodnju hrane. Povećana prisutnost gena rezistencije u okruženju za proizvodnju hrane, može učiniti *L.monocytogenes* sposobnijom za rast u okruženju sa rezidualnim, subletalnim koncentracijama kvaternarnih amonijum jedinjenja (Møretro et al., 2017). Subletalne doze dezinficijensa u proizvodnom pogonu mogu biti prisutne usled nedovoljnog ispiranja površina, ali i snižavanjem koncentracije doze usled prisustva ostataka hrane, biofilmova ili jednostavno pogrešnim doziranjem (Müller et al., 2014).

Ni kod jednog od naših skeniranih izolata *L.monocytogenes*, nije potvrđeno prisustvo *brcABC* kasete gena. Iako dobro poznata genska karakteristika rezistencije na BC, neretko u istraživanjima izostaje potvrda prisustva *brcABC* kasete gena u genomima BC rezistentnih izolata *L.monocytogenes*. Ni u jednom od 70 ispitivanih izolata *L.monocytogenes*, sekvencionog tipa ST121, Rychli i sar. (2017), takođe nisu potvrdili prisustvo *brcABC* gena. Müller i sar. (2013) beleže prisustvo *brcABC* gena kod izolata *L.monocytogenes* rezistentnih na BC. Interesantno je da *qacH* gen i *brcABC* kasete gena nisu pronađeni zajedno u istom genomu (Møretro et al., 2017; Müller et al., 2014). Ukazano je da prisustvo *brcABC* kasete gena povećava minimalnu inhibitornu koncentraciju benzalkodijum hlorida i do četiri puta (Müller et al., 2013). Prisustvo *brcABC* gena u izolatima *L.monocytogenes* iz klanice svinja i sa opreme za rezanje, uzorkovanim u intervalu od tri godine, ukazuje na stabilnost ovih gena u sredini sa čestom upotrebom benzalkodijum hlorida (Cherifi et al.2018). Da bi se sprečilo širenje bakterija tolerantnih na dezinfekciju i ograničila njihova postojanost u okruženju

proizvodnje hrane, uz upotrebu kombinovanih antimikrobnih sredstava, predložen je pristup upotrebe ne-hemijskih preparata (Maury et al., 2019).

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata sprovedenih ispitivanja, kao i podataka iz aktuelne literature, može se zaključiti sledeće:

1. Tokom četvorogodišnjeg perioda ispitivanja, od ukupno 671 ispitanih uzoraka proizvoda od mesa (531) i briseva sa površina proizvodnog pogona za preradu mesa (140), prisustvo *L.monocytogenes* je ustanovljeno kod 20 (2,98%) uzoraka, odnosno u 18 (3,39%) uzoraka proizvoda od mesa i u 2 (1,43%) uzorka briseva sa površina proizvodnog pogona za preradu mesa.
2. Kod svih ispitivanih sojeva *L.monocytogenes* potvrđena je njihova sposobnost formiranja biofilma, koja je kod četiri soja bila snažna, a umerena kod ostalih ispitivanih sojeva. Uočena je varijabilnost u formiranju biofilmova unutar kompleksa, ali varijacije u kapacitetu formiranja biofilma na nivou serogrupe nisu primećene.
3. Formiranje biofilma na površini nerđajućeg čelika, od strane odabranog soja sa osobinama snažnog produktora biofilma, nije zabeleženo skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM), već su ustanovljene pojedinačne ćelije i diplo-forme V ili Y oblika.
4. Svi ispitivani izolati *L.monocytogenes* su u disk difuznom testu pokazali osetljivost na antibiotike sa terapijskom ulogom u lečenju listerioze: penicilin, amoksicilin + klavulanska kiselina, ampicilin, ciprofloksacin, eritromicin, hloramfenikol i trimetoprim + sulfametoksazol. Rezistencija je ustanovljena na dejstvo cefalosporina (ceftriaksona i cefotaksima) i nalidiksične kiseline.
5. Metodom sekvenciranja kompletnog genoma, utvrđeno je da ispitivani izolati *L.monocytogenes* potiču iz četiri tipa sekvence (ST515, ST8, ST21, ST121), grupisane u četiri glavna klonalna kompleksa (CC1, CC8, CC21, CC121). Ustanovljena velika povezanost izolata unutar sekvencionog tipa (ST) ukazuje da su oni bili prisutni u proizvodnom pogonu tokom dužeg vremenskog perioda.
6. Svi ispitivani izolati *L.monocytogenes* su pripadali serograpi IIa (linija II) , osim jednog, koji je pripadao serograpi IVb (linija I).

7. Gen rezistencije na antimikrobne lekove - *mprF* je utvrđen kod svih ispitivanih izolata *L.monocytogenes*. Kod sojeva klonalnih kompleksa CC21 i CC121, serogrupe IIa, detektovan je *fosX* gen, dok u genomima klonalnih kompleksa CC8 (serogrupe IIa) CC1, serogrupe IVb, nije ustanovljen.
8. Otpornost na benzalkonijum hlorid ustanovljena je kod je kod šest izolata *L.monocytogenes*, klonalnog kompleksa CC121, sekvencionog tipa ST121, serogrupe IIa, gde su evidentirani geni za transpozon Tn6188. Nasuprot tome, ni u jednom ispitivanom izolatu nije utvrđena otpornost na kvaternarne amonijumove soli, odnosno prisustvo gena za *brcABC*.
9. Kontaminacija proizvoda od mesa ukazuje da *L.monocytogenes* opstaje u proizvodnom pogonu za preradu mesa i neophodno je poboljšati postojeće intergrisane sisteme kontrole.

8. SPISAK LITERATURE

1. Abram, F., Starr, E., Karatzas, K. A., Matlawska-Wasowska, K., Boyd, A., Wiedmann, M., O'Byrne, C. P. (2008). Identification of components of the sigma B regulon in *Listeria monocytogenes* that contribute to acid and salt tolerance. *Applied and environmental microbiology*, 74(22), 6848–6858.
2. Aghamali, M., Sedighi, M., Bialvaei, A.Z., Mohammadzadeh, N., Abbasian, S., Ghafouri, Z. and Kouhsari, E. (2018). Fosfomicin: mechanisms and the increasing prevalence of resistance. *Journal of Medical Microbiology* 68: 11-25.
3. Alam, T. and Goyal, G.K. (2011). Effect of MAP on microbiological quality of Mozzarella cheese stored in different packages at 7±1°C. *J. Food Sci. Technol.* 48: 120–123.
4. Altuntas, E., Kocan, D., Cosansu, S., Ayhan, K., Juneja, V. and Materon, L. (2012). Antibiotic and Bacteriocin Sensitivity of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Different Foods. *Food and Nutrition Sciences*, Vol. 3 No. 3, pp. 363-368.
5. Augustin, J., Zuliani, V., Cornu, M. and Guillier, L. (2005). Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 1019-1042.
6. Azizoglu, R. O., Osborne, J., Wilson, S., & Kathariou, S. (2009). Role of growth temperature in freeze-thaw tolerance of *Listeria* spp. *Applied and environmental microbiology*, 75(16), 5315-20.
7. Bacterial Nomenclature up-to-date, website (version Jun 2012). Bacterial Nomenclature up-to-date published by the Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures at <http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/bacterial-nomenclature-up-to-date.html>
8. Borovic, B., Baltic, T., Lakicevic, B., Jankovic, V., Mitrovic, R., Jovanovic, J. and Lilic, S. (2014). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in ready to eat food of animal origin. *Tehnologija mesa* 55 117-122.
9. Borucki, M.K., Peppin, J.D., White, D., Loge, F. and Call, D.R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7336–7342.

10. Brown, E., Dessai, U., McGarry, S. and Gerner-Smidt, P. (2019). Use of Whole-Genome Sequencing for Food Safety and Public Health in the United States. *Foodborne pathogens and disease*, 16(7), 441–450.
11. Brown, S.R.B., Emily C. Forauer, E. and D'Amico, D. (2018). Effect of modified atmosphere packaging on the growth of spoilage microorganisms and *Listeria monocytogenes* on fresh cheese. *Journal of Dairy Science*, Volume 101, Issue 9, 7768 – 7779.
12. Camejo, A., Buchrieser, C., Couvé, E., Carvalho, F., Reis, O., Ferreira, P., Cabanes, D. (2009). In vivo transcriptional profiling of *Listeria monocytogenes* and mutagenesis identify new virulence factors involved in infection. *PLoS pathogens*, 5(5).
13. Carleton, H.A. and Gerner-Smidt, P. (2016). Whole-genome sequencing is taking over foodborne disease surveillance. *Microbe Mag.*;11:311–317.
14. Castanon, J. I. R. (2007). History of the use of antibiotics as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*, 86, 2466–2471.
15. Chae, M.S., Schraft, H., Hansen, L.T. and Mackereth, R. (2006). Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiol.* 23 (3), 250-259.
16. Chan, Y.C and Wiedmann, M. (2008). Physiology and Genetics of *Listeria Monocytogenes* Survival and Growth at Cold Temperatures, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49:3, 237-253.
17. Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M., and Boor, K.J. (2008). Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* 16, 388-396.
18. Chenal-Francisque, V., Lopez, J., Cantinelli, T., Caro, V., Tran, C., Leclercq, A., Brisse, S. (2011). Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerging infectious diseases*, 17(6), 1110–1112.
19. Donlan R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881-90.
20. Dortet, L., Veiga-Chacon, E. and Cossart, P. (2009). *Listeria monocytogenes*. In M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 182–198). Paris, France: Institute Pasteur.

21. Dussurget, O., Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P.(2004). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Ann. Rev. Microbiol.* 58, 587-610.
22. Ebner,R.R. (2015). Phenotypic and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated during 2011-2014 from different food matrices in Switzerland., University of Zurich, Vetsuisse Faculty.
23. EFSA Panel on Biological Hazards, Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R. et al. (2018). *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal* 2018;16(1):5134.
24. EFSA. (2013). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *EFSA J.* 11:3241.
25. Elhanafi, D., Dutta, V. and Kathariou, S. (2010). Genetic Characterization of Plasmid-Associated Benzalkonium Chloride Resistance Determinants in a *Listeria monocytogenes* Strain from the 1998-1999 Outbreak. *Applied and environmental microbiology.* 76. 8231-8.
26. Endrikat, S., D. Gallagher, R. Pouillot, H. H. Quesenberry, D. LaBarre, C. M. Schroeder, and J. Kause. (2010). A comparative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in prepackaged versus retail sliced deli meat. *J. Food Prot.* 73:612–619.
27. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and European Food Safety Authority (EFSA). Joint ECDC-EFSA Rapid Outbreak Assessment: Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 infections linked to consumption of salmon products - 25 October 2018. Stockholm and Parma: ECDC/EFSA; 2018.
28. European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* clonal complex 8 infections linked to consumption of cold-smoked fish products – 4 June 2019. Stockholm and Parma: ECDC/EFSA; 2019.
29. Fagerlund, A., Langsrud, S., Schirmer, B. C., Møretrø, T., and Heir, E. (2016). Genome Analysis of *Listeria monocytogenes* Sequence Type 8 Strains Persisting in Salmon and Poultry Processing Environments and Comparison with Related Strains. *PloS one*, 11(3).

30. Fagerlund, A., Møretrø, T., Heir, E., Briandet, R. and Langsrud, S. (2017). Cleaning and Disinfection of Biofilms Composed of *Listeria monocytogenes* and Background Microbiota from Meat Processing Surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 83(17).
31. Falagas, M., E., Athanasiaki, F., Voulgaris, G. L., Triarides, N. A. and Vardakas, K. Z. (2019). Resistance to fosfomycin: Mechanisms, Frequency and Clinical Consequences. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Volume 53, Issue 1, 22-28.
32. Félix, B., Feurer, C., Maillet, A., Guillier, L., Boscher, E., Kerouanton, A., Roussel, S. (2018). Population Genetic Structure of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated From the Pig and Pork Production Chain in France. *Frontiers in microbiology*, 9, 684.
33. Ferreira, V. B., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of food protection*, 77 1, 150-70.
34. Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J. and Lombó, F. (2018). Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Frontiers in microbiology*, 9, 898.
35. Gandhi, M. and Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 113, Issue 1: 1-15.
36. Garner, D. and Kathariou, S. (2016). Fresh Produce–Associated Listeriosis Outbreaks, Sources of Concern, Teachable Moments, and Insights. *Journal of Food Protection*: February 2016, Vol. 79, No. 2, pp. 337-344
37. Gómez, D., Iguácel, L. P., Rota, M. C., Carramiñana, J. J., Ariño, A., and Yangüela, J. (2015). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat Products and Meat Processing Plants in Spain. *Foods (Basel, Switzerland)*, 4(3), 271–282.
38. Gray JA, Chandry PS, Kaur M, Kocharunchitt C, Bowman JP and Fox EM (2018). Novel Biocontrol Methods for *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Production Facilities. *Front. Microbiol.* 9:605.

39. Halbedel, S., Prager, R., Fuchs, S., Trost, E., Werner, G., & Flieger, A. (2018). Whole-Genome Sequencing of Recent *Listeria monocytogenes* Isolates from Germany Reveals Population Structure and Disease Clusters. *Journal of clinical microbiology*, 56(6).
40. Hellström S., Laukkanen R., Siekkinen K.-M., Jukka R., Maijala R. and Korkeala H. (2010). *Listeria monocytogenes* contamination in pork can originate from farms. *J Food Protect.* 73:641–648.
41. Hingston, P., Chen, J., Dhillon, B. K., Laing, C., Bertelli, C., Gannon, V., Wang, S. (2017). Genotypes Associated with *Listeria monocytogenes* Isolates Displaying Impaired or Enhanced Tolerances to Cold, Salt, Acid, or Desiccation Stress. *Frontiers in microbiology*, 8, 369.
42. Holch, A., Webb, K., Lukjancenko, O., Ussery, D., Rosenthal, B. M., and Gram, L. (2013). Genome sequencing identifies two nearly unchanged strains of persistent *Listeria monocytogenes* isolated at two different fish processing plants sampled 6 years apart. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2944–2951.
43. Howard Q. Zhang, Gustavo V. Barbosa-Cánovas, V. M. Bala Balasubramaniam, C. Patrick Dunne, Daniel F. Farkas, James T. C. Yuan (2011). *Nonthermal Processing Technologies for Food*. John Wiley & Sons. (672).
44. Jagadeesan Balamurugan, Baert Leen, Wiedmann Martin, Orsi Renato H. (2019). Comparative Analysis of Tools and Approaches for Source Tracking *Listeria monocytogenes* in a Food Facility Using Whole-Genome Sequence Data. *Frontiers in Microbiology*, 10(947).
45. Jennison, A.V., Masson, J.J., Fang, N.X., Graham, R.M., Bradbury, M.I., Fegan N., Gobius, K.S., Graham, T.M., Guglielmino, C.J., Brown, J.L., Fox, E.M. (2017). Analysis of the *Listeria monocytogenes* Population Structure among Isolates from 1931 to 2015 in Australia. *Frontiers in Microbiology*,8:603.
46. Johansson,J., Mandin,P., Renzoni,A., Chiaruttini,C., Springer,M. and Cossart,P. (2002). An RNA Thermosensor Controls Expression of Virulence Genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell*, Vol. 110, 551–561.
47. Jordan, K., Hunt,K., Lourenco,A. and Pennone, V. (2018). *Listeria monocytogenes* in the food processing environment. *Current Clinical Microbiology Reports*.

48. Kakey, S., Ali, J., & Alzubaidy, Z. (2013). Controlling the Growth of Local Isolates of *Listeria Monocytogenes* by Using Some Chemicals Preservatives. *Science Journal of University of Zakho*, 1(2), 651-658.
49. Kalmokoff, M.L., Austin, J.W., Wan, X.D., Sanders, G., Banerjee, S. and Farber, J.M. (2008). Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *J. Appl. Microbiol.* 91(4), 725-734.
50. Karadal, F. and Yildirim, Y. (2014). Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from raw milk cheese samples sold in Nigde. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 61 (4), 255-260.
51. Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J. Food Prot.* 65:1811–1829.
52. Khoshgozaran, S., Azizi, M.H., and Bagheripoor-Fallah, N. (2012). Evaluating the effect of modified atmosphere packaging on cheese characteristics: A review. *Dairy Sci. Technol.* 92: 1–24.
53. Kirtil, E. and Oztop, M. (2016). Controlled and Modified Atmosphere Packaging. *Reference Module in Food Science*, (12), pp. 1–2.
54. Kishnani,P., Kurkure,N.V., Barbuddhe,S.B., Doijad,S.P., Chakraborty,T., Daginawala,H.F., Singh,L.K., Kashyap,R.S., Stewart,F.J. (2019). Draft Genome Sequence of *Listeria monocytogenes* CIIMS-NV-3, a Strain Isolated from Vaginal Discharge of a Woman from Central India. *Microbiology Resource Announcements* 8:6.
55. Koreňová J, Oravcová K, Véghová A, Karpí Ková R, Kuchta T. (2016). Biofilm formation in various conditions is not a key factor of persistence potential of *Listeria monocytogenes* in food-processing environment. *J Food Nutr Res.*;55(2).
56. Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A. and Sofos, J.N. (2003). Effect of Food Processing-Related Stresses on Acid Tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* Dec 2003, 69 (12) 7514-7516.
57. Kovacevic,J., Sagert,J., Wozniak,A., Gilmour,M.W. and Allen, K.J. (2013). Antimicrobial resistance and co-selection phenomenon in *Listeria* spp. recovered from food and food production environments- *Food Microbiology*, Volume 34, Issue 2, Pages 319-327.

58. Kuenne C, Voget S, Pischmarov J, Oehm S, Goesmann A, et al. (2010) Comparative Analysis of Plasmids in the Genus *Listeria*. *PLoS ONE* 5(9): e12511.
59. Kurpas, M., Wiczorek, K., & Osek, J. (2018). Ready-to-eat Meat Products As a Source of *Listeria Monocytogenes*. *Journal of veterinary research*, 62(1), 49–55.
60. Kwong, J. C., Mercoulia, K., Tomita, T., Easton, M., Li, H. Y., Bulach, D. M., Howden, B. P. (2016). Prospective Whole-Genome Sequencing Enhances National Surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of clinical microbiology*, 54(2), 333–342.
61. Lado, B. and Yousef, A.E. (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors, Chapt. 6. In: Ryser, E.T., Marth, E.H. (Eds), *Listeria, listeriosis and food safety*, 3rd edn, CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton. Pp. 157-213.
62. Lani, M.N. and Hassan, Z. (2016). *Listeria Monocytogenes: General Overview and Its Significance to Food Safety*. Penerbit UMT, USA.
63. Leclercq, A. Chapter 2.9.7, *Listeria monocytogenes*, 2015th ed.; The World Organisation for Animal Health (OIE): Paris, France, 2015; pp.1-18.
64. Leong, D., Alvarez-Ordóñez, A. and Jordan, K. (2014). Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. *Front. Microbiol.* 5:436.
65. Liu, S., J. E. Graham, L. Bigelow, P. D. Morse, and B. J. Wilkinson. (2002). Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1697-1705.
66. Lopez-Valladares, G., Danielsson-Tham, M.L. and Wilhelm, T. (2018). Implicated Food Products for Listeriosis and Changes in Serovars of *Listeria monocytogenes* Affecting Humans in Recent Decades. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15:7, 387-397.
67. Madeo, M., O'Riordan, N., Fuchs, T. M., Utratna, M., Karatzas, K. A. and O'Byrne, C. P. (2012). Thiamine plays a critical role in the acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett*, 326: 137-143.
68. Madigan, M.T. and Martinko J.M. (2003). *Brock biology of microorganisms* (10th Edn.). Pearson-Prentice Hall.

69. Maiden, M. C., Jansen van Rensburg, M. J., Bray, J. E., Earle, S. G., Ford, S. A., Jolley, K. A. and McCarthy, N. D. (2013). MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature reviews. Microbiology*, 11(10), 728–736.

70. Marc W Allard, M.W., Bell, R., Ferreira,C.M., Gonzalez-Escalona,N., Hoffmann,M., Muruvanda,T., Ottesen,A., Ramachandran,P., Reed,E., Sharma,S., Stevens,E., Timme,R., Zheng,J., Brown,E. (2018). Genomics of foodborne pathogens for microbial food safety. *Current Opinion in Biotechnology*: 49 (224-229).

71. Mastromatteo, M., Conte, A., Faccia, M., Del Nobile, M.A., and Zambrini, A.V. (2014). Combined effect of active coating and modified atmosphere packaging on prolonging the shelf life of low-moisture Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 97: 36–45.

72. Maury,M.M, Bracq-Dieye,H., Huang,L., Vales,G., Lavina,M., Thouvenot,P., Disson,O., Leclercq,A., Brisse,S. and Lecuit,M. (2019). Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nature Communications*, volume 10, Article number: 2488.

73. McCollum, J. T., A. B. Cronquist, B. J. Silk, K. A. Jackson, K. A. O'Connor, S. Cosgrove, J. P. Gossack, S. S. Parachini, N. S. Jain, P. Ettestad, M. Ibraheem, V. Cantu, M. Joshi, T. DuVernoy, N. W. Fogg, J. R. Gorny, K. M. Mogen, C. Spires, P. Teitell, L. A. Joseph, C. L. Tarr, M. Imanishi, K. P. Neil, R. V. Tauxe, and B. E. Mahon. (2013). Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe. *N. Engl. J. Med.* 369:944–953.

74. MCID. (2014). Macedonian Committee on Infectious Diseases.
Available from:
<http://www.independent.mk/articles/7492/Dangerous+Bacteria+in+Macedonia+Three+People+Died+of+Listeria>.

75. Meier, A. B., Guldimann, C., Markkula, A., Pöntinen, A., Korkeala, H., & Tasara, T. (2017). Comparative Phenotypic and Genotypic Analysis of Swiss and Finnish *Listeria monocytogenes* Isolates with Respect to Benzalkonium Chloride Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 8, [397].

76. Michaelsen, A., Sebranek, J., Dickson, J. (2006). Effects of Microbial Inhibitors and Modified Atmosphere Packaging on Growth of *Listeria monocytogenes*

and Salmonella enterica Typhimurium and on Quality Attributes of Injected Pork Chops and Sliced Cured Ham. *Journal of food protection*. 69. 2671-80.

77. Montville, T. J., Matthews, K. R., & Kniel, K. E. (2012). *Food microbiology: An introduction*. Washington, DC: ASM Press.

78. Moreno,L.Z.,Paixão,R., Gobbi,D., Raimundo,D., Ferreira,T., Moreno,A., Hofer,E., Reis,C., Matté,G., Matté,M. (2014). Characterization of antibiotic resistance in *Listeria* spp. isolated from slaughterhouse environments, pork and human infections. *Journal of Infection in Developing Countries*, Tramaniglio, v.8, n.4, p.416-423.

79. Møretro,T, Schirmer,B., Heir,E., Fagerlund,A., Hjemli,P., Langsrud,S. (2017). Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. *International Journal of Food microbiology*, Volume241,215-224.

80. Morganti, M., Scaltriti, E., Cozzolino, P., Bolzoni, L., Casadei, G., Pierantoni, M., Pongolini, S. (2015). Processing-Dependent and Clonal Contamination Patterns of *Listeria monocytogenes* in the Cured Ham Food Chain Revealed by Genetic Analysis. *Applied and environmental microbiology*, 82(3), 822–831.

81. Muhterem-Uyar, M., Ciolacu, L., Wagner, K. H., Wagner, M., Schmitz-Esser, S., & Stessl, B. (2018). New Aspects on *Listeria monocytogenes* ST5-ECVI Predominance in a Heavily Contaminated Cheese Processing Environment. *Frontiers in microbiology*, 9, 64.

82. Mullapudi, S., Siletzky, R.M., & Kathariou, S. (2008). Heavy-metal and benzalkonium chloride resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from the environment of turkey-processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1464–8.

83. Müller, A., Rychli, K., Muhterem-Uyar, M., Zaiser, A., Stessl, B., Guinane, C. M., Schmitz-Esser, S. (2013). Tn6188 - a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. *PloS one*, 8(10), e76835.

84. Müller, A., Rychli, K., Zaiser, A., Wieser, C., Wagner,M., Schmitz-Esser, S. (2014). The *Listeria monocytogenes* transposon Tn6188 provides increased tolerance to various quaternary ammonium compounds and ethidium bromide, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 361, Issue 2, 1, Pages 166–173.

85. Nadon C, Van Walle I, Gerner-Smidt P, Campos J, Chinen I, Concepcion-Acevedo J, et al. (2017). PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. *Euro Surveill.* 22(23).
86. Nawrocki, K. L., Crispell, E. K., & McBride, S. M. (2014). Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Gram-Positive Bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 3(4), 461–492.
87. NICD. National Institute for Communicable Diseases (NICD), South Africa. (2019). <http://www.nicd.ac.za/wp-content/uploads/2018/08/An-update-on-the-outbreak-of-Listeria-monocytogenes-South-Africa.pdf>
88. Noll, M., Kleta, S and Al Dahouk, S. (2017). Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants and human samples in Germany. *Journal of Infection and Public Health*, Volume 11, Issue 4, Pages 572-577.
89. Nucera, D., Lomonaco, S., Bianchi, D. M., Decastelli, L., Grassi, M. A., Bottero, M. T. and Civera, T. (2010). A five year surveillance report on PFGE types of *Listeria monocytogenes* isolated in Italy from food and food related environments. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 271–276.
90. Olaimat, A. N., Al-Holy, M. A., Shahbaz, H. M., Al-Nabulsi, A. A., Abu Ghoush, M. H., Osaili, T. M., Ayyash, M. M. and Holley, R. A. (2018). Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17: 1277-1292.
91. Oliver, H.F., Orsi, R.H., Wiedmann, M., and Boor, K.J. (2010). *Listeria monocytogenes* σ B has a small core regulon and a conserved role in virulence but makes differential contributions to stress tolerance across a diverse collection of strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4216-4232.
92. Orsi, R.H. and Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(2) pp. 5273–5287.

93. Orsi,R.H., denBakker, H.C. and Wiedmann,M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International journal of medical microbiology : IJMM*, Vol: 301, Issue: 2, Page: 79-96.
94. Ortiz,S., López-Alonso,V., Rodríguez,P., Martínez-Suárez, J.V. (2015). The Connection between Persistent, Disinfectant-Resistant *Listeria monocytogenes* Strains from Two Geographically Separate Iberian Pork Processing Plants: Evidence from Comparative Genome Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (1) 308-317.
95. Pan,Y., Breidt Jr.F. and Kathariou,S. (2009). Competition of *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains in Mixed-Culture Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (18) 5846-5852.
96. Pasquali, F., Palma, F., Guillier, L., Lucchi, A., De Cesare, A., & Manfreda, G. (2018). *Listeria monocytogenes* Sequence Types 121 and 14 Repeatedly Isolated Within One Year of Sampling in a Rabbit Meat Processing Plant: Persistence and Ecophysiology. *Frontiers in microbiology*, 9, 596.
97. Pereira, S.,A., Alves,A., Ferreira,V- and Teixeira, P.C.M. (2018). The Impact of Environmental Stresses in the Virulence Traits of *Listeria monocytogenes* Relevant to Food Safety, *Listeria Monocytogenes*, Monde Alfred Nyila, IntechOpen.
98. Pietzka, A., Allerberger, F., Murer, A., Lennkh, A., Stöger, A., Cabal Rosel, A., Schmid, D. (2019). Whole Genome Sequencing Based Surveillance of *L. monocytogenes* for Early Detection and Investigations of Listeriosis Outbreaks. *Frontiers in public health*, 7, 139.
99. Qin,Q.L., Xie,B.B., Zhang, X.Y., Chen, X.L., Zhou, B.C., Zhou, J., Oren, A., Zhang, Y.Z. (2014) A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights. *J Bacteriol* 196:2210–2215.
100. Raheem, D. (2016). Outbreaks of listeriosis associated with deli meats and cheese: an overview. *AIMS Microbiology*, 2, 230–250.
101. Rahimi, E., Yazdi F., Farzinezhadizadeh H. (2012). Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from different types of raw meat in Iran. *J Food Prot.* 75(12):2223-7.

102. Reha O, Azizoglu, J, Osborne, S, Wilson, S, Kathariou. (2009). Role of Growth Temperature in Freeze-Thaw Tolerance of *Listeria* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (16) 5315-5320.
103. Revez J, Espinosa L, Albiger B, Leitmeyer KC, Struelens MJ, ECDC Microbiology Focal Points and Experts Group. (2017). Survey on the Use of Whole-Genome Sequencing for Infectious Diseases Surveillance: Rapid Expansion of European National Capacities, 2015-2016. *Front Public Health.* 18;5:347.
104. Ripolles-Avila, C., Ríos-Castillo, A.G. and Rodríguez-Jerez, J.J. (2018). Development of a peroxide biodetector for a direct detection of biofilms produced by catalase-positive bacteria on food-contact surfaces, *CyTA - Journal of Food*, 16:1, 506-515,
105. Ruppitsch, W., Pietzka, A., Prior, K., Bletz, S., Fernandez, H. L., Allerberger, F., Mellmann, A. (2015). Defining and Evaluating a Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for Whole-Genome Sequence-Based Typing of *Listeria monocytogenes*. *Journal of clinical microbiology*, 53(9), 2869–2876.
106. Rychli, K., Wagner, E. M., Ciolacu, L., Zaiser, A., Tasara, T., Wagner, M., & Schmitz-Esser, S. (2017). Comparative genomics of human and non-human *Listeria monocytogenes* sequence type 121 strains. *PloS one*, 12(5), e0176857.
107. Ryser, E. T., and Marth, E. H. (2007). *Listeria, listeriosis, and food safety*, 3rd Edn. Boca Raton, FL: CRC Press.
108. Sakaridis, I., Soutos, N., Iossifidou, E., Papa, A., Ambrosiadis, I. and Koidis, P. (2011). Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated in Chicken Slaughterhouses in Northern Greece. *Journal of Food Protection*, Vol. 74, No. 6, pp. 1017-1021.
109. Sauders, B.D., and M. Wiedmann. (2007). Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment, p. 21–53. In E. T. Ryser and E. H. Marth (ed.), *Listeria, listeriosis, and food safety*, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
110. Schirm, M., Kalmokoff, M., Aubry, A., Thibault, P., Sandoz, M., & Logan, S. M. (2004). Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with beta-O-linked N-acetylglucosamine. *Journal of bacteriology*, 186(20), 6721–6727.
111. Schmid D, Allerberger F, Huhulescu S, Pietzka A, Amar C, Kleta S, Prager R, Preussel K, Aichinger E, Mellmann A. (2014). Whole genome sequencing as

a tool to investigate a cluster of seven cases of listeriosis in Austria and Germany, 2011–2013. *Clin Microbiol Infect* 20:431–436.

112. Schmid, M.W., Eva Y.W.Ng, Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., Goebel, W., Wagner, M. and Schleifer, K.H. (2005). Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Syst Appl Microbiol.* 28:1-18.

113. Schmitz-Esser, S., Müller, A., Stessl, B. and Wagner, M. (2015). Genomes of sequence type 121 *Listeria monocytogenes* strains harbor highly conserved plasmids and prophages. *Frontiers in microbiology*, 6, 380.

114. Schürch, A.C., Arredondo-Alonso, S., Willems R.J.L., Goering, R.V. (2018). Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 24, Issue 4, 350 – 354.

115. Shoukat S, Ali M, Wani H, Ali U, Para PA and Ganguly S (2017). Food-borne listeriosis, an upcoming. *Journal of Immunology and Immunopathology* Vol. 19 (1): 1-9.

116. Slavetinsky C.J., Peschel A. and Ernst C.M. (2012). Alanyl-phosphatidylglycerol and lysyl-phosphatidylglycerol are translocated by the same MprF flippases and have similar capacities to protect against the antibiotic daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* Volume 56: 3492–3497.

117. Sleator, R.D., Gahan, C.G., and Hill, C. (2003b). A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1-9.

118. Sophia Kathariou (2002). *Listeria monocytogenes* Virulence and Pathogenicity, a Food Safety Perspective. *Journal of Food Protection*: November 2002, Vol. 65, No. 11, pp. 1811-1829.

119. Stack, H., Hill, C., and Gahan, C. (2008). Stress responses, p. 61-96. In: Liu, D. (Ed.), *Handbook of Listeria monocytogenes*. CRC Press, Boca Raton, FL.

120. Stasiewicz, M. J., Oliver, H. F., Wiedmann, M., den Bakker, H. C. (2015). Whole-Genome Sequencing Allows for Improved Identification of Persistent *Listeria monocytogenes* in Food-Associated Environments. *Applied and environmental microbiology*, 81(17), 6024–6037.

121. Staubitz P., Neumann H., Schneider T., Wiedemann I., Peschel A. (2004). MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 231:67-71.
122. Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L. and Svabic-Vlahovic, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 428–432.
123. Stevens, E. L., Timme, R., Brown, E. W., Allard, M. W., Strain, E., Bunning, K., and Musser, S. (2017). The Public Health Impact of a Publically Available, Environmental Database of Microbial Genomes. *Frontiers in microbiology*, 8, 808.
124. Stoller,A., Stevens,M.J.A., Stephan, R. and Guldemann,C. (2019). Characteristics of *Listeria Monocytogenes* Strains Persisting in a Meat Processing Facility over a 4-Year Period. *Pathogens*, 8(1), 32.
125. Thedieck, K., Hain, T., Mohamed, W., Tindall, B. J., Nimtz, M., Chakraborty, T., Wehland, J. and Jänsch, L. (2006). The MprF protein is required for lysinylation of phospholipids in listerial membranes and confers resistance to cationic antimicrobial peptides (CAMPs) on *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 62: 1325-1339.
126. Thévenot, D., Dernburg, A. and Vernozy- Rozand, C. (2006). An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 7-17.
127. Thomas J. Montville, Karl R. Matthews, Kalmia E. Kniel. (2012). *Food Microbiology: an Introduction*, 3rd ed.; ASM Press, Washington.
128. Tienungoon, S., Ratkowsky, D. A., McMeekin, T. A., & Ross, T. (2000). Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Applied and environmental microbiology*, 66(11), 4979-87.
129. To, M. S., Favrin, S., Romanova, N., & Griffiths, M. W. (2002). Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), 5258–5264.
130. Toledo, V., den Bakker, H. C., Hormazábal, J. C., González-Rocha, G., Bello-Toledo, H., Toro, M., and Moreno-Switt, A.I. (2018). Genomic Diversity of

Listeria monocytogenes Isolated from Clinical and Non-Clinical Samples in Chile. *Genes*, 9(8), 396.

131. Tompkin, R.B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the Food-Processing Environment. *Journal of Food Protection*, Vol. 65, No. 4, pp. 709-725.

132. Travier, L. and Lecuit, M. (2014). *Listeria monocytogenes* ActA: a new function for a 'classic' virulence factor. *Current Opinion in Microbiology*, Volume 17, Pages 53-60. ISSN 1369-5274.

133. U.S. Food and Drug Administration. (2015). Whole genome sequencing <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/WholeGenome>

134. Van de Velde, S., Carryn, S., Van Bambeke, F., Hill, C., Tulkens, P.M. and Sleator, R.D. (2009). Penicillin-binding Proteins (PBP) and Lmo0441 (a PBP-like protein) play a role in Beta-lactam sensitivity of *Listeria monocytogenes*. *Gut Pathogens*, 1:23.

135. Van der Veen, S., and Abee, T. (2010). Importance of SigB for *Listeria monocytogenes* Static and Continuous-Flow Biofilm Formation and Disinfectant Resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76 (23) 7854-7860.

136. Vincent, A.T., Derome, N., Boyle, B., Culley, A.I., Charette, S.J. (2017). Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *J Microbiol Methods*;138:60–71.

137. Wang Q, Holmes N, Martinez E, Howard P, Hill-Cawthorne G, Sintchenko V. (2015). It is not all about SNPs: comparison of mobile genetic elements and deletions in *Listeria monocytogenes* genomes links cases of hospital-acquired listeriosis to the environmental source. *J Clin Microbiol* 53:3492–3500.

138. Wang, S., Weller, D., Falardeau, J., Strawn, L. K., Mardones, F. O., Adell, A. D. and Moreno Switt, A. I. (2016). Food safety trends: From globalization of whole genome sequencing to application of new tools to prevent foodborne diseases. *Trends in Food Science and Technology*, 57, 188-198.

139. Whitley, E., Muir, D. and Waites, W.M. (2000). The growth of *Listeria monocytogenes* in cheese packed under a modified atmosphere. *J. Appl. Microbiol.* 88:52-57.

140. Wilson, A., Gray, J., Chandry, P. S., & Fox, E. M. (2018). Phenotypic and genotypic analysis of antimicrobial resistance among *Listeria monocytogenes* isolated from Australian food production chains. *Genes*, 9, 80.

141. World Health Organization, WHO. (2015). Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization. WHO Press, Geneva, Switzerland.

142. World Health Organization, WHO. (2018). Antibiotic resistance. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.

143. Yan H, Neogi SB, Mo Z, Guan W, Shen Z, Zhang S, Li L, Yamasaki S, Shi L, Zhong, N. (2010). Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005–2007. *Int J Food Microbiol.*; 144:310–316.

Prilog I

ID (NRL Graz)	ID	ST	Cluster Type	Serogroup	CC	Profile	abcZ	bglA	cat	dapE	dat	ldh	lhkA	bcrA	bcrB	bcrC	tetR	qacH	tnpC	tnpB	tnpA	
MRL-17-01214	1	21	5746	IIa	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	7	7	3	10	5	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRL-17-01215	2	21	5746	IIa	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	7	7	3	10	5	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRL-17-01216	3	8	295	IIa	CC8	5, 6, 2, 9, 5, 3, 1	5	6	2	9	5	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRL-17-01217	4	8	1358	IIa	CC8	5, 6, 2, 9, 5, 3, 1	5	6	2	9	5	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRL-17-01218	5	8	1358	IIa	CC8	5, 6, 2, 9, 5, 3, 1	5	6	2	9	5	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRL-17-01219	6	21	5746	IIa	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	7	7	3	10	5	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRL-17-01220	7	121	5747	IIa	CC121	7, 6, 8, 8, 6, 37, 1	7	6	8	8	6	37	1	-	-	-	+	+	+	+	+	+
MRL-17-01221	8	121	5750	IIa	CC121	7, 6, 8, 8, 6, 37, 1	7	6	8	8	6	37	1	-	-	-	+	+	+	+	+	+
MRL-17-01222	9	515	5749	IVb	CC1	3, 1, 1, 39, 3, 1, 3	3	1	1	39	3	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRL-17-01223	10	8	5748	IIa	CC8	5, 6, 2, 9, 5, 3, 1	5	6	2	9	5	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRL-17-01224	11	8	1358	IIa	CC8	5, 6, 2, 9, 5, 3, 1	5	6	2	9	5	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRL-17-01225	12	121	5750	IIa	CC121	7, 6, 8, 8, 6, 37, 1	7	6	8	8	6	37	1	-	-	-	+	+	+	+	+	+
MRL-17-01226	13	121	5747	IIa	CC121	7, 6, 8, 8, 6, 37, 1	7	6	8	8	6	37	1	-	-	-	+	+	+	+	+	+
MRL-17-01227	14	121	5750	IIa	CC121	7, 6, 8, 8, 6, 37, 1	7	6	8	8	6	37	1	-	-	-	+	+	+	+	+	+
MRL-17-01228	15	121	5750	IIa	CC121	7, 6, 8, 8, 6, 37, 1	7	6	8	8	6	37	1	-	-	-	+	+	+	+	+	+
MRL-17-01229	16	21	5746	IIa	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	7	7	3	10	5	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRL-17-01230	17	21	5746	IIa	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	7	7	3	10	5	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRL-17-01231	18	21	5746	IIa	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	7	7	3	10	5	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRL-17-01232	19	21	5746	IIa	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	7	7	3	10	5	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRL-17-01233	20	21	5746	IIa	CC21	7, 7, 3, 10, 5, 6, 1	7	7	3	10	5	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

BIOGRAFIJA

Ivana Zuber Bogdanović je rođena na Cetinju, 29.08.1985. godine, gde je završila osnovnu skolu i gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2004/05. godine, koji je u roku završila sa prosečnom ocenom 8,44. Na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu završila je Specijalističke akademske studije, smer Tehnološka mikrobiologija i stekla pravo na akademski naziv: specijalista-inženjer tehnologije. Školske 2016/17. upisala je doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. U predviđenom roku je položila sve ispite sa prosečnom ocenom 9,75.

Svoj profesionalni angažman je, nakon završetka osnovnih studija 2009. godine, započela u Akreditacionom tijelu Crne Gore, na mestu Savjetnika za akreditaciju laboratorija za ispitivanje, gde ostaje sve do 2017. godine, kada počinje sa radom u Specijalističkoj veterinarskoj laboratoriji u Podgorici, na mestu Saradnika za mikrobiološka ispitivanja u Odjeljenju za ispitivanje namirnica animalnog porijekla i hrane za životinje. Od 2013. godine je angažovana na Fakultetu za bezbednost hrane, prehrambenu tehnologiju i ekologiju Univerziteta Donja Gorica kao Saradnik u nastavi.

Tokom svog desetogodišnjeg radnog iskustva bila je učesnica brojnih kurseva, treninga, obuka, seminara i radionica iz oblasti: sistema upravljanja kvalitetom, akreditacije laboratorija, bezbednosti hrane, tehnologije hrane, ekologije. Do sada je jedan njen rad objavljen u časopisu sa SCI liste a dva rada prezentovana na međunarodnim naučnim simpozijumima.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana: Ivana Zuber Bogdanović

Broj upisa:

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

“Koncept kontrole *Listeria monocytogenes* u pogonu za preradu mesa uz upotrebu sekvenciranja kompletnog genoma u cilju postizanja bezbednosti hrane”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 29.10.2019.god.

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Ivana Zuber Bogdanović

Broj upisa:

Studijski program: doktorske akademske studije

Naslov rada: **“Koncept kontrole *Listeria monocytogenes* u pogonu za preradu mesa uz upotrebu sekvenciranja kompletnog genoma u cilju postizanja bezbednosti hrane”**

Mentor 1: prof. dr Mirjana Dimitrijević

Mentor 2: dr Brankica Lakićević

Potpisana: Ivana Zuber Bogdanović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 29.10.2019.god.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

“Koncept kontrole *Listeria monocytogenes* u pogonu za preradu mesa uz upotrebu sekvenciranja kompletnog genoma u cilju postizanja bezbednosti hrane”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 29.10.2019.god.