

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Brankica Z. Lakićević

**PRIMENA KLASIČNIH, MOLEKULARNO  
BIOLOŠKIH I IMUNOENZIMSKIH  
METODA U IZOLACIJI, DETEKCIJI I  
KARAKTERIZACIJI BAKTERIJA IZ  
RODA *LISTERIA***

Doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Brankica Z. Lakićević

**PRIMENA KLASIČNIH, MOLEKULARNO  
BIOLOŠKIH I IMUNOENZIMSKIH  
METODA U IZOLACIJI, DETEKCIJI I  
KARAKTERIZACIJI BAKTERIJA IZ  
RODA *LISTERIA***

Doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Brankica Z. Lakićević

**IMPLEMENTATION OF CLASSICAL,  
MOLECULAR BIOLOGICAL AND  
IMMUNOENZYMATIC METHODS IN  
ISOLATION, DETECTION AND  
CHARACTERIZATION OF BACTERIA OF  
THE GENUS *LISTERIA***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

## **MENTOR**

**Dr Olivera Bunčić, redovni profesor**

Fakultet veterinarske medicine, Beograd

## **ČLANOVI KOMISIJE**

**Dr Olivera Bunčić, redovni profesor**

Fakultet veterinarske medicine, Beograd

**Dr Vera Katić, redovni profesor**

Fakultet veterinarske medicine, Beograd

**Dr Zorica Lepšanović, viši naučni saradnik**

Vojno medicinska akademija, Beograd

*Svojim učiteljima, kolegama, prijateljima i porodici dugujem bezgraničnu zahvalnost. Njihova pomoć, podrška, preneto znanje i iskustvo, pažnja, ljubav i strpljenje su značajno doprineli mom ličnom i naučnom razvoju.*

*Posebno se zahvaljujem mom mentoru, prof. dr Oliveri Bunčić, za njeno strpljenje, razumevanje i ukazanoj časti i poverenju da budem njen kandidat. Takođe, zahvaljujem joj se na korisnim diskusijama i savetima koji su me usmeravali tokom izrade disertacije.*

*Zahvaljujem se članovima Komisije na korektnom i profesionalnom odnosu punom razumevanja, korisnim sugestijama pri kritičkoj oceni rada, podršci i pomoći.*

*Zahvaljujem se Elliot Ryser-u i Zhinong Yan-u na prenetom znanju i iskustvu, pruženim prilikama i savetima.*

*Zahvaljujem se prof. dr Ljiljani Petrović, rukovodiocu projekta: "Razvoj tradicionalnih tehnologija proizvodnje fermentisanih suvih kobasica sa oznakom geografskog porekla u cilju dobijanja bezbednih proizvoda standardnog kvaliteta", bez čije pomoći i podrške izvođenje eksperimentalnog dela disertacije ne bi bilo moguće.*

*Zahvaljujem se kolektivu Instituta za higijenu i tehnologiju mesa na razumevanju pri realizaciji ove disertacije, pomoći u savladavanju svih prepreka u eksperimentima od samog početka rada u laboratoriji, šali i zbilji.*

*Zahvaljujem se svom suprugu na dragocenoj pomoći u završnoj fazi izrade ovog rada, ljubavi, strpljenju i neizmernoj podršci, kao i svojim dragim porodicama Lakičević i Marković.*

PRIMENA KLASIČNIH, MOLEKULARNO BIOLOŠKIH I  
IMUNOENZIMSKIH METODA U IZOLACIJI, DETEKCIJI I  
KARAKTERIZACIJI BAKTERIJA IZ RODA *LISTERIA*

APSTRAKT

*Listeria monocytogenes*, prouzročivač listerioze kod ljudi i životinja, je fakultativni intraćelijski mikroorganizam široko rasprostranjen u različitim staništima kao što su zemljište, voda, vegetacija, zagađene vode, stočna hrana i farme. U cilju izolacije i detekcije *L. monocytogenes* iz hrane koriste se klasične mikrobiološke i nove imunološke i molekularno – biološke metode. S obzirom da klasične mikrobiološke metode, koje omogućavaju kultivaciju mikroorganizama i identifikaciju do nivoa vrste, zahtevaju intenzivan rad i dug vremenski period (od 5 do 7 dana), cilj ovog rada je bio da se standardizuju molekularno – biološke i imunološke metode za izolaciju, detekciju i karakterizaciju *L. monocytogenes*. U tu svrhu ispitano je 99 uzoraka. Primenom PCR i Real-time PCR metode pomoću *hlyA* prajmera, detektovani su sojevi *L. monocytogenes*, ali i atipični, hemolitični sojevi *L. innocua* J1-023, pa je imunoenzimski automatizovana mini Vidas metoda pokazala najveću specifičnost pri detekciji *L. monocytogenes*. S druge strane, osetljivost PCR metode kod identifikacije *Listeria* sp. i *L. monocytogenes* je bila visoka, tako da je na eksperimentalno kontaminiranim uzorcima pasterizovanog mleka, nakon perioda predobogaćenja inkubacijom od 24 h na 37°C i korišćenjem prajmera specifičnih za *hlyA* gen, bilo moguće detektovati 1 CFU/ml. Dalji rad se odnosio na ispitivanje potencijalnih izvora populacije bakterija *Listeria* u kuhinji restorana i industrijskom objektu za proizvodnju tradicionalne fermentisane suve kobasice. Dobijeni rezultati su pokazali da potencijane izvore kontaminacije bakterijama iz roda *Listeria* u restoranu, predstavljaju prijemne prostorije kao i prostorije za skladištenje sirovina i pripremu hrane. Mesta najčešće kontaminacije su bili podovi i slivnici u samom okruženju restorana. Rezultati detekcije vrsta iz roda *Listeria* u toku proizvodnje tradicionalne fermentisane suve kobasice su potvrdili da životinje, zaposleno osoblje i sastojci nadeva predstavljaju potencijalne izvore kontaminacije bakterijama iz roda *Listeria*. Na osnovu dobijenih rezultata potvrđeno je i da temperatura, pH, aktivnost vode, koncentracija hlorida i starter kulture značajno utiču na preživljavanje i razmnožavanje *L. monocytogenes* u toku proizvodnje tradicionalne fermentisane suve kobasice. Osim toga, ispitivan je i uticaj temperature i vlažnosti

suvomesnatih proizvoda na transfer *L. monocytogenes* u toku narezivanja. Sveukupno, rezultati ove oblasti ispitivanja su pokazali da šunka sa većim sadržajem vode daje veći i brži transfer *Listeria*, u odnosu na šunku sa niskim sadržajem vode, kao i da visoko kontaminirane kontaktne površine uređaja za narezivanje predstavljaju: oblast nagomilavanja uzorka, zadnja ploča, zadnji štit i držač štita. Rezultati su ukazali i da se značajno veći transfer populacije bakterija *Listeria* dešava kod šunke koja je čuvana na 22°C nego na 4 °C, što je najverovatnije posledica veće rastvorljivosti masti i efekta spiranja na višim temperaturama.

**Ključne reči:** *Listeria monocytogenes*, molekularno – biološke metode, mini Vidas, potencijalni izvori kontaminacije, uređaj za narezivanje

Naučna oblast: veterinarske nauke

Uža naučna oblast: mikrobiologija

UDK broj: 579

# IMPLEMENTATION OF CLASSICAL, MOLECULAR BIOLOGICAL AND IMMUNOENZYMATIC METHODS IN ISOLATION, DETECTION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIA OF THE GENUS *LISTERIA*

## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes*, the causative agent of listeriosis of humans and animals, is facultative intracellular microorganism widely distributed throughout different habitats, such as soil, water, vegetation, waste waters, feed and farms. Classical microbiological methods and the novel immunology and molecular biology methods are currently used for the isolation and detection of *L. monocytogenes* in food samples. Taking into consideration the fact that the classical microbiological methods, allowing cultivation of microorganisms and identification to the species level, require intensive and time-consuming work (from 5 – 7 days), the aim of this study has been to standardize molecular biology and immunology methods for the isolation, detection and characterization of *L. monocytogenes*. For that purpose, 99 samples have been tested. Using PCR and Real time with *hlyA* primers, both strains of *L. monocytogenes* and atypical, hemolytic strains of *L. innocua* J1-023 have been detected, and thus the automated immunoenzymatic assay mini Vidas have showed the highest particularity of detection of *L. monocytogenes*. On the other hand, sensitivity of detection of *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* has been high using PCR primers complementary to the *hlyA* gene. It has been possible to detect 1 CFU/ml of *L. monocytogenes* in artificially contaminated milk samples after 24 h of incubation at 37°C. Further work has been related to a search of potential sources of *Listeria* population in the restaurant kitchen and industrial facility for production of traditional, fermented dry sausage. The results obtained have showed that the potential sources of *Listeria* population in the restaurant are goods reception area, as well as the raw material storage and food processing area. *Listeria* sp. has been most commonly isolated from the drains and floors in the environment of the restaurant. Analysis of the production of traditional, fermented sausage have confirmed that animals, staff and ingredients are potential sources of *Listeria* population. Furthermore, the temperature, water activity, chloride concentration and starter cultures have affected the survival and reproduction of *L. monocytogenes* during the production of traditional, fermented dry sausage. Finally, we investigated the impact of product temperature and moisture on quantitative transfer of *L.*



*monocytogenes* during commercial slicing of deli ham. Overall, the results of this field of search have showed that the ham with the higher moisture gives higher and more rapid *Listeria* transfer than that of low moisture. Also, the results have showed that the most heavily contaminated food contact surfaces of the slicer are: collection area, back plate, guard back and guard holder. Results also indicated that significantly greater *Listeria* transfer occurred at 22°C than at 4°C which is likely due to increased fat solubilization and purge at the higher product temperature.

Key words: *Listeria monocytogenes*, molecular biology methods, mini Vidas, potential sources of contamination, slicer

Science: Veterinary science

Specific science: microbiology

No UDK: 579

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	2
2.1. Karakteristike roda .....	2
2.1.1. Morfologija .....	2
2.1.2. Kultivacija .....	3
2.1.3. Metabolizam i biokemijske karakteristike .....	4
2.1.4. Taksonomija roda <i>Listeria</i> .....	5
2.1.5. Identifikacija vrsta .....	6
2.1.5.1. Metode u mikrobiološkoj kontroli .....	7
2.1.5.1.1. Klasične mikrobiološke metode .....	8
2.1.5.1.2. Imunološke metode .....	9
2.1.5.1.3. Molekularne metode .....	10
2.1.5.1.4. Fenotipske metode .....	14
2.1.6. Karakteristike genoma .....	14
2.1.7. Preživljavanje i umnožavanje <i>Listeria</i> sp. pod uticajem spoljašnjih stresnih uslova .....	17
2.2. Intraćelijski infektivni ciklus .....	17
2.2.1. Molekularne determinante uključene u adheziju i invaziju eukariotskih ćelija .....	19
2.2.1.1. Internalin: LPXTG protein odgovoran za ulazak u epitelijalne ćelije igra ključnu ulogu u prolaženju kroz intestinalnu barijeru .....	19
2.2.1.2. p60: Hidrolaza ćelijskog zida uključena u virulentnost .....	21
2.2.1.3. FbpA: Multifunkcionalni površinski protein bez signalne sekvence .....	22
2.2.1.4. LLO: Toksin i mogući signalni molekul .....	22
2.2.1.5. Faktori odgovorni za izlazak iz intraćelijskih vakuola .....	23
2.2.1.6. ActA: Površinski aktin-polimerišući protein .....	24
2.2.1.7. Hpt: Sistem potreban za intraćelijsku replikaciju .....	24
2.2.1.8. PrfA regulon .....	25
2.2.1.9. Nove virulentne determinante <i>Listeria monocytogenes</i> .....	26
2.3. Ekologija <i>Listeria</i> sp. i <i>Listeria monocytogenes</i> .....	27
2.3.1. <i>Listeria monocytogenes</i> u hrani .....	27
2.3.2. <i>Listeria monocytogenes</i> u industrijskim pogonima .....	32
2.3.2.1. Putevi i mesta kontaminacije bakterijom <i>Listeria monocytogenes</i> .....	32
2.3.2.2. Preživljavanje <i>Listeria monocytogenes</i> u industrijskim objektima .....	35
2.3.2.2.1. Adhezija i formiranje biofilmova <i>Listeria monocytogenes</i> .....	35
2.3.3. Prisustvo <i>Listeria monocytogenes</i> kod životinja .....	35
2.4. Listerioza .....	37

3. CILJ RADA .....	39
4. MATERIJAL I METODE .....	40
4.1. Eksperimentalni sojevi listerija .....	40
4.2. Podloge za kultivaciju bakterija .....	40
4.2.1. Morfološki, fiziološki, biohemijski i imunološki testovi .....	43
4.3. Priprema i način uzorkovanja .....	44
4.3.1. Priprema i način uzorkovanja briseva sa površina u restoranu .....	44
4.3.2. Priprema i način uzorkovanja briseva u toku proizvodnje tradicionalne fermentisane kobasice .....	45
4.3.3. Kontaminacija suvomesnatih proizvoda bakterijom <i>L. monocytogenes</i> u toku narezivanja .....	45
4.3.3.1. Priprema kulture .....	45
4.3.3.2. Uslovi skladištenja suvomesnatih proizvoda .....	46
4.3.3.3. Eksperimentalna kontaminacija sečiva .....	46
4.3.3.4. Određivanje broja ćelija <i>Listeria monocytogenes</i> iz isečenih parčića (odrezaka) šunke .....	46
4.3.3.5. Određivanje broja ćelija <i>Listeria monocytogenes</i> sa različitih površina uređaja za narezivanje .....	47
4.4. Određivanje osetljivosti PCR metode kod identifikacije <i>Listeria</i> sp. i <i>Listeria monocytogenes</i> .....	47
4.4.1. Priprema uzorka .....	47
4.4.2. Izolacija bakterijske DNK .....	48
4.5. Enzimske reakcije sa DNK .....	49
4.5.1. Umnožavanje DNK PCR metodom .....	49
4.5.2. Umnožavanje DNK Real Time PCR metodom .....	50
4.5.3. Sekvenciranje DNK .....	51
4.6. Elektroforeza PCR proizvoda .....	51
4.7. Mikrobiološka analiza briseva .....	52
4.7.1. Priprema uzoraka i uslovi rasta .....	52
4.8. Proizvodnja tradicionalne fermentisane kobasice .....	53
4.8.1. Ispitivanje fizičkih i hemijskih parametara u fermentisanim kobasicama ....	55
4.9. Ispitivanje briseva i namirnica .....	55
4.9.1. Mikrobiološko ispitivanje briseva i namirnica .....	55
4.9.2. Imunoenzimsko ispitivanje briseva i namirnica .....	56
5. REZULTATI .....	57
5.1. Usporedno ispitivanje mikrobioloških, molekularno bioloških i imunoenzimskih metoda za izolaciju, detekciju i karakterizaciju <i>L. monocytogenes</i> .....	57
5.1.2. Određivanje osetljivosti PCR metode kod identifikacije <i>Listeria</i> sp. i <i>Listeria monocytogenes</i> .....	60
5.1.2.1. Određivanje ukupnog broja bakterija iz roda <i>Listeria</i> .....	60

5.1.2.2. Uticaj predobogaćenja na osetljivost PCR detekcije <i>L. monocytogenes</i>	61
5.2. Ispitivanje briseva sa površina u restoranu	63
5.2.1. Rezultati prvog, drugog i trećeg uzorkovanja briseva	63
5.3. Rezultati detekcije vrsta iz roda <i>Listeria</i> u toku proizvodnje tradicionalne fermentisane suve kobasice	68
5.3.1. Ispitivanje briseva i namirnica	68
5.3.2. Ispitivanje fizičkih i hemijskih parametara u fermentisanim kobasicama	70
5.4. Kontaminacija suvomesnatih proizvoda bakterijom <i>Listeria monocytogenes</i> u toku narezivanja	73
6. DISKUSIJA	77
6.1. Usporedno ispitivanje mikrobioloških, molekularno bioloških i imunoenzimskih metoda za izolaciju, detekciju i karakterizaciju <i>L. monocytogenes</i>	78
6.1.1. Određivanje osetljivosti PCR metode kod identifikacije <i>Listeria</i> sp. i <i>Listeria monocytogenes</i>	81
6.2. Ispitivanje briseva sa površina u restoranu	82
6.3. Rezultati detekcije vrsta iz roda <i>Listeria</i> u toku proizvodnje tradicionalne fermentisane suve kobasice	85
6.4. Kontaminacija suvomesnatih proizvoda <i>Listeria monocytogenes</i> u toku obrade na uređaju za narezivanje	88
7. ZAKLJUČCI	94
8. LITERATURA	95
Prilog A	
Prilog B	
Biografija autora	

# 1. Uvod

*Listeria monocytogenes*, prouzročivač listerioze, je prvi put izolovana iz inficiranih laboratorijskih životinja (kunića i zamoraca) sa ustanovljenim povećanim brojem mononuklearnih leukocita.

Incidenca listerioze na godišnjem nivou u razvijenim zemljama iznosi od 0.2 do 0.8%. Mada se čini da incidenca listerioze nije visoka, procenat smrtnosti od oko 20% predstavlja najozbiljniju brigu za javno zdravlje širom sveta. Listerioza se najčešće javlja kod starijih osoba, novorođenčadi, trudnica, osoba obolelih od kancera, dijabetesa, SIDA-e, bubrežnih bolesti i osoba koje su pod glukokortikoidnom terapijom.

Iako je veza između konzumiranja zaražene hrane i pojave listerioze utvrđena tek 1980. godine, danas nema sumnje da je to primarni način prenošenja ove bakterije.

Mada su danas preventivna sredstva usmerena na industrijske pogone, potpuna eradikacija *L. monocytogenes* iz hrane nije moguća. Naime, utvrđeno je da kontaminacija bakterijom *L. monocytogenes* u različitim industrijskim pogonima može da opstane i dominira duži vremenski period. Kontaminacija u samim objektima gde se rukuje hranom dovodi do kontinuirane kontaminacije proizvoda hrane. Stoga je velika pažnja usmerena na prevenciju kontaminacije bakterijom *L. monocytogenes* kao i na otkrivanje mesta konstantne kontaminacije.

Klasične mikrobiološke metode u detekciji i identifikaciji vrsta roda *Listeria*, posebno *L. monocytogenes*, zahtevaju intenzivan rad, dug vremenski period, a rezultati ne moraju uvek biti pouzdani. S druge strane, detekcija i identifikacija patogena koji se prenose hranom je vrlo često otežana malim brojem prisutnih ćelija patogenih mikroorganizama, kao i njihovom interferencijom sa matriksom hrane iz kog se izoluju. Međutim, zbog stalnog unapređenja molekularno – bioloških metoda pronalaženje ovih patogenih mikroorganizama postaje lakše i predstavlja osnovnu tehniku koja se u novije vreme primenjuje u mnogim dijagnostičkim laboratorijama.

Brže i senzitivnije metode za detekciju i identifikaciju *L. monocytogenes* su od posebnog značaja za industriju hrane. Naime, prehrambena industrija zahteva brže metode u cilju dobijanja adekvatne informacije o mogućem prisustvu patogena u sirovinama i krajnjim proizvodima zbog kontrole procesa i praćenja higijenske prakse u objektima za proizvodnju.

## 2. Pregled literature

Različiti mikroorganizmi mogu da kontaminiraju hranu i vodu, i prouzrokuju oboljenja ljudi i životinja. *L. monocytogenes* je široko rasprostranjena u veoma različitim staništima kao što su zemljište, voda, vegetacija, stočna hrana, industrijski pogoni i farme. Ova bakterija, prepoznata je kao važan patogen kod ljudi i životinja, ali se ranije njeno prenošenje nije povezivalo s hranom. U zadnje dve decenije *L. monocytogenes* je postala predmet zanimanja medicinske, veterinarske i prehrambene mikrobiologije.

### 2.1. Karakteristike roda

#### 2.1.1. Morfologija

Vrste roda *Listeria* su sitni (1 – 2  $\mu\text{m}$  dužine, prečnika 0.5  $\mu\text{m}$ ), Gram-pozitivni štapići sa zaobljenim krajevima. Čelije ovih bakterija se mogu naći pojedinačno ili formiraju kraće lance, ili se pak grupišu u obliku slova V ili Y. Ponekad ćelije mogu biti kokoidnog oblika, prečnika 0.5  $\mu\text{m}$  tako da ih je teško razlikovati od streptokoka. Neke ćelije, tokom dužeg vremena inkubacije, gube sposobnost Gram-pozitivnog bojenja i mogu se ponekad pogrešno svrstati u bakterije roda *Haemophilus*. Interesantno je i da se tokom dužeg vremena inkubacije pod dejstvom osmotskog šoka bakterije roda *Listeria* mogu uočiti kao dugačke, tanke, filamentozne ćelije (Gutekunst *et al.*, 1992; Jorgensen *et al.*, 1995; Kuhn and Goebel, 1989).

Vrste roda *Listeria* su asporogene bakterije koje nemaju sposobnost formiranja kapsule i spora (Seeliger and Bockemuhl, 1986).

*Listeria* poseduje sposobnost pokretljivosti na temperaturi od 20 – 25°C zahvaljujući prisustvu nekoliko peritrihnih flagela.

Zbog mikroaerofilne prirode, bakterije roda *Listeria*, u polučvrstom medijumu za pokretljivost formiraju karakteristični oblik “*kišobrana*” u predelu oko 0.5 cm ispod površine medijuma. Dosadašnji podaci ukazuju da se *L. monocytogenes* i *L. innocua* značajno razlikuju u pokretljivosti i produkciji flagelina na temperaturi od 37°C: *L.*

*monocytogenes* je na ovoj temperaturi nepokretna i ne proizvodi flagelin, ili ga proizvodi u maloj količini, dok je *L. innocua* često pokretna i proizvodi značajnu količinu flagelina (Kathariou *et al.*, 1995).



Slika 2.1.1. *Listeria monocytogenes*

### 2.1.2. Kultivacija

Nakon prekonoćne inkubacije bakterije roda *Listeria* na hranljivom agaru formiraju kolonije prečnika od 0.2 do 0.8 mm, glatke površine i plavičasto-sive boje. Nakon pet do deset dana inkubacije, pojedinačne kolonije mogu dostići veličinu od 5 i više mm u prečniku. Vrste roda *Listeria* pokazuju dobar rast na većini bakterioloških podloga. Stepenn rasta se povećava prisustvom fermentišućeg šećera, posebno glukoze.

Na čvrstoj podlozi za rast, bakterije roda *Listeria* imaju karakterističan miris koji može biti rezultat formiranja karboksilnih kiselina, hidroksi kiselina i alkohola (Daneshvar *et al.*, 1989).

Gajenjem u tečnoj kulturi, medijum postaje zamućen posle 8 do 24 h inkubacije na temperaturi od 37°C. Značajano vidljiv rast se uočava blago ispod čiste zone blizu površine medijuma, ukazujući na sklonost vrsta roda *Listeria* da bolje rastu kada je pritisak kiseonika niži nego što je pritisak u vazduhu (Seeliger, 1961).

*L. monocytogenes* se smatra psihrotrofnom bakterijom. Raste na temperaturama od -1.5 do 45°C (Hudson *et al.*, 1994; Petran and Zottola, 1989). Istraživanja su pokazala da su optimalne temperature za rast *L. monocytogenes* između 30 i 37°C.

Optimalna pH vrednost za rast vrsta roda *Listeria* u tečnoj kulturi je pH 7, mada ove bakterije mogu da rastu u opsegu od pH 4.5 do 9.2 (George and Lund, 1992; Parish and Higgins, 1989; Petran and Zottola, 1989).

Vrste roda *Listeria* mogu da rastu u 10% (w/v) NaCl, a mogu da prežive i mnogo veće koncentracije soli (Seeliger and Jonesy, 1986; Shahamat *et al.*, 1980). Minimalna vrednost  $a_w$  ( $a_w$ -aktivnost vode) koja dozvoljava rast bakterija vrste *L. monocytogenes* je 0.92 i odgovara koncentraciji soli od 11.5% NaCl. U laboratorijskim uslovima, u tečnoj kulturi sa glicerolom minimalna  $a_w$  je 0.90 (Nolan *et al.*, 1992).

Bakterije roda *Listeria* podnose relativno visoke koncentracije CO<sub>2</sub> (npr. 30%), pri čemu sredina sa sadržajem CO<sub>2</sub> od 100% inhibira njihov rast. Rast nije ugrožen u sredini sa 5 – 10% CO<sub>2</sub>.

### 2.1.3. Metabolizam i biohemijske karakteristike

Pripadnici roda *Listeria* su aerobne, mikroaerofilne ili fakultativno anaerobne, katalaza pozitivne (retko se mogu uočiti katalaza-negativni sojevi) i oksidaza negativne bakterije. Vrste roda *Listeria* su homofermentativne bakterije koje imaju sposobnost da oksiduju glikolitične međuproizvode (Cotoni, 1942).

Svi sojevi pokazuju dobar rast na podlozi koja sadrži glukozu formirajući laktat, acetat i acetoin pod aerobnim uslovima kao krajnje proizvode (Pine *et al.*, 1989; Romick *et al.*, 1996).

*L. monocytogenes* unosi glukozu preko visoko afinitetnog fosfotransferaznog sistema zavisnog od fosfoenolpiruvata i glukoznog transportnog sistema slabog afiniteta prema protonima (Christensen and Hutkins, 1994; Parker and Hutkins, 1997). Kao rezultat korišćenja glukoze, sve vrste roda *Listeria* formiraju kiseline i acetoin, pokazujući pozitivne testove na metil crveno i Voges Proskauer.

Kiselina može nastati i iz amigdalina, celobioze, fruktoze, manoze, salicina, maltoze, dekstrina, alfa-metil-D-glukozida, L-ramnoze i alfa-metil-D-manozida. Produkcija kiselina iz galaktoze, laktoze, melezitoze, sorbitola, skroba, sukroze i



trehaloze je promenljiva. Kiselina se gotovo nikad ne proizvodi iz adonitola, arabinoze, dulcitolu, eritritolu, glukogenu, inozitolu, inulina, melibioze, rafinoze ili sorboze. Vrste roda *Listeria* ne sintetišu fenilalanin-deaminazu, ornitin-, lizin- i arginin-dekarboksilaze i ne proizvode H<sub>2</sub>S. Takođe, nemaju sposobnost hidrolize uree tako da ne stvaraju indol. Pokazuju sposobnost hidrolize eskulina.

#### 2.1.4. Taksonomija roda *Listeria*

Mnogo godina posle otkrića, rod *Listeria* se smatrao monospecifičnim, uključujući samo vrstu *L. monocytogenes*. Sa filogenetskog aspekta, uvođenje molekularno-genetičkih metoda je doprinelo boljem razumevanju diverziteta unutar roda, tako da rod *Listeria* sadrži šest vrsta: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* i *L. grayi* (Ryser and Marth, 1999; Larsen and Seeliger, 1966; Welshimer and Meredith, 1971; Seeliger, 1981; Rocourt and Grimont, 1983; Seeliger *et al.*, 1984). Najnovija istraživanja (Graves *et al.*, 2010; Leclercq *et al.*, 2010) ukazuju na postojanje još dve novoidentifikovane vrste: *L. marthii* i *L. rocourtiae*.

Osim toga, ustanovljeno je da rod *Listeria* obuhvata dve blisko povezane linije različitog porekla. Jednoj liniji pripada vrsta *L. grayi*, dok drugoj pripadaju vrste: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* i *L. seeligeri*. Unutar druge linije, vrste su podeljene u dve grupe:

1. *L. monocytogenes* i *L. innocua*
2. *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* (Collins *et al.*, 1991; Doumith *et al.*, 2004; Rocourt *et al.*, 1982, 1987; Sallen *et al.*, 1996; Vaneechoutte *et al.*, 1998).

Unutar roda *Listeria* samo se *L. monocytogenes* i *L. ivanovii* smatraju patogenim vrstama. *L. monocytogenes* je humani i animalni patogen dok je *L. ivanovii* prvenstveno animalni patogen (Doyle *et al.*, 2001). *L. ivanovii* (ranije poznata kao *Listeria bulgarica* ili serotip 5 *L. monocytogenes*) izaziva abortuse kod krava i ovaca ili septikemiju ovaca (Radojičić *et al.*, 2011)

*L. monocytogenes* spada u Carstvo: *Bacteria*, Razdeo: *Firmicutes*, Klasa: *Bacilli*, Red: *Bacillales*, Porodica: *Listeriaceae*, Rod: *Listeria*.

### 2.1.5. Identifikacija vrsta

Sve vrste roda *Listeria* su fenotipski veoma slične, ali se mogu razlikovati kombinacijom testova hemolize i produkcijom kiseline iz D-ksiloze (Rocourt *et al.*, 1983a). Fenotipske sličnosti su u saglasnosti sa visokom genomskom homologijom među različitim vrstama (Collins *et al.*, 1991; Rocourt *et al.*, 1983a; Sallen *et al.*, 1996).

Hemoliza je bitna karakteristika koja identifikuje izolate do nivoa vrste. Izolati *L. monocytogenes* i *L. seeligeri* pokazuju usku zonu  $\beta$ -hemolize. *L. ivanovii* pokazuje široku, jasno označenu zonu  $\beta$ -hemolize. *L. innocua*, *L. welshimeri* i *L. grayi* predstavljaju nehemolitične vrste.

*L. monocytogenes* daje hemolizu na krvnom agaru: ovčijeg, konjskog, kravljeg i humanog porekla (Schuch *et al.*, 1992; Seeliger, 1961; Skalka and Smola, 1982; Van der Kelen and Lindsay, 1990).

Većina gena koji kodiraju virulentne faktore hemolitičnih vrsta roda *Listeria*, obuhvataju klaster region od 10 kb na hromozomu. Međutim, samo se vrste *L. monocytogenes* i *L. ivanovii* smatraju prirodnim i eksperimentalnim patogenima (Mainou Fowler *et al.*, 1988; Rocourt *et al.*, 1983b).

Utvrđeno je da pored hemolitičnih, postoji i nekoliko nehemolitičnih izolata *L. monocytogenes*. Smatra se da nehemolitični ili slabo hemolitični sojevi nisu patogeni ili pokazuju slabo patogeno dejstvo (Bosgiraud *et al.*, 1989; Conner *et al.*, 1989; Del Corral *et al.*, 1990; Farber *et al.*, 1991a; Hof, 1984; Lachica, 1996; Pine *et al.*, 1991; Tabouret *et al.*, 1991).

U istraživanjima koja su izvršili Johnson i saradnici (2004), otkriven je novi, avirulentni, atipični, prirodni, hemolitički soj *L. innocua* (PRL/NW 15B95). U ovom soju su fenotipski eksprimirana najmanje dva virulentna genska klastera, *hly* (listeriozin O) i *plcA* (inozitol specifična fosfolipaza C), specifična za bakteriju *L. monocytogenes*, a avirulentnost najverovatnije potiče usled nedostatka *inlA*, *inlB*, *inlC*, *daaA* i alela *iap* gena specifičnih za *L. monocytogenes*. Zaključak da se radi o novom soju doneli su na osnovu analize drugih retkih atipičnih sojeva *L. innocua* (JI155, JI156 i J1023).

Dodatni testovi za razlikovanje *L. monocytogenes* od *L. innocua* se baziraju na aktivnosti fosfolipaze C (Coffey *et al.*, 1996; Notermans *et al.*, 1991), hidrolizi D-alanin-p-nitroanilida (Clark and McLaughlin, 1997; Kämpfer *et al.*, 1991), hidrolizi DL-

alanin-beta-naftilamida (Clark and McLaughlin, 1997) i hidrolizi naftilamid supstrata (Beumer *et al.*, 1996).

#### 2.1.5.1. Metode u mikrobiološkoj kontroli

Patogeni hrane, uzročnici različitih bolesti kod ljudi i životinja, kao i bakterije kvara predstavljaju ozbiljan problem u celom svetu. Posledično, primena mikrobiološke kontrole kvaliteta u industriji hrane, pa i industriji mesa, predstavlja meru koja ima za cilj minimiziranje rizika od infekcije patogenima iz hrane.

Detekcija patogena i bakterija kvara u hrani predstavlja izazov usled činjenice da su ti mikroorganizmi u hrani prisutni u malom broju, maskirani svojim matriksom, a po brojnosti ih prevazilazi veliki broj autohtonih bakterija.

Klasične mikrobiološke metode u identifikaciji patogena i bakterija kvara koriste adekvatne medijume neophodne za predobogaćenje i obogaćenje, izolaciju patogena na selektivnim podlogama, kao i njihovu konfirmaciju utvrđivanjem njihovih morfoloških karakteristika i upotrebom biohemijskih i/ili seroloških testova. Ove metode zahtevaju intenzivan rad, dug vremenski period, a dobijeni rezultati ne moraju biti uvek pouzdani (kao što je npr. slučaj kod pokretljivih mikroorganizama koji ne podležu kultivaciji). U cilju prevazilaženja ovih nedostataka razvijene su brze i senzitivne metode za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju patogena u hrani, što je od posebnog značaja za industriju hrane. Naime, prehrambena industrija zahteva brže metode u cilju dobijanja adekvatne informacije o mogućem prisustvu patogena u sirovinama i krajnjim proizvodima zbog kontrole procesa i praćenja higijenske prakse u objektima za proizvodnju (Stjepanović *et al.*, 2007).

Ove brze metode obezbeđuju ranu detekciju i određivanje broja mikroorganizama, a mogu se podeliti na: modifikovane i automatizovane konvencionalne metode, bioluminiscentne, imunološke i molekularne metode (Fung, 2002; Scheu *et al.*, 1998).

Molekularno – biološke metode, iako se do sada još uvek ne primenjuju u rutinskoj praksi, predstavljaju obećavajuću alternativu i mogu zameniti ili upotpuniti sadašnje referentne metode u ovoj oblasti.

#### 2.1.5.1.1. Klasične mikrobiološke metode

Klasične (konvencionalne) mikrobiološke metode koje se koriste za detekciju mikroorganizama u hrani su dobro razrađene, jednostavne, jeftine i mogu se koristiti u kvantitativnim i kvalitativnim ispitivanjima. Međutim, postoje neka ograničenja u korišćenju klasičnih metoda posebno kada se primenjuju u detekciji patogena. Ove metode se zasnivaju na rastu ciljnog (eng. *target*) mikroorganizma u jednoj ili više hranljivih podloga, vizuelnoj detekciji rasta i potvrđivanju prisustva patogena, obično kombinacijom biohemijskih i seroloških testova. Različite faze mogu biti izuzetno zahtevne, interpretacija rezultata subjektivna, a za neke patogene vreme potrebno za izvođenje metoda može biti veoma dugo. Kraće vreme ispitivanja i smanjenje laboratorijskog angažovanja može se obezbediti primenom alternativnih ili brzih metoda. Jasno se uočava značajno poboljšanje u performansama, kvalitetu i komercijalnoj dostupnosti brzih metoda što je dovelo do njihove široke primene. Brze metode ne mogu u potpunosti da zamene klasične metode, i u detekciji patogena obično se primenjuju kao zamena nekog od koraka u izolaciji, detekciji ili identifikaciji, što za rezultat ima kombinovano korišćenje klasičnih i brzih metoda.

Najčešće korišćene referentne metode za detekciju bakterija roda *Listeria* u hrani su ISO 11290 standardi (ISO, 1996; EC, 1999). US Food and Drug Administration (FDA) je razvila protokol za izolaciju bakterija roda *Listeria* iz mlečnih proizvoda, morskih plodova i povrća (Hitchins, 2003), dok je US Department of Agriculture (USDA) razvila metodu za izolaciju ovih bakterija iz mesa, proizvoda od mesa i uzoraka poreklom iz spoljašnje sredine (USDA, 2002). Svi pomenuti protokoli se zasnivaju na koracima homogenizacije i inkubacije medijuma za predobogaćenje i obogaćenje u periodu od 24 – 72 h na 30 – 37 °C.

S obzirom da do pre 1990 godine, komercijalno dostupni medijumi za izolaciju bakterija roda *Listeria*, nisu imali sposobnost razlikovanja *L. monocytogenes* od nepatogenih vrsta ovog roda, javila se potreba za razvojem novih i selektivnijih podloga.

Korišćenjem hromogenih podloga (ALOA, Rapid' L.Mono®) u konačnoj identifikaciji sumnjivih *L. monocytogenes*, značajno se skraćuje vreme potrebno za dobijanje adekvatne informacije o prisustvu ove bakterije u hrani (Greenwood *et al.*, 2005).

#### 2.1.5.1.2. Imunološke metode

Sve imunološke metode koriste visoko specifičnu reakciju vezivanja antitela i antigena. Da bi se ustanovilo da li dolazi do vezivanja antitela i antigena, mora postojati sistem koji omogućava vizuelizaciju odnosno merenje ove interakcije, što se postiže vezivanjem „markera“ za antitelo. Ove reakcije su vrlo osetljive, daju brze i pouzdane rezultate a zahtevaju utrošak male količine antigena i antitela.

U ELISA (eng. *The enzyme-linked immunosorbant assay*) metodi termin „enzyme-linked“ ukazuje da je sistem označen enzimom, kao i kod većine drugih sistema kod kojih enzim katalizuje konverziju bezbojnog supstrata u obojeni proizvod. Prema tome, princip ove metode je konjugacija enzima sa antitelom ili antigenom. Enzim se zatim detektuje dodavanjem supstrata i merenjem enzimske aktivnosti koja je direktno proporcionalna sadržaju specifičnih antitela u ispitivanom materijalu. Krajnji rezultat reakcije se može lako videti okom ili spektrofotometrijski, u zavisnosti od vrste testa.

Automatizovani mini VIDAS sistem, proizvođača bioMérieux, se zasniva na ELFA tehnologiji (eng. *The enzyme linked fluorescent assay*) koja kombinuje ELISA metodu i fluorescentno očitavanje. VIDAS LMO II test je validovan 2002 godine (USDA, 2002) i uspešno se koristi za detekciju stabilnog virulentnog antigena *L. monocytogenes*. Osim pomenutog, komercijalno su dostupni i drugi mini VIDAS testovi kao što su: VIDAS *Listeria* DUO za istovremenu detekciju *L. monocytogenes* i drugih bakterija roda *Listeria* (Janzten *et al.*, 2006) i LMX za kvalitativnu detekciju *L. monocytogenes*.



Slika 2.1.5.1.2. mini VIDAS®

Prednosti ove metode su: automatsko štampanje rezultata po završetku analize, skraćeno vreme koraka obogaćenja i detekcije, standardizacija u radu (reproducibilnost i pouzdanost rezultata), fleksibilnost u radu, visoka osetljivost i specifičnost.

#### 2.1.5.1.3. Molekularne metode

Metode molekularne biologije su postale značajna podrška tradicionalnim tehnikama. Karakteristika molekularnih metoda je brzina, ponovljivost i pouzdanost. Osim toga, molekularne metode su nezavisne od promenljivih uslova rasta mikroorganizama.

Metode zasnovane na analizi DNK predstavljaju jednostavan, pouzdan i ekonomski isplativiji način za identifikaciju i klasifikaciju mikroorganizama.

PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) je metoda koja se zasniva na selektivnom umnožavanju specifičnih fragmenata DNK. Prve studije koje se odnose na osetljivost PCR detekcije su urađene na čistim kulturama (Border *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1992) i veštački kontaminiranim uzorcima hrane (Furrer *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1992). Validacija metode je urađena i na velikom broju prirodno kontaminiranih namirnica (Rossen *et al.*, 1991; Bohnert *et al.*, 1992; Niederhauser *et al.*, 1992, 1993). Prvi rezultati ovih studija nisu bili uporedivi, jer su korišćene različite procedure, različiti uzorci hrane i različiti uslovi PCR reakcija.

Najčešće korišćeni ciljni geni u PCR reakciji su: *hlyA* (listeriolysin O), (Furrer *et al.*, 1991; Bohnert *et al.*, 1992; Niederhauser *et al.*, 1992; Ericsson and Stålhandske, 1997), *iap* (invasion-associated protein) (Köhler *et al.*, 1990; Niederhauser *et al.*, 1992; Wang and Hong, 1999), *dth-18* (delayed type hypersensitivity) (Wernars *et al.*, 1991), 16S rDNK (Wang *et al.*, 1992) i *inlA* (internalin operon) (Almeida and Almeida, 2000).

Nedostatak tradicionalnih PCR protokola predstavljaju složene pripreme uzoraka kao i detekcija proizvoda PCR reakcije korišćenjem agaroznih gelova u završnoj fazi kada je veliki deo nastalih PCR proizvoda zahvaćen degradacionim procesima. Osim toga, tradicionalne PCR metode samo detektuju prisustvo patogena (Churchill *et al.*, 2006) i nisu u mogućnosti da razlikuju žive od mrtvih ćelija (O'Connor, 2003).

Multipleks PCR je varijanta tradicionalnih PCR metoda i zasniva se na umnožavanju većeg broja gena ili genskih fragmenata istovremenim korišćenjem više setova prajmera (Churchill *et al.*, 2006). Bhagwat je 2003. godine u svojim

istraživanjima na veštački kontaminiranim kulturama patogena, koristio multiplex PCR za istovremenu detekciju *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* i *Escherichia coli* O157:H7. Ovaj način identifikacije je efikasan, ali se proizvodi reakcije moraju analizirati na agaroznim gelovima, što zahteva dodatno laboratorijsko angažovanje.

Real Time PCR metoda podrazumeva detekciju PCR proizvoda tokom eksponencijalne faze, kada se proces umnožavanja DNK najbrže dešava, a sama reakcija je u ovoj fazi visoko specifična i tačna. Princip metode se zasniva detekciji i kvantifikaciji fluorescentne reporterske boje, čija je emisija direktno proporcionalna količini proizvoda PCR reakcije. Prednosti Real Time PCR metode su: analitička i dijagnostička tačnost, visoka osetljivost, brzina izvođenja analize, univerzalnost pripreme uzoraka za analizu, mogućnost kvantitativne analize i mnoge druge (Braguta, 2008).



Slika 2.1.5.1.3. Real Time PCR, Stratagene Mx 3005P

Guilbaud i saradnici (2005) su razvili kvantitativni Real Time PCR metod za ispitivanje *L. monocytogenes* u veštački napravljenim biofilmovima korišćenjem nespecifične SYBR Green boje. Njihovi rezultati su ukazali da broj ćelija *L. monocytogenes* koji se može detektovati u biofilmovima iznosi  $6 \times 10^2$  CFU/cm<sup>2</sup> i da biofilmovi predstavljaju važan izvor kontaminacije u industriji hrane. Rantsiou i saradnici su 2008. godine razvili kvantitativni Real Time PCR metod za detekciju, kvantifikaciju i određivanje vitalnosti bakterije *L. monocytogenes* u mleku, mesu, mekom siru, fermentisanim kobasicama, pršuti i salati. Limit kvantifikacije metode je  $10^3 - 10^4$  cfu/g ili mL, dok je nakon prekonocne inkubacije na 37 °C bilo moguće detektovati 10 cfu/g ili mL. Osim toga, u slučaju da je u mešovitoj kulturi nakon koraka

obogaćenja koncentracija *L. innocua* 2,5 – 3 puta veća od *L. monocytogenes*, identifikacija plavo zelenih kolonija sa mat oreolom, karakterističnih za *L. monocytogenes*, nije bila moguća.

DGGE (**D**enaturing **G**radient **G**el **E**lectrophoresis) je elektroforetska metoda kojom je moguće detektovati razlike između DNK fragmenata iste veličine, ali različite nukleotidne sekvence, na osnovu različitih tačaka topljenja DNK. To se postiže u poliakrilamidnom gelu, u prisustvu denaturišućih agenasa uree i formamida.

Cocolin i saradnici su 2002. godine opisali direktnu identifikaciju *Listeria* sp. i *L. monocytogenes* u uzorcima hrane kombinacijom PCR i DGGE metode. Metod se zasniva na umnožavanju fragmenta *iap* gena koji poseduju vrste roda *Listeria* i analizi dobijenih proizvoda PCR reakcije elektroforezom u denaturišućem gradijent gelu. Zbog razlike u sekvenci umnoženog gena, moguće je ovom metodom brzo i lako razlikovati pet vrsta roda *Listeria* kao i različite serotipove u okviru vrste *L. monocytogenes*. Opisana metoda se može koristiti kao brzi test za utvrđivanje prisustva *Listeria* sp. i *L. monocytogenes* u hrani (Cocolin *et al.*, 2002).

PFGE (**P**ulse-**F**ield **G**el **E**lectrophoresis) omogućava razdvajanje velikih fragmenata DNK u pulsirajućem električnom polju. Ukupna DNK analiziranog mikroorganizma se seče restrikcijom enzimima čija su restrikciona mesta relativno retka u genomu, pri čemu se dobija 5-50 restrikcijonih fragmenata. Metoda je visoko diskriminativna sa visokom stopom ponovljivosti. PFGE se smatra metodom izbora u tipizaciji *L. monocytogenes*. Brosch i saradnici su 1996. godine ukazali da PFGE omogućava tipizaciju izolata *L. monocytogenes* serotipa 4b. Osim toga, PFGE je široko korišćen da bi se ispitali putevi kontaminacije bakterijom *L. monocytogenes* u industrijskim pogonima (Ojeniyi *et al.*, 1996; Unnerstad *et al.*, 1996; Autio *et al.*, 1999; Giovannacci *et al.* 1999; Miettinen *et al.*, 1999, 2001a; Senczek *et al.*, 2000; Fannesbech Vogel *et al.*, 2001; Berrang *et al.*, 2002).

MEE (**M**ultilocus **E**nzyme **E**lectrophoresis) metoda, zasnovana na elektroforetskoj pokretljivosti rastvorljivih metaboličkih enzima, korišćena je u nekoliko epidemioloških studija (Farber *et al.*, 1991b; Rørvik *et al.*, 1995, 2000; Avery *et al.*, 1996; Nesbakken *et al.*, 1996; Buncic *et al.*, 2001). Nedostatak metode je slaba moć razlikovanja sojeva (Caugant *et al.*, 1996).



REA (**R**estriction **E**ndonuclease **A**nalysis) se zasniva na prepoznavanju i sečenju ukupne DNK mikroorganizma na određenim mestima u hromozomu. Kao posledica dejstva restrikcionih endonukleaza nastaju fragmenti različite dužine. Nedostatak ove metode je u tome što se najčešće dobija veliki broj fragmenata čime je otežan način interpretacije rezultata (Gerner Smidt *et al.*, 1996).

Ribotipizacija ("ribotyping") je metoda u kojoj se univerzalne probe vezuju za specifične konzervisane domene rDNK sekvenci, što omogućava karakterizaciju samo ograničenih sekvenci. Slaba moć razdvajanja sojeva može biti prevaziđena korišćenjem različitih enzima (de Cesare *et al.*, 2001). Automatizovana ribotipizacija je korišćena u nekoliko epidemioloških studija (Tkáčiková *et al.*, 2000; Norton *et al.*, 2001; Berrang *et al.*, 2002; Suihko *et al.*, 2002; Aarnisalo *et al.*, 2003; Hoffman *et al.*, 2003), gde je uspešno identifikovan veliki broj izolata.

RAPD (**R**andom **A**mplification of **P**olymorphic **D**NA) je metoda u kojoj se koriste kratki proizvoljni prajmeri (Williams *et al.*, 1990) za umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom, pri nerestriktivnim uslovima. Metoda je pouzdana i jednostavna za izvođenje, ali dobijeni rezultati nisu uvek reproducibilni (Wernars *et al.*, 1996). RAPD ima visoku moć razdvajanja izolata *L. monocytogenes* (Boerlin *et al.*, 1995) i korišćen je u nekoliko epidemioloških studija (Lawrence and Gilmour 1995; Giovannacci *et al.*, 1999; Aguado *et al.*, 2001; Fonnesbech Vogel *et al.*, 2001).

AFLP (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism) je "fingerprint" tehnika koja kao i RAPD ne zahteva informacije o sekvenci izučavanog organizma, ali se koriste striktniji uslovi za PCR reakciju, te je ponovljivost veća u odnosu na RAPD. Početni korak podrazumeva digestiju celog genoma restrikcionim enzimima, nakon čega sledi ligacija i PCR reakcija. Fragmenti, dobijeni AFLP metodom, se razdvajaju na denaturišućim gelovima, a vizuelizacija fragmenata može biti autoradiografska ili fluorescentna. AFLP ima visoku moć razlikovanja izolata *L. monocytogenes*, slično PFGE (Fonnesbech Vogel *et al.*, 2001; Keto Timonen *et al.*, 2003).

Genotipizacija koja podrazumeva makro i mikrorej tehnike se još uvek ne koristi u rutinskoj dijagnostici, ali prvi rezultati ukazuju na veliki značaj ovih metoda (Ryser and Marth, 1999).

#### 2.1.5.1.4. Fenotipske metode

Fenotipske metode podrazumevaju metode serotipizacije, fagotipizacije i tipizacije bakteriocina.

Serotipizacija se zasniva na antigenim razlikama sojeva *L. monocytogenes* (Seeliger and Hohne, 1979). U odnosu na somatske i flagelarne antigene, u okviru vrste *L. monocytogenes* može se razlikovati 13 serotipova (Schönberg *et al.*, 1996), od kojih su samo serotipovi 1/2a, 1/2b i 4b izolovani iz kliničkih uzoraka i namirnica.

Fagotipizacija podrazumeva osetljivost izolata *L. monocytogenes* na određene bakteriofage (Rocourt *et al.*, 1985). Bitne karakteristike fagotipizacije su veća moć razlikovanja izolata i identifikacija većeg broja izolata za relativno kratko vreme. Nedostatak ove metode je u tome što tipizaciji ne podležu svi sojevi *L. monocytogenes* (McLauchlin *et al.*, 1996; Ojeniyi *et al.*, 1996). Ova metoda za sada ima mali dijagnostički značaj (Radojičić *et al.*, 2011)

Tipizacija bakteriocina podrazumeva osetljivosti izolata *L. monocytogenes* na različite bakteriocine. Ova metoda se slabo koristi u epidemiološkim studijama zbog slabe moći razlikovanja sojeva (Curtis and Mitchell, 1992).

#### 2.1.6. Karakteristike genoma

*L. monocytogenes*, preživljava ekstremne uslove, kao što su: visoke koncentracije soli, ekstremne vrednosti pH i temperature. Ove karakteristike poseduje i nepatogena vrsta *L. innocua*, koja često živi u udruženim zajednicama sa *L. monocytogenes* u hrani i spoljašnjoj sredini. Međutim, *L. innocua* ne poseduje virulentne faktore kao što su: površinski protein internalin (InlA), invazioni protein (InlB), proteini koji obezbeđuju izlazak iz fagocitne vakuole (LLO i PlcA) i proteini neophodni za intracelijsku pokretljivost (ActA i PlcB).

Genomi vrsta *L. monocytogenes* EGD (serovar 1/2a) i *L. innocua* CLIP 11262 su sekvencirani i poređeni (Glaser *et al.*, 2001). Vrsta *L. monocytogenes* EGD sadrži cirkularni hromozom dužine 2.94 Mb sa 39% G+C sadržaja. Genom *L. innocua* CLIP 11262 sadrži cirkularni hromozom dužine 3.01 Mb sa 37% G+C sadržaja, kao i plazmid veličine 81.9 kb koji kodira rezistentnost na teške metale. Komparativna analiza otkriva

konzervisanu organizaciju ova dva genoma, kao i neočekivanu sličnost sa nepatogenom bakterijom *Bacillus subtilis* i patogenom bakterijom *Staphylococcus aureus*.

Osim toga, poređenje dva genoma potvrđuje prisustvo *prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB-orfX* virulentnog genskog klastera, veličine 10 kb, u patogenoj vrsti *L. monocytogenes* (Chakraborty *et al.*, 2000). Den Bakker i saradnici (2010a) podržavaju hipotezu da su sve vrste roda *Listeria* evoluirale od pretka koji je posedovao virulentni *prfA* genski klaster, kao i da su gubitak gena, lateralni genski transfer, rekombinacije, pozitivna selekcija jasno doprineli evoluciji roda *Listeria*.

Analiza nukleotidnih sekvenci otkriva da postoji veliki broj gena koji kodiraju transportne sisteme, transkripcione regulatore, površinske i sekretorne proteine, što je u saglasnosti sa sposobnošću bakterija roda *Listeria* da nastanjuju različite ekosisteme. *L. monocytogenes* EGD poseduje 331 gen koji kodiraju transportne proteine što predstavlja 11.6% svih gena *L. monocytogenes*.

Procenat gena koji spadaju u klasu transkripcionih regulatora kod *L. monocytogenes* je 7.3%, što je veoma slično ubikvitarnoj bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* (8.4%) (Stover *et al.*, 2000). Najbolje okarakterisan regulatorni faktor *L. monocytogenes* - PrfA je član Crp/Fnr familije i nije pronađen kod vrste *L. innocua*. Ovaj faktor aktivira većinu poznatih virulentnih gena na taj način što se vezuje za palindromsku sekvencu (PrfA box) lokalizovanu u promotorskom regionu virulentnog gena (Goebel *et al.*, 2000). Genom *L. monocytogenes* kodira 133 površinskih proteina i 86 sekretornih proteina. Od 133 površinskih proteina, 41 pripada LPXTG proteinskoj familiji od kojih 20 (uključujući InlA) ne postoji u genomu *L. innocua* (Gaillard *et al.*, 1991). Analizom LPXTG proteina, pokazano je da 19 pripada internalin familiji. *L. monocytogenes* poseduje više LPXTG proteina od bilo koje druge Gram-pozitivne bakterije čiji je genom sekvenciran (13 kod *Streptococcus pyogenes* (Ferretti *et al.*, 2001) i 18 kod *Staphylococcus aureus* (Brehm *et al.*, 1999). U genomu *L. monocytogenes* su takođe, okarakterisane sekvence koje kodiraju pet proteina koji sadrže ponovke bogate leucinom, ali ne poseduju LPXTG signal. Jedan od ovih proteina, označen kao InlB (Braun *et al.*, 1997) sadrži GW module i odgovoran je za vezivanje za površinu ćelije, dok se ostala četiri sekretuju van ćelije i imaju ulogu u virulenciji (Domann *et al.*, 1997; Engelbrecht *et al.*, 1996). Ukupno 30 od 133 gena,

koji kodiraju površinske proteine i 23 od 86 gena, koji kodiraju sekretorne proteine, ne postoje u genomu *L. innocua* (22.6% i 26.7%).

Neki od ovih sekretornih proteina *L. monocytogenes* imaju hidrolitičku funkciju ulogu kao što su lipaze ili hitinaze. Sekretorni proteini važni za virulentnost *L. monocytogenes* su: LLO, PlcA, PlcB, InlC (Cossart and Lecuit, 1998; Vazquez Boland *et al.*, 2001). Veći broj gena koji kodira površinske ili sekretorne proteine kod *L. monocytogenes*, u odnosu na *L. innocua*, verovatno omogućava patogenoj bakteriji da interaguje sa različitim površinama u okolnoj sredini i da inficira različite ćelije domaćina (Dussurget *et al.*, 2004).

*L. monocytogenes* poseduje gene odgovorne za rezistentnost na kiseline (npr. geni odgovorni za sintezu glutamat dekarboksilaze (*gad*). Kod vrste *L. innocua* nedostaje jedan od tri *gad* paraloga (*lmo0447*). Za razliku od *L. innocua*, *L. monocytogenes* poseduje tri gena odgovorna za degradaciju žučnih soli (*lmo2067*, *lmo0446*, *lmo0754*), što najverovatnije omogućava bakteriji da preživi u crevima sisara. Obe pomenute vrste imaju enzime koji učestvuju u glikolizi i pentoza fosfatnom putu i imaju sposobnost da proizvode adenozin tri fosfat preko respiratornog lanca i brojnih fermentativnih puteva. Pomenute karakteristike su u saglasnosti sa mikroaerofilnim i fakultativno anaerobnim načinom života bakterija roda *Listeria*.

Rast bakterija roda *Listeria* u određenom medijumu zahteva prisustvo četiri vitamina (riboflavin, biotin, tiamin i lipoat) i šest aminokiselina (Leu, Ile, Arg, Met, Val, Cys) (Premaratne *et al.*, 1991).

Za razliku od metaboličkih puteva sinteze četiri vitamina koji nedostaju ili su nekompletni, putevi biosinteze svih aminokiselina su identifikovani. Smatra se da potreba za aminokiselinama nastaje usled represije nekih puteva biosinteze aminokiselina u laboratorijskim uslovima rasta.

Ukoliko se ne uzmu u obzir geni profaga, broj gena specifičnih za vrstu kod *L. monocytogenes* EGD i *L. innocua* CLIP11262 je 270 (9.5%) i 149 (5%). Geni koji su prisutni kod jedne vrste, ali ne i kod druge, razbacani su u višestrukim regionima između 1 i 25 kb na hromozomu (100 kod *L. monocytogenes* i 63 kod *L. innocua*).

Analiza nukleotidnih sekvenci dva genoma *Listeria* ukazuje na blisku povezanost sa *B. subtilis*, i pretpostavlja se da su se ove tri vrste razvile od zajedničkog pretka.

### 2.1.7. Preživljavanje i umnožavanje *Listeria* sp. pod uticajem spoljašnjih stresnih uslova

*L. monocytogenes* se razlikuje od drugih patogena hrane u tome što može: da toleriše visoke koncentracije soli (do 20%), da se umnožava u širokom opsegu temperature (od -1.5 do 45°C), kao i da se prilagodi i preživi kiselinški stres.

*L. monocytogenes* je sposobna da preživi duži vremenski period pod nepovoljnim spoljašnjim uslovima iako nema sposobnost formiranja spora i kapsule (Watkins and Sleath, 1981). Smatra se da i druge vrste roda *Listeria* pokazuju rezistentnost na spoljašnji stres (kislina, soli, temperaturu itd.), slično kao i *L. monocytogenes*. *L. innocua* i druge vrste roda *Listeria* se slično *L. monocytogenes* mogu naći u hrani (Antoniollo *et al.*, 2003) i industrijskom okruženju (Rahman *et al.*, 1985).

Eksperimentalne studije zasnovane na komparativnoj analizi rezistentnosti na stres između *L. monocytogenes* i drugih vrsta roda *Listeria* uključujući preživljavanje i rast pri stresnim temperaturama (Phan Thanh and Gormon, 1995), stresnim koncentracijama soli (Begley *et al.*, 2002), niskoj aktivnosti vode (Nolan *et al.*, 1992), u prisustvu različitih antibakterijskih agenasa (Troxler *et al.*, 2000) i pod različitim kombinacijama stresnih uslova (Le Marc *et al.*, 2002), pokazuju da sve vrste roda *Listeria* imaju slične rezistentne karakteristike u odnosu na stres.

Sekvenciranje genoma jednog soja *L. monocytogenes* i jednog soja *L. innocua* (Glaser *et al.*, 2001) ukazuje da ove dve vrste imaju veliki broj zajedničkih gena koji su odgovorni za sintezu različitih komponenti sistema stresa, kao što su regulatorni proteini, transportni proteini i transkripcioni regulatori (Buchrieser *et al.*, 2003; Glaser *et al.*, 2001).

## 2.2. Intraćelijski infektivni ciklus

Bakterije roda *Listeria* su fakultativni intraćelijski paraziti koji imaju sposobnost da inficiraju makrofage i različite tipove normalno nefagocitnih ćelija. U nefagocitne ćelije spadaju: epitelijalne ćelije (Gaillard *et al.* 1987; Mengaud *et al.*, 1996; Portnoy *et al.*, 1988), fibroblasti (Sun *et al.*, 1990), hepatociti (Dramsi *et al.*, 1995; Gregory *et al.*,

1996; Wood *et al.*, 1993), endotelijalne ćelije (Drevets *et al.*, 1995; Greiffenberg *et al.*, 2000; Parida *et al.*, 1998) i različiti tipovi nervnih ćelija (Dramsi *et al.*, 1998).

Infekcija bakterijom *L. monocytogenes* se odigrava u nekoliko koraka:

1. adhezija i internalizacija patogena
2. izlazak bakterije iz fagocitne vakuole
3. umnožavanje bakterije u citolazmi ćelije domaćina
4. intraćelijska pokretljivost
5. formiranje protruzija
6. fagocitoza struktura koje liče na pseudopodije, od strane susednih ćelija, pri čemu se formiraju sekundarne vakuole i započinje novi ciklus.

Smatra se da je primarno mesto infekcije intestinalni epitel gde bakterija "napada" nefagocitne ćelije preko "zipper" mehanizma. Ukoliko prođe intestinalnu barijeru, bakterija putem krvi ili limfe dospeva do mezenteričnih limfnih čvorova, slezine i jetre (Marco *et al.*, 1992; Pron *et al.*, 1998; Orsi *et al.*, 2011).

Mehanizam ulaska bakterije podrazumeva prepoznavanje određenih bakterijskih molekula i različitih eukariotskih receptora. Identifikovani eukariotski receptori su: transmembranski glikoprotein E-kaderin (Mengaud *et al.*, 1996), receptor komplementa C1q (Braun *et al.*, 2000), Met receptor (Shen *et al.*, 2000), komponente ekstraćelijskog matriksa kao što su heparin sulfat proteoglikani (Alvarez Domínguez *et al.*, 1997a) i fibronektin (Gilot *et al.*, 1999). Svi bakterijski ligandi, identifikovani do danas, su površinski proteini (internalin A, internalin B, aktin polimerišući protein ActA i p60). Međutim, noviji podaci ukazuju da su u opisani proces uključeni i površinski adhezioni molekuli, kao što su Ami protein (autolizin sa karboksi-terminalnim domenom odgovornim za ukotvljavanje u ćelijski zid, slično InlB proteinu) (Braun *et al.*, 1997; McLaughlan and Foster, 1998; Miller and Britigan, 1997), Lap protein, 104 kDa površinski protein bitan u vezivanju *Listeria* za Caco-2 ćelije (Santiago *et al.*, 1999), 24.6 kDa fibronektin vezujući protein (Gilot *et al.*, 1999) i lektini (Ofek and Sharon, 1988).

Posle procesa internalizacije, bakterije se nalaze u fagocitnoj vakuoli (Gaillard *et al.*, 1987). Ubrzo posle toga sastav vakuole postaje kiseo (Beauregard *et al.*, 1997), čime se sprečava sazrevanje fagozoma u fagolizozom (Alvarez Domínguez *et al.*, 1997b).

Posle 30 minuta, nastupa liza fagozomne membrane (Gaillard *et al.*, 1987), a u periodu od 2 h oko 50% intraćelijske bakterijske populacije se osloboda u citoplazmu (Tilney and Portnoy, 1989). Ovaj korak je od bitnog značaja za preživljavanje i umnožavanje same bakterije (Goebel and Kreft, 1997), a posredovan je učešćem hemolizina u kombinaciji sa fosfolipazama.

Neposredno posle ulaska u citoplazmu, bakterije su okružene fibrilarnim materijalom, izgrađenim od aktinskih filamenata, koji se kasnije na jednom kraju bakterije preobražavaju u aktinski rep. Bakterije se potom kreću napred brzinom 0.3  $\mu\text{m/s}$  (Tilney and Porthoy, 1989; Dabiri *et al.*, 1990; Theriot *et al.*, 1992) i dolaze u kontakt sa plazma membranom gde indukuju formiranje prstenastih protruzija. Kontakt između ovih struktura i susednih ćelija rezultuje u internalizaciji protruzije. U novoj inficiranoj ćeliji, bakterija je okružena sa dve plazma membrane koje moraju biti lizirane da započnu novi ciklus umnožavanja i pokretljivosti. Kada bakterije roda *Listeria* jednom uđu u citoplazmu, mogu da napadaju druge ćelije, izbegavajući odbrambeni sistem domaćina kao što su sinteza antitela i sistem komplementa. Pomenute činjenice ukazuju da se odbrana domaćina zasniva na T ćelijskom odgovoru (Cossart and Lecuit, 1998).

### 2.2.1. Molekularne determinante uključene u adheziju i invaziju eukariotskih ćelija

Primarni faktori koji učestvuju u bakterijskoj invaziji ciljnih ćelija su InlA i InlB protein (Dramsi *et al.*, 1995; Gaillard *et al.*, 1991). Ćelijski receptori InlA i InlB su identifikovani, a molekularna signalna kaskada koja se dešava pri ulasku bakterije u ćeliju domaćina je detaljno okarakterisana (Bierne and Cossart, 2002; Cossart *et al.*, 2003). Međutim, noviji podaci ukazuju da postoje i drugi molekuli neophodni za proces adhezije i/ili internalizacije (Dussurget *et al.*, 2004).

#### 2.2.1.1. Internalin: LPXTG protein odgovoran za ulazak u epitelijalne ćelije igra ključnu ulogu u prolaženju kroz intestinalnu barijeru

Internalin pripada grupi proteina označenoj kao internalin familija, koja se karakteriše ponovcima bogatim leucinom (LRR) (Cabanes *et al.*, 2002; Gaillard *et al.*,

1991). Internalin, molekul od 800 aminokiselina, poseduje klasičnu signalnu sekvencu na koju se nadovezuje region bogat leucinom. Sačinjen je od 15 ponovaka od po 22 aminokiseline. Zatim, sledi među-region (inter-repeat) koji razdvaja prvi region bogat leucinom od drugog, označenog kao B region.

Karboksi-terminalni domen proteina poseduje LPXTG motiv koji je vezan za ćelijski zid. Ovakav tip karboksi-terminalnog domena je nađen u više od 50 Gram-pozitivnih površinskih bakterijskih proteina (Fischetti *et al.*, 1990) i obezbeđuje da se protein kovalentno veže sa peptidoglikanom, posle cepanja T-G veze (Schneewind *et al.*, 1995). Region bogat leucinom i među-region su neophodni i dovoljni da obezbede ulazak u humane epitelijalne ćelije (Lecuit *et al.*, 1997).

E-kaderin predstavlja receptor za InlA protein (Mengaud *et al.*, 1996). Receptor pripada kaderin superfamiliji ćelijskih adhezionih molekula, koji predstavljaju transmembranske glikoproteine primarno lokalizovane na adhezionim vezama među susednim ćelijama, doprinoseći adheziji zavisnoj od kalcijuma. Prva dva ekstraćelijska domena E-kaderina su odgovorna za uspostavljanje direktnog kontakta među susednim ćelijama, dok intraćelijski domen kroz interakciju sa kateninima ukotvljava adhezivni kompleks sa površinskim aktinskim citoskeletom (Dussurget *et al.*, 2004).

Interakcija između InlA proteina i E-kaderina je specifična za vrstu i podrazumeva prepoznavanje aminokiseline prolin na poziciji 16 (Pro<sup>16</sup>) prvog ekstraćelijskog domena (EC1) E-kaderin molekula. Mišiji E-kaderin na poziciji 16 ima glutamat tako da ne postoji InlA zavisni ulazak bakterija roda *Listeria* (Lecuit *et al.*, 1999).

Gen koji kodira InlB protein, drugi član internalin familije, je lociran u istom operonu kao i *inlA* (Gaillard *et al.*, 1991). InlB protein (veličine 630 aminokiselina) je odgovoran za ulazak bakterija u hepatocyte i neepitelijalne ćelije (Dramsi *et al.*, 1995). Amino-terminalni domen InlB proteina sadrži klasičnu signalnu sekvencu. Zatim sledi sedam ponovaka bogatih leucinom, jedan među-region i B region sa jednim ponovkom. Karboksi-terminalni domen poseduje tri tandem ponovka od oko 80 aminokiselina koji počinju sekvencom GW (otuda i naziv GW moduli). Tandem ponovci učestvuju u vezivanju InlB za bakterijski ćelijski zid posredstvom nekovalentnih interakcija sa lipoteihoičnom kiselinom (Jonquieres *et al.*, 1999).



Den Bakker i saradnici (2010b) su u svojim rezultatima ukazali da avirulentnom, atipičnom, hemolitičnom soju *L. innocua* J1023 u okviru *inlAB* regiona nedostaje *inlB*. Ovaj atipični, hemolitični soj *L. innocua* (J1023) ima sposobnost invazije epitelijskih intestinalnih Caco-2 ćelija sličnu soju *L. monocytogenes* 10403S.

Hepatocitni faktor rasta (scatter factor receptor) ili Met protein je identifikovan kao glavni receptor InlB proteina na ciljnim ćelijama (Shen *et al.*, 2000).

Optimalna aktivnost Met proteina kada je aktiviran prirodnim ligandom, zahteva prisustvo glikozaminoglikana (GAG) na površini eukariotskih ćelija koji povećavaju ulazak bakterija u ciljne ćelije. Zanimljivo je da GW moduli posreduju u interakciji između InlB proteina i glikozaminoglikana čime se obezbeđuje sinergija između amino- i karboksi-terminalnih domena InlB proteina u toku ćelijske invazije (Dussurget *et al.*, 2004).

Osim Met proteina, identifikovan je još jedan receptor za vezivanje InlB proteina, a to je globularni deo komponente komplekta C1q (gC1q-R) /p32 (Braun *et al.*, 2000).

Molekuli bitni za promene koje se dešavaju na nivou citoskeleta u putu zavisnom od prisustva InlB proteina su: kompleks koji polimerizuje aktinske molekule ćelije domaćina Arp2/3, aktin depolimerišući faktor/kofilin, LIM kinaza koja katalizuje fosforilaciju i inaktivaciju kofilina i mala GTP-aza Rac (Bierne *et al.*, 2001).

U putu zavisnom od InlB proteina dolazi do aktivacije PLC- $\gamma$  1, nizvodno od PI 3-kinaze, mada inaktivacija ovog enzima ne utiče na bakterijski ulazak, ukazujući da se aktivacija proteina posredovana prisustvom PLC- $\gamma$  1 i mobilizacija kalcijuma iz intraćelijskih delova dešava u postinternalizacionim koracima (Bierne *et al.*, 2000). Drugi događaji nizvodno od interakcije InlB proteina sa ciljnim ćelijama podrazumevaju aktivaciju MAP kinaznog puta (Ras-mitogen activated protein) (Copp *et al.*, 2003) u epitelijskim ćelijama i aktivaciju NF- $\kappa$ B u makrofazima (Mansell *et al.*, 2000) preko Ras, PI 3-kinaze i Akt proteina (Mansell *et al.*, 2001).

#### 2.2.1.2. p60: Hidrolaza ćelijskog zida uključena u virulentnost

p60 je ekstraćelijski protein, veličine 60 kDa, koji sadrži klasičnu signalnu sekvencu na svom amino-terminalnom domenu. Klasičnu signalnu sekvencu prati region sa SH<sub>3</sub> domenom čiji funkcionalni značaj još nije utvrđen (Wuebscher *et al.*,

1993). Centralni deo p60 proteina sadrži seriju treonin-asparaginskih ponovaka (Bubert *et al.*, 1992).

Karboksi-terminalni domen poseduje deo sa hidrolaznom aktivnošću specifičnom za murein (Wuebscher *et al.*, 1993). Gen koji kodira p60 protein, označen kao *iap* (invasion-associated protein) (Kuhn and Goebel, 1989), je idealan kandidat za detekciju bakterija roda *Listeria* jer je visoko konzervisan među vrstama koje pripadaju ovom rodu (Hein *et al.*, 2001).

Ekspresija *iap* gena je nezavisna od PrfA (Bubert *et al.*, 1997, 1999) i kontrolisana je na posttranskripcionom nivou (Köhler *et al.*, 1991).

#### 2.2.1.3. FbpA: Multifunkcionalni površinski protein bez signalne sekvence

FbpA je protein veličine 570 aminokiselina koji pokazuje visoku homologiju sa fibronektin-vezujućim proteinima kao što su PavA kod *Streptococcus pneumoniae*, Fbp54 kod *S. pyogenes* i FbpA kod *S. gordonii*. FbpA protein vrste *L. monocytogenes* ne poseduje klasičan signalni peptid i nalazi se na površini bakterije (Dramsi *et al.*, 2004).

FbpA modulira nivo listeriolizina O i InlB proteina na posttranskripcionom nivou (Dramsi *et al.*, 2004), što ukazuje na činjenicu da FbpA protein može da funkcioniše kao šaperon sprečavajući degradaciju nekih virulentnih proteina (Dussurget *et al.*, 2004).

#### 2.2.1.4. LLO: Toksin i mogući signalni molekul

Listeriolizin O (LLO) je član citolizin familije zavisne od holesterola koji ima sposobnost formiranja pora. LLO je sekretorni protein, veličine 60 kDa, odgovoran za izlazak bakterija roda *Listeria* iz primarnih i sekundarnih vakuola (Cossart *et al.*, 1989; Dramsi and Cossart, 2002; Katarious *et al.*, 1987; Portnoy *et al.*, 1988).

Nakon LLO stimulacije, detektovani su sledeći ćelijski odgovori: sekrecija interleukina-1 u makrofazima (Yoshikawa *et al.*, 1993), aktivacija proteina uzrokovana dejstvom kinaze u prisustvu mitogena u HeLa ćelijama (Tang *et al.*, 1996), indukcija apoptoze (Guzman *et al.*, 1996), ekspresija ćelijskih adhezionih molekula na inficiranim endotelijalnim ćelijama (Krull *et al.*, 1997), degranulacija ili formiranje leukotriena u

neutrofilnim i endotelijalnim ćelijama (Sibelius *et al.*, 1996, 1999), ekzocitoza mucina u polarizovanim intestinalnim sekretornim ćelijama (Coconnier *et al.*, 1998, 2000), sekrecija različitih citokina u ćelijama slezine (Kohda *et al.* 2002; Nishibori *et al.*, 1996) i signalna kaskada posredovana NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) u humanim embrionalnim ćelijama bubrega (Kayal *et al.*, 2002). Većina opisanih puteva su zavisni od jona  $\text{Ca}^{2+}$ .

LLO oligomerizuje i formira pore propustljive za jone  $\text{Ca}^{2+}$  dovodeći do intraćelijskih oscilacija u količinama jona  $\text{Ca}^{2+}$  (Repp *et al.*, 2002). Osim toga, prisustvo ekstraćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$  (ali ne i intraćelijskog) ubrzava ulazak bakterija u Hep-2 ćelije (Dramsai and Cossart, 2003). Ćelijski receptor za LLO je holesterol (Coconnier *et al.*, 2000).

#### 2.2.1.5. Faktori odgovorni za izlazak iz intraćelijskih vakuola

LLO je primarni molekul odgovoran za izlazak bakterija roda *Listeria* iz primarnih i sekundarnih intraćelijskih vakuola (Portnoy *et al.*, 1988; Gedde *et al.*, 2000). Bakterije roda *Listeria* sekretuju i dve fosfolipaze C uključene u lizu intraćelijskih vakuola (Goldfine and Wadsworth, 2002).

PI-PLC enzim (Leimeister Wachter *et al.*, 1991, Mengaud *et al.*, 1991a) je specifičan za fosfatidilinozitol (PI) i proteine koji se ukotvljuju u prisustvu glikozilfosfatidila. Drugi enzim je fosfatidilholin fosfolipaza C (PC-PLC). Molekul se sintetiše kao proenzim, a sazreva pod dejstvom metaloproteaze koju kodira *mpl* gen (Domann *et al.*, 1991; Mengaud *et al.*, 1991b). PC-PLC enzim može da hidrolizuje različite fosfolipide uključujući sfingomijelin. Oba enzima deluju sinergistički sa LLO u toku lize primarnih i sekundarnih vakuola (Camilli *et al.*, 1993; Gedde *et al.*, 2000).

U odsustvu LLO, PC-PLC može da obezbedi lizu primarnih vakuola u humanim epitelijalnim ćelijskim linijama (Grundling *et al.*, 2003; Marquis *et al.*, 1995). U sinergističkom dejstvu sa LLO, PI-PLC indukuje hidrolizu fosfatidilinozitola i produkciju diacilglicerola u makrofazima (Goldfine *et al.*, 2000; Sibelius *et al.*, 1996), dovodeći do mobilizacije protein kinaze C  $\delta$  i dalje promene nivoa intraćelijskog kalcijuma (Wadsworth and Goldfine, 2002).

#### 2.2.1.6. ActA: Površinski aktin-polimerišući protein

ActA protein je odgovoran za pokretljivost bakterija roda *Listeria* zavisnu od aktina (Kocks *et al.*, 1992). Literaturni podaci ukazuju da je ActA protein bitan i za vezivanje i ulazak bakterija u ciljne ćelije (Alvarez Dominguez *et al.*, 1997a; Suarez *et al.*, 2001).

ActA je protein veličine 639 aminokiselina koji poseduje signalnu sekvencu na amino-terminalnom domenu i transmembranski motiv na njegovom karboksi-terminalnom domenu čija je funkcija da usidri molekul za bakterijsku površinu (Domann *et al.*, 1992 ; Kocks *et al.*, 1992).

Centralni domen proteina koji sadrži četiri ponovka bogata prolinom stimuliše pokretljivost bakterija roda *Listeria* zavisnu od aktina (Lasa *et al.*, 1995). Naime, centralni domen vezuje članove Ena/VASP familije proteina (enabled/vasodilatator-stimulated phosphoprotein) (Chakraborty *et al.*, 1995; Niebuhr *et al.*, 1997) koji utiču na brzinu i usmerenost bakterije (Auerbuch *et al.*, 2003; Geese *et al.*, 2002; Laurent *et al.*, 1999). Ponovci bogati prolinom i karboksi-terminalni domen proteina poseduju značajnu sličnost u sekvenci sa eukariotskim proteinom ziksinom (Golsteyn *et al.*, 1997). Amino-terminalni domen ActA proteina (aminokiseline na poziciji od 31 do 263) ima funkciju da sam indukuje bakterijsku pokretljivost (Lasa *et al.*, 1997). Ovaj domen vezuje i aktivira Arp2/3 koji indukuje polimerizaciju aktina i razgranati raspored aktinskih filamenata. Na ovaj način, ActA pokreće WASP (Wiskont-Aldrich syndrome protein) familiju proteina (Boujemaa-Paterski *et al.*, 2001; Skoble *et al.*, 2000). Amino-terminalni domen ActA proteina pokazuje 25% identičnosti sa karboksi-terminalnim domenom (aminokiseline 879-1066) eukariotskog proteina vinkulina koji je uključen u citoskeletnu organizaciju (Gilmore and Burridge, 1996; Lasa *et al.*, 1998).

Kod bakterija roda *Listeria*, aktinski filamenti u repovima su, slično kao i kod bakterija roda *Shigella*, razgranati. Suprotno, kod bakterije *Rickettsia conorii*, aktinski filamenti su duži i nerazgranati (Gouin *et al.*, 1999, 2004).

#### 2.2.1.7. Hpt: Sistem potreban za intraćelijsku replikaciju

Malo se zna o mehanizmima koje koriste bakterije roda *Listeria* da bi dobile hranljive materije iz citoplazme ćelije domaćina. *L. monocytogenes* koristi glukozu-1-fosfat, fosfatni šećer dostupan u citoplazmi. Proces se odnosi na ekspresiju fosfatnog

transportera zavisnog od PrfA transkripcionog faktora u prisustvu heksoze (Hpt). Opisani proces doprinosi bakterijskoj intraćelijskoj replikaciji i neophodan je za umnožavanje u mišijim organima (Chico Calero *et al.*, 2002). Hpt permeaza je strukturni i funkcionalni homolog eukariotskog glukoza-6-fosfatnog transportera (G6P) koji je odgovoran za transport G6P iz citoplazme u endoplazmatski retikulum (Dussurget *et al.*, 2004).

#### 2.2.1.8. PrfA regulon

Većina gena koji kodiraju virulentne faktore *L. monocytogenes* obuhvataju klaster region od 10 kb na hromozomu. Virulentni genski klaster bakterija roda *Listeria* je kratak, ima isti GC sadržaj kao ostatak hromozoma i ne postoji kod nepatogenih vrsta (Gouin *et al.*, 1994).

Najvažniji virulentni geni bakterija roda *Listeria* (npr. *prfA*, *plcA*, *hlyA*, *mpl*, *actA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC* i *htp*) su regulisani transkripcionim aktivatorom PrfA (Leimeister Wachter *et al.*, 1990; Mengaud *et al.*, 1991c). PrfA je protein koji sadrži 233 aminokiseline i pripada Crp/Fnr familiji.

Geni koje reguliše PrfA regulator sadrže vezujuće mesto u -41 regionu, označeno kao PrfA box. Identifikovane su tri grupe gena regulisane PrfA regulonom. Prvu grupu čine *prfA*, *plcA*, *hlyA*, *mpl*, *actA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *htp*, *prsA* i *lmo0788*. Geni ove grupe su pozitivno regulisani PrfA regulatorom kada se ćelije gaje u BHI (brain heart infusion) medijumu. BHI medijum koji sadrži aktivni ugalj (BHIC) povećava aktivnost ovih gena na viši nivo usled povećane produkcije hemolizin lecitinaze. Međutim, ova grupa gena nije aktivirana u BHI medijumu koji sadrži celobiozu (BHICel). Celobioza je šećer koji smanjuje ekspresiju virulentnih faktora kao što su LLO, PlcA i PlcB. Druga grupa sadrži 8 gena koji su pod represijom PrfA regulatora u sve tri vrste medijuma. Treću grupu čini 53 gena i oni su aktivirani u BHI medijumu koji sadrži celobiozu (BHICel), ali ne i u medijumu koji sadrži aktivni ugalj. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da PrfA protein deluje i kao aktivator i kao represor (Dussurget *et al.*, 2004).

### 2.2.1.9. Nove virulentne determinante *Listeria monocytogenes*

Za ukotvljavanje površinskih proteina i virulentnost *L. monocytogenes* su odgovorni enzimi sortaze tj. transpeptidaze. Analizom nukleotidne sekvence je pokazano da genom *L. monocytogenes* poseduje dva gena odgovorna za sintezu sortaza (Bierne *et al.*, 2002).

Prvi gen, *srtA* kodira sortazu odgovornu za ukotvljavanje InlA proteina za peptidoglikan (Bierne *et al.*, 2002). Drugi gen, *srtB*, kodira sortazu SrtB, odgovornu za ukotvljavanje ograničenog broja površinskih proteina koji sadrže NXXTN motiv na karboksi-terminalnom domenu (Bierne *et al.*, 2004). Jedan od proteina koji se ukotvljuju u prisustvu SrtB proteina je SvpA, površinski protein koji omogućava izlazak bakterija roda *Listeria* iz fagozoma makrofaga (Borezee *et al.*, 2001).

Za invaziju eukariotskih ćelija i virulentnost je odgovoran novi tip GW površinskog proteina sa autolitičkom aktivnošću, Auto (Cabanès *et al.*, 2004). *L. innocua* ne poseduje gen koji kodira Auto protein, a novije studije ukazuju i da soj *L. monocytogenes* 4b ne poseduje *aut* gen (Dussurget *et al.*, 2004).

Novi tip virulentnog faktora koji obezbeđuje preživljavanje bakterija roda *Listeria* je i hidrolaza žučnih soli. Komparativna analiza genoma *L. monocytogenes* i *L. innocua* je pokazala da *L. innocua* ne poseduje gen koji kodira hidrolazu žučnih soli (BSH), enzim odgovoran za dekonjugaciju konjugovanih žučnih soli (Dussurget *et al.*, 2002). Hidrolaze žučnih soli proizvode bakterije normalne enterične mikroflore npr. *Bacteroides*, *Clostridium* i *Enterococcus* kao i bakterije mlečne kiseline *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Smatra se da je hidroliza mehanizam koji štiti bakterije od toksičnosti žučnih soli. Enterične bakterije i crevni patogeni koriste i druge strategije kao što su: sinteza porina, transportera, efluks pumpe ili sinteza lipopolisaharida (Gunn, 2000).

Gen odgovoran za sintezu hidrolaza žučnih soli, *bsh*, je pod kontrolom sigma B faktora i pozitivno je regulisan od strane transkripcionog aktivatora poznatih virulentnih gena *L. monocytogenes* – PrfA (Dussurget *et al.*, 2002; Milohanic *et al.*, 2003). Gen *bsh* i BSH aktivnost, poseduju humane patogene vrste roda *Listeria*, što ukazuje na vezu između otpornosti bakterija roda *Listeria* na prisustvo žučnih soli i njihovu sposobnost da kolonizuju i inficiraju ljude.

## 2.3. Ekologija *Listeria* sp. i *Listeria monocytogenes*

Vrste roda *Listeria* su široko rasprostranjene u veoma različitim staništima kao što su zemljište (Weis and Seeliger, 1975), voda (Watkins and Sleath, 1981), vegetacija (Weis and Seeliger, 1975; Welshimer and Donker Voet, 1971), zagađene vode (al-Ghazali and al-Azawi, 1988), stočna hrana (Caro *et al.*, 1990), industrijski pogoni (Destro *et al.*, 1996) i farme (Dijkstra, 1975; Kimura, 2006).

*L. monocytogenes*, patogeni predstavnik roda, je ubikvitaran mikroorganizam koji ima sposobnost da se umnožava u različitim staništima (Kimura, 2006) i preživi nepovoljne uslove duže nego druge nesporogene bakterije (Fenlon, 1999; Mitscherlich and Marth, 1984).

Mada je njena geografska rasprostranjenost opisana kao ubikvitarna, češće se pojavljuje u umerenim nego u suptropskim i tropskim regionima (Radojičić *et al.*, 2011).

### 2.3.1. *Listeria monocytogenes* u hrani

Prenošenje *L. monocytogenes* hranom zvanično je mikrobiološki i epidemiološki ustanovljeno 1980. godine za vreme epidemije u Novoj Škotskoj, Kanada (Schlech *et al.*, 1983). Od tada su epidemiološka istraživanja u više navrata ukazivala da je konzumiranje zaražene hrane primarni način prenošenja *L. monocytogenes* (Goulet *et al.*, 1995; Salvat *et al.*, 1995; Loncarevic *et al.*, 1997).

*L. monocytogenes* se može naći u različitim namirnicama. Tabela 2.3.1. predstavlja konkretne studije rasprostranjenosti *L. monocytogenes*, urađene na konkretnim proizvodima u različitim zemljama. Studije ukazuju da je zastupljenost *L. monocytogenes* u živinskom mesu veća od 50% analiziranih uzoraka (Lawrence and Gilmour, 1994; Miettinen *et al.*, 2001b), ali nije zanemarljiva ni kontaminacija goveđeg i svinjskog mesa (Buncic, 1991; MacGowan *et al.*, 1994; Heredia *et al.*, 2001). Smatra se da je u domaćinstvima visoka incidenca *L. monocytogenes* u živinskom mesu posledica moguće unakrsne kontaminacije sa drugim namirnicama, kao i sposobnost bakterije da preživi neadekvatnu termičku obradu (Ceylan *et al.*, 2008). Takođe, *L. monocytogenes* je prisutna i u sirovoj ribi i mleku, ali je njena rasprostranjenost u pomenutim namirnicama značajno niža nego u živinskom, goveđem ili svinjskom mesu

(Husu *et al.*, 1990; Rea *et al.*, 1992; Johansson *et al.*, 1999; Jayarao and Henning, 2001). "Ready to eat" hrana (hrana spremna za jelo - gotova hrana) se smatra hranom visokog rizika u odnosu na *L. monocytogenes*. Međutim, "Ready to eat" hrana predstavlja grupu različitih proizvoda, tako da rasprostranjenost *L. monocytogenes* u "Ready to eat" hrani može da varira. U okviru 20 kategorija "Ready to eat", koje su analizirane 2001. godine, konzumiranje suvomesnatih proizvoda je prouzrokovalo najveći broj slučajeva listerioze, pa se zbog toga smatra namirnicom najvećeg rizika u odnosu na pomenuto oboljenje (U. S. Food and Drug Administration, the Food Safety and Inspection Service, 2001; Vorst *et al.*, 2006a). Procesi manipulacije hranom (npr. obrada na uređaju za narezivanje) predstavljaju visok rizik od kontaminacije *L. monocytogenes* (Uyttondaele *et al.*, 1999). Podaci ukazuju da je kontaminacija bakterijom *L. monocytogenes* u toku procesa narezivanja suvomesnatih proizvoda sedam puta veća u navedenim proizvodima nego u prethodno obrađenim (isečenim) i upakovanim mesnim proizvodima (Gombas *et al.*, 2003).

Zastupljenost *L. monocytogenes* u ribljim proizvodima može da bude visoka s obzirom da temperatura koja se koristi u procesu hladnog dimljenja ne može da uništi bakteriju. Keto i Rahkio su 1998. godine ukazali na visoku zastupljenost *L. monocytogenes* u vakuumiranim proizvodima od ribe.

U odnosu na mlečne proizvode, meki sir se smatra visoko osetljivom namirnicom na prisustvo *L. monocytogenes*, mada se može naći i u drugim vrstama sireva i proizvodima od mleka.

U hrani se listerije inaktivišu najčešće kuvanjem ili pasterizacijom. Ako je broj bakterija veliki, listerije mogu preživeti neke forme pasterizacije, što predstavlja dodatni rizik za ljude. Broj bakterija u proizvodima može da se smanji izlaganjem ozonu, hlor – dioksidu, hlorisanom trinatrijum – fosfatu, kao i kombinaciji 1,5 % mlečne kiseline i 1,5 % vodonik peroksida tokom 15 min na 40 °C (Radojičić *et al.*, 2011).



Tabela 2.3.1. Rasprostranjenost *L. monocytogenes* u goveđem, svinjskom, pilećem mesu, ribi i mlečnim proizvodima (Lundén, 2004).

Proizvod	Zemlja	Rasprostranjenost %
<b>Sirovo meso</b>		
<b>Goveđe</b>	V. Britanija	35
	Meksiko	16
	Švajcarska	6.3
<b>Svinjsko</b>	V. Britanija	28
	Švajcarska	4.5
<b>Mleveno goveđe i svinjsko</b>	Jugoslavija	69
<b>Prerađeno meso</b>		
<b>Kobasice</b>	Italija	14
	Amerika	7.5
<b>Toplo dimljeno</b>	Jugoslavija	21
<b>Pašteta</b>	Španija	5.4
<b>Fermentisani proizvodi</b>	Amerika	3.3
<b>Različiti proizvodi</b>	Amerika	3.1
	Španija	9.2
<b>“Ready to eat” proizvodi</b>	Finska	2
	Francuska	22
	Kanada	33
	Amerika	ND
	Novi Zeland	1.8
<b>Sirovo meso</b>		
<b>Piletina</b>	Finska	27
<b>(spremna za pečenje)</b>	Finska	62
	Portugalija	41
<b>Trupovi</b>	Severna Irska	59
	Belgija	30
	Španija	32
<b>Prerađeno meso</b>		
<b>Piletina (pečena)</b>	Novi Zeland	13
	Severna Irska	ND
<b>Piletina i ćuretina</b>	Belgija	25

<b>Proizvod</b>	<b>Zemlja</b>	<b>Rasprostranjenost %</b>
<b>Ćuretina</b>	Novi Zeland	ND
<b>Kobasice</b>	Danska	8.8
<b>Kuvani proizvodi</b>	Amerika	2.1
<b>Sveža riba</b>	V. Britanija	13
	Finska	ND
<b>Prerađena riba</b>	Švajcarska	26
	Island	26
	Švedska	21
<b>Marinirana</b>	Finska	23
	Finska	33
	Finska	50
	Finska	6
	Švajcarska	14
	Švedska	12
	Finska	14
	Finska	15
<b>Hladna-dimljena</b>	Finska	17
	Španija	22
	Španija	27
	Finska	4
	Finska	13
	Švajcarska	9
<b>Toplo-dimljeno</b>	Švedska	1.5
	Finska	ND
	Finska	1
	Finska	2
	Island	16
<b>“Ready to eat” proizvodi</b>	Novi Zeland	26
	Kanada	0.3
	Kanada	ND
<b>Mleko</b>	Mađarska	3.8
<b>Sirovo mleko</b>	V. Britanija	3.6
	Finska	1.7
	Irska	4.9
<b>Pasterizovano mleko</b>	V. Britanija	1.1

<b>Proizvod</b>	<b>Zemlja</b>	<b>Rasprostranjenost %</b>
<b>Mlečni proizvodi</b>	Mađarska	ND
	Italija	1.6
<b>Meki sir</b>	V. Britanija	5.9
	Norveška	11
	Engleska	0.4
	Australija	3.4
	Finska	ND
	Evropa	6.3
	<b>Polu-meki sir</b>	Mađarska
Evropa		7.6
<b>Meki i polu-meki sir</b>	Irska	ND
	Švedska	6
<b>Sveži sir</b>	Finska	ND
	Finska	2.5
	Finska	ND
<b>Tvrđi sir</b>	Mađarska	ND
	Evropa	4.4
<b>Sladoled</b>	V. Britanija	2.0
	Finska	ND
	Finska	0.5

ND = nije detektovana

*Ready to eat* (RTE) = hrana spremna za jelo, gotova hrana

### 2.3.2. *Listeria monocytogenes* u industrijskim pogonima

*L. monocytogenes*, prisutna kao kontaminant industrijskih pogona, se može naći u sirovinama, u samom okruženju objekta, na opremi i finalnom proizvodu.

*L. monocytogenes* je identifikovana u prostorijama gde se rukuje sirovinama kao i u prostorijama u kojima se čuvaju namirnice posle termičke obrade.

Rasprostranjenost *L. monocytogenes* u mnogome zavisi od vrste industrijskog pogona, tipa prostorije i da li su ispitivanja higijenskog statusa izvršena pre ili posle čišćenja prostorija (Lundén, 2004).

#### 2.3.2.1. Putevi i mesta kontaminacije bakterijom *Listeria monocytogenes*

Studije kontaminacije bakterijom *L. monocytogenes* se vrše u cilju dobijanja informacija o mestima i putevima prenošenja ove bakterije u industrijskim pogonima kao i u cilju sprečavanja kontaminacije finalnih proizvoda (Rørvik *et al.*, 1995; Autio *et al.*, 1999; Miettinen *et al.*, 1999a, 2001a; Norton *et al.*, 2001; Hoffman *et al.*, 2003; Lianou and Sofos, 2007; Porsby *et al.*, 2008).

Sirovine predstavljaju primarni izvor kontaminacije u industrijskim pogonima (Lawrence and Gilmour, 1994; Berrang *et al.*, 2002). Međutim, Hoffman i saradnici (2003) smatraju da kontinuirana kontaminacija samog industrijskog pogona nastaje kao posledica već prisutnih sojeva *L. monocytogenes*, kao i da ovi sojevi predstavljaju izvor kontaminacije finalnih proizvoda (Norton *et al.*, 2001). Molekularne studije (Rørvik *et al.*, 1995; Nesbakken *et al.*, 1996; Autio *et al.*, 1999; Tkáčiková *et al.*, 2000; Norton *et al.*, 2001; Hoffman *et al.*, 2003) su pokazale da sojevi izolovani iz industrijskih pogona i finalnih proizvoda nisu identični izolatima koji potiču iz sirovina.

Mestima kontaminacije u različitim pogonima (za preradu mesa, ribe, mleka) se smatraju: pokretne trake, uređaji za narezivanje, uređaji za pakovanje, hladnjaci, frižideri (Autio *et al.*, 1999; Miettinen *et al.*, 1999a; Hoffman *et al.*, 2003). Tipizacijom sojeva je utvrđeno da su izolati identifikovani na različitim uređajima u pogonu identični izolatima identifikovanim u finalnim proizvodima (Nesbakken *et al.*, 1996; Suihko *et al.*, 2002; Miettinen and Wirtanen, 2006).

Rørvik i saradnici (2003) su ukazali da je nivo kontaminacije sirovog živinskog mesa *L. monocytogenes* veći nego što je u sirovinama, okruženju pogona ili opremi, kao

i da se nivo kontaminacije povećava tokom prerade živinskih trupova. Razlog povećanog stepena kontaminacije je neadekvatno čišćenje uređaja za preradu duž linije klanja (Klausner and Donnelly, 1991).

Iz slivnika u prostorijama za preradu je često izolovana *L. monocytogenes* (Rørvik *et al.*, 1997; Autio *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 1999; Miettinen *et al.*, 2001b; Norton *et al.*, 2001; Hoffman *et al.*, 2003), ali se slivnici ne smatraju izvorom kontaminacije, već samo predstavljaju indikator prisustva *L. monocytogenes* (Rørvik *et al.*, 1997; Hoffman *et al.*, 2003).

Rocourt i Cossart su 1997. godine ukazali da *L. monocytogenes* dospeva u industrijski pogon preko zemlje na cipelama radnika, odeće, transportne opreme, životinjskih izlučevina ili se bakterije nalaze na koži životinja, sirovina biljnog i životinjskog porekla i zdravih ljudi koji mogu biti nosioci bakterije.

Neki sojevi *L. monocytogenes* mogu biti prisutni u industrijskim pogonima duži vremenski period (do nekoliko godina), za razliku od drugih sojeva koji se javljaju samo sporadično. Otporni sojevi se retko kad mogu naći u sirovinama (Rørvik *et al.*, 1995; Nesbakken *et al.*, 1996; Miettinen *et al.*, 1999a). Iskorenjivanje je veoma teško, ali nije nemoguće (Miettinen *et al.*, 1999a), što je verovatno posledica njihove veće tolerantnosti na uslove kisele sredine u odnosu na neperzistentne sojeve *L. monocytogenes* (Lundén *et al.*, 2008). Otporni sojevi su najverovatniji kontaminanti finalnih proizvoda, pa je određivanje njihove virulentnosti od izuzetnog značaja u proceni rizika potrošača (Jensen *et al.*, 2008).

Podaci u Tabeli 2.3.2.1. predstavljaju konkretne studije urađene u različitim industrijskim pogonima i na konkretnim mestima kontaminacije.

Tabela 2.3.2.1. Mesta kontaminacije *L. monocytogenes* u pogonima za preradu goveđeg, svinjskog i pilećeg mesa, ribe i mleka (Lundén, 2004).

<b>Industrijski pogon</b>	<b>Mesta kontaminacije</b>
<b>Meso (goveđe, svinjsko)</b>	Okruženje pogona Mašina za gnječenje, omekšavanje Mašina za narezivanje Pokretna traka Mašina za skidanje kože Razne mašine <sup>a</sup> Mašina za oblikovanje
<b>Meso (pileće)</b>	Okruženje pogona Uređaj za hlađenje Mašina za skidanje kože Mašine za preradu <sup>a</sup> Pokretna traka Nož
<b>Riba</b>	Okruženje pogona Mašina za skidanje kože Daska za sečenje Trimovanje Uređaj za pripremu salamure Rastvor za salamuru
<b>Riba</b>	Rastvor za salamuru Uređaj za hladno dimljenje Mašina za narezivanje Pokretna traka Frižider
<b>Mleko</b>	Okruženje pogona Filter za mleko Filter za salamuru Pokretna traka Mašina za pakovanje Zamrzivač Mašina za oblikovanje

<sup>a</sup> Specifične mašine

<sup>b</sup> *Listeria* sp.

### 2.3.2.2. Preživljavanje *Listeria monocytogenes* u industrijskim objektima

#### 2.3.2.2.1. Adhezija i formiranje biofilмова *Listeria monocytogenes*

Bakterije koje mogu da se vezuju i formiraju biofilm na kontaktnim površinama, pokazuju povećanu otpornost na faktore stresa prilikom dekontaminacije ovih površina (Frank and Koffi, 1990; Ronner and Wong, 1993; Oh and Marshall, 1995; Aarnisalo *et al.*, 2000). Vezivanje ćelija, neophodan uslov za formiranje biofilma, se odigrava u dva koraka (Dunne, 2002). Prvi korak je reverzibilno vezivanje ćelija za kontaktnu površinu usled elektrostatičkih i hidrofobnih interakcija. U drugom koraku dolazi do proizvodnje egzopolisaharida i ireverzibilnog vezivanja za kontaktnu površinu (Dunne, 2002). Ćelije ovako formiranog biofilma, okružene egzopolisaharidima, se ne mogu ukloniti blagim ispiranjem (Donlan, 2002).

*L. monocytogenes* se vezuje za materijale kontaktnih površina kao što su: guma, nerđajući čelik i plastika. Osim toga, pokazuje visoku otpornost na različite hemikalije i dezinficijense koji se koriste u industrijskim pogonima (Frank and Koffi, 1990; Ronner and Wong, 1993; Oh and Marshall, 1995; Aarnisalo *et al.*, 2000).

Razlike u vezivanju *L. monocytogenes* za različite kontaktne površine nisu velike, ali ipak postoje (Beresford *et al.*, 2001). Istraživanja su pokazala da se *L. monocytogenes* u najvećem broju ćelija vezuje za gumene površine ili politetrafluoretilen (Sinde and Carballo, 2000). Vreme potrebno za vezivanje *L. monocytogenes* za različite kontaktne površine iznosi oko 20 minuta (Mafu *et al.*, 1990), dok se formiranje dvoslojnog biofilma na staklenim površinama dešava u roku od 24 h (Chae and Schraft, 2000). Ipak, nemaju svi sojevi *L. monocytogenes* istu sposobnost formiranja biofilma (Ronner and Wong, 1993; Norwood and Gilmour, 1999; Chae and Schraft, 2000; Kalmokoff *et al.*, 2001). Literaturni podaci ukazuju da sojevi koji formiraju jake biofilmove imaju bolju sposobnost adaptacije na uslove stresa (Keskinen *et al.*, 2008).

### 2.3.3. Prisustvo *Listeria monocytogenes* kod životinja

*L. monocytogenes* je izolovana iz fecesa različitih domaćih i divljih sisarskih vrsta, kao i kod ptica (Seeliger, 1961; Weis and Selliger, 1975; Yoshida *et al.*, 2000).

Istraživanja su pokazala da su sve vrste domaćih životinja osetljive na infekciju *L. monocytogenes* (Low and Donachie, 1997), ali da listerioza predstavlja najveći problem kod domaćih preživara (goveda, ovce, koze) gde se stočna hrana smatra najvećim faktorom rizika (Fenlon, 1986; Fenlon *et al.*, 1996; Wiedmann *et al.*, 1996). Unutar stada, mnogo je veći broj preživara koji mogu biti asimptomatski nosioci *L. monocytogenes* nego što je broj inficiranih životinja (Wesley, 1999).

Čovek je izložen riziku od infekcije bakterijom *L. monocytogenes* na taj način što mleko koje proizvode domaći preživari može biti izvor infekcije. Istraživanja su pokazala da mlečni proizvodi predstavljaju visoko rizičnu hranu u odnosu na slučajeve listerioze kod ljudi u Americi (Food and Drug administration/United States Department of Agriculture, 2003). Listerioze nastale usled konzumiranja mlečnih proizvoda su posledica kontaminacije sirovog mleka, ili su rezultat naknadne kontaminacije posle procesa pasterizacije.

Inficirani preživari mogu i direktnim putem preneti *L. monocytogenes* na čoveka u toku procesa teljenja ili jagnjenja (Ivanek *et al.*, 2006). Kožna listerioza, iako veoma retka, se smatra profesionalnom bolešću veterinara i farmera koji su u kontaktu sa inficiranom životinjom u toku porađanja mrtvorodenih ili pobačajnih fetusa goveda (Wesley, 1999).

Inficirani preživari mogu dalje nastaviti cikluse transmisije *L. monocytogenes* direktnom fekalnom kontaminacijom u toku ispaše ili indirektno preko đubriva. Sledeći ciklus kontaminacije nastaje ukoliko se usev koji je rastao na kontaminiranoj zemlji koristi u proizvodnji stočne hrane (Fenlon *et al.*, 1996). Tako, životinje i okruženje farme predstavljaju glavni rezervoar *L. monocytogenes* (Ivanek *et al.*, 2006).

Nekoliko studija je ukazalo da i sveža riba može biti kontaminirana bakterijom *L. monocytogenes* (Draughon *et al.*, 1999; Eklund *et al.*, 1995). Kontaminacija kože i trbušne duplje riba bakterijom *L. monocytogenes* može nastati usled zagađenosti voda u kojima žive (Miettinen and Wirtanen, 2005; Motes, 1991) ili usled nepravilnog rukovanja pre nego što riba stigne u industrijski pogon (Huss *et al.*, 2000).

Za našu zemlju postoje podaci koji se odnose na rasprostranjenost *L. monocytogenes* u sirovom pilećem mesu i drugim vrstama mesa (Buncic, 1991; Trajkovic Pavlovic *et al.*, 2007), preživljavanje *L. monocytogenes* u toku fermentacije kiselog kupusa (Niksic *et al.*, 2005), kao i na rezistentnost na toplotu bakterija *L.*



*monocytogenes* u prirodno i veštački kontaminiranim uzorcima kravljeg mleka (Kovincic *et al.*, 1991). Milanov i saradnici (2007) su u svojim istraživanjima došli do rezultata koji ukazuju da sposobnost sojeva *L. monocytogenes*, izolovanih iz inficiranih životinja, da formiraju biofilm na mikrotitar pločama od polistirena zavisi od temperature inkubacije i upotrebljenog medijuma za rast bakterija. Sojevi *L. monocytogenes* koji su gajeni u triptoznom soja bujonu sa dodatkom kvašćevog ekstrakta na temperaturi od 37°C su formirali jake biofilmove.

## 2.4. Listerioza

Listerioza je bakterijska bolest različitih vrsta sisara i ptica od koje oboli i čovek. Iako je prijemljivo preko 50 različitih životinjskih vrsta, bolest se najčešće pojavljuje sporadično, kod odraslih preživara u formi encefalitisa i abortusa, a kod mladih kao septikemija.

Incidencija listerioze kod ljudi i životinja je nepoznata, verovatno zbog postojanja asimptomatskih kliconoša i zastupljenosti bakterija u vodi, hrani i gotovo svakom okruženju.

Kod ljudi, listerioza je praćena širokim spektrom kliničkih simptoma. Visokorizične grupe su trudnice, novorođenčad, alkoholičari, osobe sa neoplastičnim bolestima ili pacijenti koji primaju kortikosteroide ili druge imunosupresivne lekove. Neonatalna listerioza se karakteriše meningitisom, tokom prve tri nedelje života. Kod fulminantne neonatalne listerioze, stepen mortaliteta je izuzetno visok i iznosi 54 – 90 %. Kod odraslih, klinička slika listerioze je varijabilna, a simptomi se kreću od onih sličnih gripu, do teških kliničkih manifestacija i brzog toka bolesti. Forma meningitisa je kod odraslih zastupljena u oko 53 % slučajeva i to uglavnom kod bolesnika kod kojih je rađena transplantacija organa ili onih obolelih od različitih vrsta karcinoma. Bakterijemija se ustanovi kod 25 % obolelih, a endokarditis kao retka komplikacija kod 7 % pacijenata.

U toku graviditeta, koji je najkritičnije fiziološko stanje i kod ljudi, svakako treba izbegavati konzumiranje nepasterizovanih proizvoda, nedovoljno opranog sirovog voća i povrća, kao i kontakt sa bolesnim životinjama. U toku narednog graviditeta žene

koje su imale listeriozu treba da pregledaju krv i vaginalni sekret mikrobiološki i serološki, jer nedostatak epidemioloških podataka može da oteža prevenciju bolesti.

Kako je *L. monocytogenes* osetljiva na većinu antibiotika, rana dijagnostika i terapija može da bude uspešna (Radojičić *et al.*, 2011).

U ovom radu opisana je primena klasičnih, molekularno bioloških i imunoenzimskih metoda u izolaciji, detekciji i karakterizaciji bakterija roda *Listeria*.

### 3. Cilj rada

S obzirom da klasične mikrobiološke metode, koje omogućavaju kultivaciju mikroorganizama i identifikaciju do nivoa vrste, zahtevaju intenzivan rad i dug vremenski period (od 5 do 7 dana), cilj ovog rada je da se standardizuju molekularno biološke i imunoenzimske metode za izolaciju, detekciju i karakterizaciju *L. monocytogenes*.

S druge strane, cilj ovog rada je i da se ispituju potencijalni izvori populacije bakterija *Listeria* u kuhinji restorana i industrijskom objektu za proizvodnju tradicionalne fermentisane suve kobasice, kao i da se ustanove visoko kontaminirane kontaktne površine mašine za narezivanje u toku komercijalne obrade suvomesnatih proizvoda.

## 4. Materijal i metode

### 4.1. Eksperimentalni sojevi listerija

Eksperimentalni sojevi listerija korišćeni u ovom radu su predstavljeni u sledećoj Tabeli.

Tabela 4.1. Eksperimentalni sojevi listerija korišćeni u radu.

Esperimentalni soj listerija	Relevantne karakteristike	Izvor ili referenca
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b ATCC 19115	$\beta$ HEM +	The American Type Culture Collection
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	$\beta$ HEM –	The American Type Culture Collection
<i>Listeria monocytogenes</i> CWD 730	Izolat iz mlekare (formira jak biofilm)	Lab. kolekcija*
<i>Listeria monocytogenes</i> CWD 845	Izolat iz mlekare (formira jak biofilm)	Lab. kolekcija*
<i>Listeria monocytogenes</i> CWD 701	Izolat iz sira (formira umereno jak biofilm)	Lab. kolekcija*
<i>Listeria monocytogenes</i> CWD 1002	Izolat iz svinjske kobasice (formira umereno jak biofilm)	Lab. kolekcija*
<i>Listeria monocytogenes</i> CWD 205	Izvor nepoznat (formira slab biofilm)	Lab. kolekcija*
<i>Listeria monocytogenes</i> CWD 578	Izolat iz mlekare (formira slab biofilm)	Lab. kolekcija*

$\beta$  HEM + soj koji daje zonu  $\beta$  hemolize

$\beta$  HEM – nehemolitični soj

\*- Department of Food Science and Human Nutrition and the National Food Safety and Toxicology Center, Michigan State University, East Lansing

### 4.2. Podloge za kultivaciju bakterija

U radu je za pravljenje serije decimalnih razblaženja odgovarajućih referentnih sojeva korišćen sterilni fiziološki rastvor (0.9% NaCl).

Dvadesetčetvoročasovna kultura *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115 i *L. innocua* ATCC 33090, je dobijena gajenjem bakterija na BHA (moždano - srčani infuzioni agar) (Merck GmbH, Darmstadt, Nemačka): hranljivi supstrat (moždano-srčani ekstrakt i peptoni) 27.5 g/l, D (+) glukoza 2.0 g/l, NaCl 20 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g/l, agar-

agar 15.0 g/l. Podloga je pripravljena rastvaranjem 52.0 g praha u 1 l sterilne destilovane vode. Medijum je autoklaviran 15 min na 121°C.

Za gajenje izolata *L. monocytogenes*, korišćen je triptozni soja bujon (Oxoid, Engleska) sa 0.6% kvašćevog ekstrakta (TSYEB): proizvod enzimskog razlaganja kazeina 17.0 g/l, proizvod enzimskog razlaganja soje 3.0 g/l, NaCl 5.0 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 g/l, glukoza 2.5 g/l, finalno pH 7.3 ± 0.2. Medijum je pripremljen rastvaranjem 30.0 g praha i 6.0 g kvašćevog ekstrakta u 1 l sterilne destilovane vode. Nakon potpunog rastvaranja, medijum je razlivan u epruvete i autoklaviran 15 min na 121°C.

Za nalivanje briseva za uzorkovanje, kao tečni medijum korišćen je fiziološki rastvor sa 0.1 % peptona (MRD) (Merck GmbH, Darmštad, Nemačka): pepton 1.0 g/l i NaCl 8.5 g/l. Medijum je pripremljen rastvaranjem 9.5 g gotove dehidratirane podloge u 1 l sterilne destilovane vode i autoklaviran 15 min na 121°C.

Za nalivanje finih, jednoslojnih, abrazivnih maramica (Kimberly – Clark Kimwipes, Amerika) korišćen je slani fosfatni pufer (PBS): NaCl 22.98 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.63 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.172 g/l, finalno pH 7.3 (Sigma-Aldrich, Nemačka).

Tečni medijumi korišćeni za rast bakterija roda *Listeria* su polukoncentrovani i koncentrovani Frejzer bujoni (Merck GmbH, Darmštad, Nemačka). Oba medijuma imaju istu osnovnu komponentu (Fraser Listeria Enrichment Broth base): proizvod enzimskog razlaganja životinjskog tkiva 5.0 g/l, proizvod enzimskog razlaganja kazeina 5.0 g/l, kvašćev ekstrakt 5.0 g/l, mesni ekstrakt 5.0 g/l, NaCl 20.0 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.0 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 35.0 g/l, eskulin 1.0 g/l, LiCl 3.0 g/l, finalno pH 7.2 ± 0.2. Za pripremu polukoncentrovanog Frejzer bujona, rastvoreno je 55.0 g osnovnog medijuma u 1 l sterilne destilovane vode, a zatim podloga autoklavirana 15 min na 121°C. U ovako pripremljenu i ohlađenu podlogu je dodavana po jedna bočica amonijum gvožđe (III) citrata (500 mg) (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> x Fe x NH<sub>3</sub>) i selektivnog soplementa (akriflavin 12.5 mg, nalidiksična kiselina 10.0 mg) (Merck GmbH, Darmštad, Nemačka), prethodno rastvorenih u 1.0 ml sterilne destilovane vode. Koncentrovani Frejzer bujon se priprema na identičan način s tim što je u pripremljenu i ohlađenu podlogu dodavana jedna bočica amonijum gvožđe (III) citrata (500.0 mg) (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> x Fe x NH<sub>3</sub>) i dve bočice selektivnog soplementa (akriflavin 25.0 mg, nalidiksična kiselina 20.0 mg). Pripremljeni medijumi su žuto-braon boje.

U radu je pored Frejzer bujona, korišćen kao medijum za obogaćenje i UVM modifikovani Listeria bujon (Difco, Amerika): proizvod enzimskog razlaganja kazeina 5.0 g/l, proizvod enzimskog razlaganja životinjskog tkiva 5.0 g/l, mesni ekstrakt 5.0 g/l, kvašćev ekstrakt 5.0 g/l, NaCl 20.0 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9.6 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.35 g/l, eskulin 1.0 g/l, nalidiksična kiselina 0.02 g/l, akriflavin HCl 12.0 mg. Za pripremu medijuma rastvoreno je 52.0 g praha u 1 l sterilne destilovane vode. Rastvorena podloga je autoklavirana 15 min na 121°C.

Za izolaciju vrsta roda *Listeria*, kao selektivna čvrsta podloga korišćen je Oxford agar (Oxoid, Engleska): kolumbia krvni agar 39.0 g/l, eskulin 1.0 g/l, amonijum gvožđe (III) citrat (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> x Fe x NH<sub>3</sub>) 0.5 g/l, LiCl 15.0 g/l, finalno pH 7.0 ± 0.2. Podloga je pripremljena dodavanjem 27.75 g osnovnog medijuma u 500.0 ml sterilne destilovane vode. Otopljena podloga je autoklavirana 15 min na 121°C. U ohlađenu podlogu, dodavana je jedna bočica Listeria selektivnog saplementa (Oxoid, Engleska), prethodno rastvorena u 5.0 ml 70% etanola: cikloheksimid 200.0 mg, kolistin sulfat 10.0 mg, akriflavin 2.5 mg, cefotetan 1.0 mg, fosfomicin 5.0 mg. Modifikovani Oxford agar (MOX) (Oxoid, Engleska) sadrži isti osnovni medijum u koji je aseptično, kada je podloga ohlađena, dodavan modifikovani Listeria selektivni saplement (Oxoid, Engleska): amfotericin B 5.0 mg, kolistin sulfat 10.0 mg, akriflavin 2.5 mg, cefotetan 1.0 mg, fosfomicin 5.0 mg.

Za određivanje broja vrsta roda *Listeria*, kao selektivna čvrsta podloga korišćen je PALCAM agar (Merck GmbH, Darmštad, Nemačka): pepton 23.0 g/l, kvašćev ekstrakt 3.0 g/l, skrob 1.0 g/l, NaCl 5.0 g/l, agar-agar 13.0 g/l, D (-) manitol 10.0 g/l, amonijum gvožđe (III) citrat (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> x Fe x NH<sub>3</sub>) 0.5 g/l, eskulin 0.8 g/l, glukoza 0.5 g/l, LiCl 15.0 g/l, fenol crveno 0.08 g/l, finalno pH 7.2 ± 0.2. Podloga je pripremljena dodavanjem 35.9 g osnovnog medijuma u 500.0 ml sterilne destilovane vode. Otopljena podloga je autoklavirana 15 min na 121°C. U ohlađenu podlogu, dodavana je jedna bočica Listeria selektivnog saplementa (Merck GmbH, Darmštad, Nemačka) prethodno rastvorenog u 1.0 ml sterilne destilovane vode: polimiksin B sulfat 5.0 mg, ceftazidim 10.0 mg, akriflavin 2.5 mg.

Za razlikovanje *L. monocytogenes* od drugih nepatogenih bakterija roda *Listeria*, upotrebljene su gotove, komercijano dostupne ploče hromogenog agara Listeria Ottaviani & Agosti (bioMérieux, Francuska).

Kao medijum za kultivaciju korišćen je triptozni soja agar sa dodatkom ekstrakta kvasca (TSYEA). Podloga se sastoji od triptoznog soja bujona (Oxoid, Engleska) 30.0 g/l, ekstrakta kvasca 6.0 g/l i agara 9.0 g/l. Kompletna dehidratirana podloga je rastvorena u 1 l sterilne destilovane vode. Pripremljena podloga je autoklavirana 15 min na 121°C.

Za utvrđivanje hemolize, korišćen je ovčiji krvni agar (KA): mesni pepton 15.0 g/l, proizvod enzimskog razlaganja jetre 2.5 g/l, kvašćev ekstrakt 5.0 g/l, NaCl 5.0 g/l, agar 9.0 g/l. Komponente podloge su rastvorene u 1 l sterilne destilovane vode, a rastvorena podloga autoklavirana 15 min na 121°C. Finalni pH, posle sterilizacije treba da bude  $7.2 \pm 0.2$ . U pripremljen i ohlađen osnovni medijum je dodato 5.0 do 7.0 ml defibrinisane ovčije krvi.

U cilju dokazivanja prisustva bakterija roda *Listeria*, korišćen je agar za pokretljivost (HiMedia, Indija): proizvod enzimskog razlaganja kazeina 20.0 g/l, mesni pepton 6.1 g/l i agar 3.5 g/l. Komponente podloge su rastvorene u 1 l sterilne destilovane vode. Nakon potpunog rastvaranja, podloga je nalivana u epruvete u količini od 5.0 ml, a zatim autoklavirana 15 min na 121°C.

#### 4.2.1. Morfološki, fiziološki, biohemijski i imunoenzimski testovi

U cilju utvrđivanja morfoloških karakteristika bakterija roda *Listeria*, korišćen je komplet boja za bojenje po Gramu (Merck GmbH, Darmštad, Nemačka): gencijana violet, Lugolov rastvor i karbol fuksin. Postupak bojenja po Gramu je podrazumevao: gencijana violet 3-5 min, Lugolov rastvor 1-2 min, ispiranje 96% etanolom, ispiranje vodom, karbol fuksin 0.5 - 1 min i ponovno ispiranje vodom. Na osušeni i obojeni preparat je dodata kap kedrovog ulja, a potom je preparat mikroskopiran pod imerzionim objektivom. U cilju dobijanja pouzdanih rezultata bojenja, korišćena je čista referentna kultura kod koje je period inkubacije bio kraći od 24 h.

Za ispitivanje testa pokretljivosti, tipične kolonije *Listeria* sp., izrasle na TSYEA, su prenošene ubodnom ezom u podlogu za pokretljivost (HiMedia, Indija) i inkubirane 48 h na 25°C. Ukoliko rast tj. pokretljivost nije bila dobro izražena, podloga je inkubirana još pet dana. Kolonije *Listeria* sp. daju karakterističan rast u obliku kišobrana.

Za ispitivanje testa hemolize, tipične kolonije *Listeria* sp., izrasle na TSYEA, su nanošene na površinu ovčijeg krvnog agara, uz kontrolne sojeve *L. monocytogenes* i *L. innocua*. Ploče su inkubirane 24 h na 37°C. *L. monocytogenes* stvara usku zonu β-hemolize, *L. innocua* ne stvara hemolizu, *L. seeligeri* pokazuje slabu zonu hemolize dok *L. ivanovii* daje široku zonu β-hemolize.

Za izvođenje CAMP (Cristie, Atkins, Munch-Petersen) testa, korišćen je ovčiji krvni agar, uz kontrolne referentne sojeve *S. aureus* ATCC 25923 i *R. equi* ATCC 6939. Kontrolni sojevi su nanošeni vertikalno i paralelno jedan drugom na ploče krvnog agara. Nakon toga, su izolati listerija nanošeni horizontalno na ploče krvnog agara, vodeći računa da se ne dodirnu sa kontrolnim sojevima. Ploče su inkubirane 24 h na 37°C, a potom ispitivana pojava hemolize.

U identifikaciji bakterija roda *Listeria*, korišćen je biohemijski kit – API identifikacioni sistem, uz dodatak ZYM reagensa, (API Listeria, bioMérieux, Francuska) sa potrebnim supstratima (enzimski supstrat, eskulin gvožđe citrat, 4-nitrofenil-αD-manopiranozid, D-arabitol, D-ksiloza, L-ramnoza, metil-αD-glukopiranozid, D-riboza, glukoza-1-fosfat, D-tagatoza).

U automatizovanom kvalitativnom mini VIDAS sistemu korišćen je komercijalno dostupan imunoenzimski LMX kit (bioMérieux, Francuska). Unutar kita nalaze se SPR (Solid Phase Receptacle) nastavci, koji su obloženi anti – *L. monocytogenes* antitelima, stripovi, standard, pozitivna i negativna kontrola, kao i MLE (Master lot entry) kartica. Strip se sastoji od 10 udubljenja, pri čemu je poklopac prvog udubljenja otvoren, kako bi se obezbedilo lako uvođenje obogaćenog uzorka. Poslednje udubljenje u stripu je kiveta u kojoj se radi fluorimetrička determinacija. Osam udubljenja u srednjem delu stripa sadrži razne reagense potrebne za analizu.

Za utvrđivanje prisustva katalaze korišćen je 3% vodonik peroksid.

### **4.3. Priprema i način uzorkovanja**

#### **4.3.1. Priprema i način uzorkovanja briseva sa površina u restoranu**

U radu su za uzorkovanje korišćeni brisevi, koji su neposredno pre uzorkovanja sterilno nalivani sa 1 ml MRD medijuma. Uzorkovanje u restoranu je izvršeno u



prijemnim prostorijama, prostorijama za skladištenje sirovina i kuhinji. Uzorci briseva su uzeti sa podova, sa radnih površina, iz slivnika na podovima, i u lavaboima za pranje posuđa i odmrzavanje mesa, iz rashladnih vitrina (za mlečne proizvode, morske plodove, meso), sa daski za sečenje mesa i hleba, vage za merenje, noževa i satara, kao i uređaja za narezivanje sira i suvomesnatih proizvoda različitih proizvođača.

S obzirom da *L. monocytogenes* formira biofilm, bilo je potrebno jako pritisnuti površinu sa mesta uzorkovanja. Mikrobiološke analize su urađene dva sata od momenta uzorkovanja.

#### 4.3.2. Priprema i način uzorkovanja briseva u toku proizvodnje tradicionalne fermentisane kobasice

U radu su za uzorkovanje korišćeni brisevi, koji su neposredno pre uzorkovanja sterilno nalivani sa 1 ml MRD medijuma. Uzorkovanje za proveru higijene operacija klanja svinje u industrijskom objektu je izvršeno nedestruktivnom (alternativnom) metodom sa buta, obraza, leđa i ubodne rane.

Ostali brisevi uzeti su sa: alata (nož i satara), ruku radnika u toku faze rasecanja i obrade mesa, ruku radnika u toku faze mešanja sa začinima (pravljenje nadeva), radnih površina pre početka rada i u toku faze rasecanja mesa, lodne, kecelje, mašine i šajbne za mlevenje mesa, punilice, cevi punilice (bez i sa starter kulturom) i stola na kraju rada.

Osim briseva, ispitivani su: mleveno meso tj. priprema za nadev, nadev bez starter kulture, nadev sa starter kulturom, začinska paprika, beli luk, kim, so, šećer i pripremljeni uzorci kobasica dati u šemi (Poglavlje 4.9.).

#### 4.3.3. Kontaminacija suvomesnatih proizvoda bakterijom *L. monocytogenes* u toku narezivanja

##### 4.3.3.1. Priprema kulture

Koktel od šest izolata *L. monocytogenes* je sadržao: dva soja koji formiraju jak biofilm [CWD 730 i CWD 845], dva soja koji formiraju umeren biofilm [CWD 701 i CWD 1002] i dva soja koji formiraju slab biofilm [CWD 205 i CWD 578], a napravljen

je posle dva uzastopna presejavanja svakog soja u triptozni soja bujon sa 0.6% kvašćevog ekstrakta. Koktel je sadržao približno  $10^9$  CFU/ml.

#### 4.3.3.2. Uslovi skladištenja suvomesnatih proizvoda

Uzorci šunke (73% vlažnost/3.7% masti; 52% vlažnost/1.7% masti) kupljeni u supermarketu, su čuvani na temperaturi hlađenja (4°C) ili sobnoj temperaturi (22°C).

#### 4.3.3.3. Eksperimentalna kontaminacija sečiva

Pripremljen koktel *L. monocytogenes* je inokulisan u kockicu uzorka širine 1 cm koja je nožem napravljena na jednom delu šunke. Dobijeni prinos ćelija je iznosio  $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>. Nakon držanja eksperimentalno kontaminirane šunke jedan čas na 4°C, kontaminirani deo šunke je isečen na 12 parčića uređajem za narezivanje (proizvođač Hobart, model 2612). Svi delovi uređaja za narezivanje, izuzev sečiva, su očišćeni i dezinfikovani 70% etanolom. Zatim je isečeno 100 parčića (odrezaka) identične, ali nekontaminirane šunke, označenih brojevima 1-100.

#### 4.3.3.4. Određivanje broja ćelija *Listeria monocytogenes* iz isečenih parčića (odrezaka) šunke

Neposredno po isecanju nekontaminirane šunke, odresci označeni brojevima od 1 do 25 su razblaženi u odnosu 1:5 u UVM-u. Odresci su potom homogenizovani 1 min u Stomacher-u 400 i po 5.0 ml svakog uzorka je u duplikatu nalivano u Petri šolje (150 x 15 mm), sa 25 ml MOX agara.

Preostali odresci, označeni brojevima od 26 - 100, su skupljeni u 15 setova (po 5 odrezaka u Whirl-Pak<sup>TM</sup> kesi). Uzorci su čuvani 5 dana na temperaturi hlađenja (4°C), a zatim je sadržaj svake kese razblažen u odnosu 1:5 u UVM-u. U toku pipetiranja uziman je sadržaj sa bočnih strana kese, kako bi se izbegli veći komadi mesa. Odresci su homogenizovani 1 min u Stomacher-u 400 i po 5.0 ml svakog uzorka je u duplikatu naliveno u Petri šolje (150 x 15 mm), sa 25 ml MOX agara. Sve ploče MOX agara su inkubirane 24 do 48 h na 37°C, a nakon perioda inkubacije izbrojane su izrasle tipične kolonije *L. monocytogenes*.

Uzorci kod kojih na Petri šoljama nije došlo do rasta kolonija, su posle koraka predobogaćenja (dvadesetčetvoročasovna inkubacija, 24 h na 35°C), zasejani na MOX agar.

Statistički parametri log CFU, standardne devijacije i srednje vrednosti dobijeni su korišćenjem Statgraphics programa, verzija 3.3 (Sigma Plus, Pariz, Francuska).

#### 4.3.3.5. Određivanje broja ćelija *Listeria monocytogenes* sa različitih površina uređaja za narezivanje

Posle isecanja nekontaminirane šunke, urađena je i procena kontaminacije različitih kontaktnih površina uređaja za narezivanje (oblast nagomilavanja uzorka, ploča, zadnja ploča, sečivo, prednji/zadnji štiti, držač štita). U proceni kontaminacije, korišćene su jednoslojne abrazivne maramice (Kimwipes, Kimberly-Clark, Amerika) prethodno natopljene sa 1.0 ml PBS-a. Po dve papirne maramice su korišćene za svaku kontaktnu površinu. Uzorci su preneti u 30 ml UVM-a i homogenizovani 2 min u Stomacher-u 400. Po 5.0 ml svakog uzorka je u duplikatu naliveno u Petri šolje sa MOX agarom.

Sve ploče MOX agara su inkubirane 24 do 48 h na 37°C, a nakon perioda inkubacije izbrojane su izrasle tipične kolonije *L. monocytogenes*.

Uzorci kod kojih na Petri šoljama nije došlo do rasta kolonija, su posle koraka predobogaćenja (dvadesetčetvoročasovna inkubacija, 24 h na 35°C) zasejani na MOX agar.

Statistički parametri log CFU, standardne devijacije i srednje vrednosti dobijeni su korišćenjem Statgraphics programa, verzija 3.3 (Sigma Plus, Pariz, Francuska).

### **4.4. Određivanje osetljivosti PCR metode kod identifikacije *Listeria sp.* i *Listeria monocytogenes***

#### 4.4.1. Priprema uzorka

Osetljivost PCR metode je utvrđena na eksperimentalno kontaminiranim uzorcima sledećim redom: u 40 ml pasterizovanog mleka, u sterilnoj plastičnoj kesi sa bočnim filterom, je dodato 360 ml polukoncentrovanog Frejzer bujona. Ovako

pripremljen uzorak je homogenizovan 1 min u Stomacher-u (MIX 2, AES Chemunex, Francuska). Po 40.0 ml ovako pripremljene suspenzije je raspoređeno u plastične kivete (Rotilabo<sup>®</sup>-centrifuge tubes Eco, ROTH, Nemačka). Sadržaj svake kivete, osim poslednje koja predstavlja nekontaminirani uzorak, je inokulisan sa 400.0 µl odgovarajućeg razblaženja dvadesetčetvoročasovne kulture soja *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115. Serijska razblaženja referentnog soja, pravljena u opsegu od 1 do  $1 \times 10^7$  CFU ml<sup>-1</sup>, su pripremljena u sterilnom fiziološkom rastvoru (0.9% NaCl). Paralelno, razblaženja su zasejana na BHA u cilju određivanja početnog broja ćelija soja *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115. Plastične kivete su inkubirane na temperaturi od 37°C. Po 10 ml sadržaja kivete je uzeto za izolaciju DNK direktno iz uzoraka eksperimentalno kontaminiranog mleka (0 h) i tokom 2 i 6 h inkubacije, a po 1 ml sadržaja nakon inkubacije od dvadesetčetiri časa. Navedeni uzorci su centrifugirani 10 min na 3200 g. Dobijeni sedimenti su isprani u 0.5 ml TE pufera (10.0 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl; 1.0 mmol l<sup>-1</sup> EDTA, pH 8). Pripremljena suspenzija je prebačena u kivete, a potom centrifugirana 5 min na 8000 g (Genofuge 16 M, Techne, Engleska). Po 1.0 ml suspenzije, posle dvadesetčetiri časa inkubacije, je centrifugirano 5 min na 8000 g (Genofuge 16 M, Techne, Engleska). Dobijeni sedimenti su isprani u 0.5 ml TE pufera.

Sedimenti su čuvani na – 20°C. Na isti način izvršena je priprema uzoraka eksperimentalno kontaminiranih sojem *L. innocua* ATCC 33090 i određen početni broj ćelija. U ovom slučaju, praćen je samo nulti sat inkubacije.

#### 4.4.2. Izolacija bakterijske DNK

U izolaciji bakterijske DNK, korišćen je komercijalno dostupan DNeasy Tissue kit (Qiagen GmbH, Nemačka). U prvom koraku sedimenti su resuspendovani sa 180.0 µl pufera za enzimsku lizu ćelija (20.0 mM Tris-Cl, pH 8.0; 2.0 mM Na-EDTA; 1.2% Triton<sup>®</sup> X-100; 20.0 mg/lizozima), a potom je dobijena suspenzija inkubirana 30 min na 37°C. Posle dodavanja 25.0 µl proteinaze K i 200.0 µl pufera AL, sadržaj je homogenizovan na vorteksu i kivete inkubirane 30 min na 70°C. U kivete je dodato 200.0 µl etanola (96-100%), a zatim je sadržaj homogenizovan na vorteksu. Ovako pripremljena mešavina je prebačena u komercijalno dostupne DNeasy Mini spin kolone, postavljene u kivete zapremine 2.0 ml, i centrifugirana 1 min na 6000 g (Genofuge 16

M, Techne, Engleska). Zaostali sadržaj u kivetu je odbačen, a kolonice prebačene u nove identične kivete od 2.0 ml. Posle dodavanja 500.0 µl pufera AW1 i centrifugiranja 1 min na 6000 g (Genofuge 16 M, Techne, Engleska), zaostali sadržaj je odbačen zajedno sa kivetom. Na identičan način su kolonice prebačene u nove kivete, dodato je 500.0 µl pufera AW2, mešavina centrifugirana 3 min na 20 000 g (Genofuge 16 M, Techne, Engleska), i sadržaj odbačen zajedno sa kivetom. U poslednjem koraku, kolonice su prebačene u nove kivete, a potom je na njihove osušene membrane direktno dodato 200.0 µl pufera AE. Nakon inkubacije, izvršene 1 min na sobnoj temperaturi, sadržaj u kolonicama je centrifugiran 1 min na 6000 g (Genofuge 16 M, Techne, Engleska), a dobijeni eluat je čuvan na – 20°C.

## **4.5. Enzimske reakcije sa DNK**

### **4.5.1. Umnožavanje DNK PCR metodom**

Umnožavanje DNK PCR metodom vršeno je u ukupnom volumenu od 30 µl, tako što je 1.0 µl bakterijske DNK (0.1-1 µg) dodat u PCR smešu, koja je sadržala: 1 x reakcioni pufer (10 x RP: 500.0 mM KCl, 100.0 mM Tris-HCl, 0.8% Nonidet P40), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, svaki dNTP po 200.0 µM, 2.5 µM prajmera i 1.0 U Taq DNK polimeraze (Fermentas UAB, Litvanija). Sekvence prajmera su prikazane u Tabeli 4.5.1.

PCR reakcija u kojoj su korišćeni prajmeri dizajnirani na osnovu sekvence poreklom iz *hlyA* gena i 16S rDNK regiona, rađena je po sledećem programu: početna denaturacija 5 min na 94°C, umnožavanje DNK fragmenata u 35 ciklusa: denaturacija 30 s na 94°C, vezivanje prajmera 45 s na 50°C, polimerizacija 45 s na 72°C; poslednji ciklus polimerizacije je 5 min na 72°C.

PCR reakcija pomoću prajmera dizajniranih na osnovu sekvence poreklom iz *iap* regiona je rađena po sledećem programu: početna denaturacija 5 min na 95°C, umnožavanje DNK fragmenata u 35 ciklusa: denaturacija 1 min na 95°C, vezivanje prajmera 2 min na 36°C, polimerizacija 3 min na 72°C; poslednji ciklus polimerizacije je 7 min na 72°C.

Tabela 4.5.1. Sekvence prajmera korišćene u radu.

	Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera	Region koji ograničavaju	Očekivana dužina PCR proizvoda
1.	LM1	5'-CCTAAGACGCCAATCGAA-3'	<i>hlyA</i>	702 bp
2.	LM2	5'-AAGCGCTTGCAACTGCTC-3'		
3.	LI1†	5'-CTCCATAAAGGTGACCCT-3'	16S rDNK	938 bp
4.	U1	5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'		
5.	List-univ. 1‡	5'-GCCAGCGGCCCGGCGCGGGC CCGGCGGGGGCCGCGGCATGT C ATGGAATAA-3'	<i>iap</i>	600 – 610 bp <sup>1</sup> 472 bp <sup>2</sup> 457 bp <sup>3</sup>
6.	List-univ. 2	5'-GCTTTTCCAAGGTGTTTTT-3'		

† Prajmeri specifični za rod *Listeria*

‡ Dužina fragmenta zavisi od vrste bakterija roda *Listeria*

<sup>1</sup> Očekivane dužine PCR produkta za *L. ivanovii*, *L. seeligeri* i *L. welshimeri*

<sup>2</sup> Očekivana dužina PCR produkta za *L. monocytogenes*

<sup>3</sup> Očekivana dužina PCR produkta za *L. innocua*

#### 4.5.2. Umnožavanje DNK Real Time PCR metodom

U cilju utvrđivanja prisustva *L. monocytogenes* nakon dvadesetčetvoročasovne inkubacije, uzorci briseva i namirnica su nalivani sa odgovarajućom količinom polukoncentrovanog Frazer bujona. Nakon perioda inkubacije na 30°C, sadržaj je homogenizovan i po 1 ml suspenzije je centrifugirano 5 min na 8000 g (Genofuge 16M, Techne, Engleska).

Izolacija bakterijske DNK izvršena je na identičan način kako je opisano u poglavlju 4.4.2.

Umnožavanje DNK Real Time PCR metodom vršeno je u ukupnom volumenu od 25 µl, tako što je 1.0 µl bakterijske DNK dodat u PCR smešu (Maxima® Probe / Rox qPCR Master Mix), koja je sadržala: Maxima® Hot Start DNK polimerazu, Maxima® qPCR pufer, dUTP i referentnu ROX boju (Fermentas UAB, Litvanija). Sekvence prajmera i probe su prikazane u Tabeli 4.5.2.

Tabela 4.5.2. Sekvence prajmera i probe korišćene u radu.

	Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera	Region koji ograničavaju	Očekivana dužina PCR produkta
1.	hlyQF	5'- CATGGCACACCAGCATCT -3'	<i>hly</i>	64 bp
2.	hlyQR	5'- ATCCGCGTGTTTCTTTTCGA -3'		
3.	hlyQP	5'- FAM - CGCCTGCAAGTCCTAAGAC GCCA -TAMRA -3'		

Real Time PCR reakcija u kojoj su korišćeni prajmeri dizajnirani na osnovu sekvence poreklom iz *hly* gena rađena je po sledećem programu: početna denaturacija 10 min na 95°C, umnožavanje DNK fragmenata u 50 ciklusa: denaturacija 15 s na 95°C, vezivanje i polimerizacija 1 min na 63°C.

#### 4.5.3. Sekvenciranje DNK

Uzorci, u kojima je mikrobiološkim testovima utvrđeno prisustvo bakterija roda *Listeria*, su ispitani PCR metodom u kojoj su korišćeni prajmeri dizajnirani na osnovu sekvence poreklom iz *hlyA* gena, kako je detaljno opisano u poglavlju 4.5.1.

Dobijeni fragmenti bakterijske DNK su prečišćeni na *Qiaquick mini spin* kolonama i poslani na sekvenciranje u kompaniju *IIT BIOTECH*, Bielfeld, Nemačka. Korišćena je tehnika *One Shot Read MP* na aparatu *Roche GS FLX Titanium 454* i sekvenciran je jedan lanac fragmenta DNK.

## 4.6. Elektroforeza PCR proizvoda

Elektroforeza PCR proizvoda je rađena na horizontalnim 1.0% i 2.0% agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani rastvaranjem agaroze u 1 x TBE (10 x TBE: 89.0 mM Tris, 89.0 mM borna kiselina, 2.0 mM EDTA) (Fermentas UAB, Litvanija) puferu uz dodavanje etidijum bromida (0.5 µg/ml). Kao pufer za elektroforezu korišćen je 1 x TBE pufer. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela.

Veličine analiziranih fragmenata su određivane upoređivanjem dužine puta sa DNK fragmentima pozitivnih kontrola referentnih sojeva *L. monocytogenes* 4b ATCC

19115 i *L. innocua* ATCC 33090, pri čemu su korišćeni i komercijalni standardi: “MassRuler™ DNA Ladder“ (Fermentas UAB, Litvanija) i GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas UAB, Litvanija).

## 4.7. Mikrobiološka analiza briseva

### 4.7.1. Priprema uzoraka i uslovi rasta

Nakon uzorkovanja u restoranu, brisevi su u ručnom frižideru transportovani do laboratorije. Papirni deo brisa i preostali sadržaj medijuma je prebacivan u sterilne plastične kese prethodno obeležene odgovarajućim brojevima. Sadržaj kesa je nalivan sa 20.0 ml polukoncentrovanog Frejzer bujona, homogenizovan i inkubiran 24 h na 30°C. Nakon perioda inkubacije, u 10.0 ml koncentrovanog Frejzer bujona je dodato 0.1 ml dvadesetčetvoročasovne suspenzije uzorka.

Zasejani koncentrovani Frejzer bujon je inkubiran 48 h na 37°C. Iz Frejzer bujona, koji je nakon perioda inkubacije promenio boju u crnu, su standardnim pokretima eze zasejane selektivne podloge Oxford i modifikovanog Oxford agara. Podloge su inkubirane 24 do 48 h na 37°C. Pojava tamnosivih kolonija sa crnim centrom i crnom zonom, predstavljala je tipičan rast kolonija *Listeria* sp.

Izrasle kolonije *Listeria* sp. na selektivnim čvrstim podlogama su dalje ispitane testovima u cilju dokazivanja prisustva bakterija roda *Listeria*. Najmanje pet kolonija je uzeto za nastavak daljih ispitivanja. Tipične, sumnjive kolonije su ezom zasejane na površinu ploča TSYEA i inkubirane 18 do 24 h na 35 ili 37°C radi dobijanja pojedinačnih kolonija *Listeria* sp. Tipične kolonije *Listeria* sp. su bile veličine 1 – 2 mm, konveksnog izgleda sa bezbojnim ili opalescentnim sjajem na zelenkastoj TSYEA osnovnoj podlozi.

Metode za dokazivanje bakterija roda *Listeria* su obuhvatale izvođenje: katalaza reakcije, bojenje po Gramu i test pokretljivosti.

Ukoliko su morfološke i fiziološke karakteristike ukazale na prisustvo bakterija roda *Listeria*, rađeni su još i test hemolize, CAMP test i API identifikacioni sistem.



#### 4.8. Proizvodnja tradicionalne fermentisane kobasice

U registrovanom objektu za proizvodnju mesa "Trifunović", u Novom Sadu, obavljeno je klanje jedne svinje (269 kg, Landras rase) u skadu sa dobrom higijenskom (GHP) i proizvođačkom praksom (GMP). Ohlađeno mišićno i masno tkivo usitnjeno je na vuku ( $\varnothing = 10$  mm), a potom je ukupna masa usitnjenog mišićnog i masnog tkiva podeljena je na dva jednaka dela. U jednu polovinu mase pored uobičajenih ingredijenata crvene ljute mlevene začinske paprike (do 2.5 %), tuzlanske soli (do 2 %), pasiranog belog luka (do 0.2 %), kima (do 0.2 %) i šećera (do 0.15 %), dodata je i komercijalna starter kultura u količini od 15 g /100 kg nadeva (Quick-starter, Lay).

Mikroorganizmi starter kulture su: *Staphylococcus carnosus* 25%, *Staphylococcus xylosus* 25%, *Lactobacillus sake* 25% i *Pediococcus pentosaceus* 25%.

Dobro izmešan nadev, u trajanju od 15-30 minuta, jednom specifičnom tehnikom ručnog mešanja sa gnječenjem i prevrtanjem, napunjen je u veštačke kolagene omotače (Cutizin,  $\varnothing = 55$  mm). Nakon punjenja kobasice su ostavljene izvesno vreme (24 h) na hladnom da se cede, a potom je jedna polovina napunjenih kobasica sa i bez starter kulture sušena u kontrolisanim uslovima u IM „Topola“ (E1; E2). Kobasice su dimljene u komori za dimljenje na standardni način sa piljevinom bukovog drveta, cca 4 dana.

Druga polovina kobasica ostavljena je na dimljenju i sušenju u tradicionalnim uslovima (D1; D2). U domaćinstvu, kobasice su dimljene hladnim postupkom 15 dana sa pauzama, tako da je ukupno dato cca „10 dimova“, a dim je dobijen od mešavine bukovog i trešnjinog drveta. Po završetku dimljenja, kobasice su spontano fermentisale i sušile se pod klimatskim uslovima kako je to registrovano u grafikonima datim u Prilogu B. Kobasice u industrijskim uslovima nisu sušene po zadatom modelu, već kako je to predočeno u grafikonima u Prilogu B.

Kobasice sušene u domaćinstvu su 90. dana dostigle zadatu vlažnost manju od 35 %, kada su prenete u IM „Topola“, gde su po programu ostavljene neupakovane i upakovane u vakuum, a potom su ostavljene na skladištenju u komori u kojoj je trebala biti temperatura cca 15 °C, a registrovana je na grafikonima u Prilogu B.

Kobasice sušene u IM „Topola“ su 65. dana dostigle traženu vlažnost manju od 35 %, kada su na isti način ostavljene na skladištenju kao i kobasice iz domaćinstva.

Kobasice su proizvedene bez dodatka nitrita, nitrata, GDL-a, a na kraju procesa proizvodnje zrele kobasice su posedovale specifičnu aromu, odnosno miris i ukus fermentisanog mesa koji je u skladu sa dodatim začinima koji mu daju pikantnu ljutinu.

Plan ogleda, pripremljeni uzorci i način njihovog obeležavanja dati su u sledećoj šemi.

D1 – kobasica napravljena u domaćinstvu i sušena na tradicionalan način

oznaka	D0	D1 1	D1 2	D1 3	D1 4	D1 5	D1 6	D1 7	neupakovana	D1 8	D1 9	D1 10
									vakuum	D1 8v	D1 9v	D1 10v
dan	0	2	6	9	15	30	60	90	PAKOVANJE	120	210	270

D2 – kobasica napravljena u domaćinstvu uz dodatak starter kulture i sušena na tradicionalan način

oznaka	D0	D2 1	D2 2	D2 3	D2 4	D2 5	D2 6	D2 7	neupakovana	D2 8	D2 9	D2 10
									vakuum	D2 8v	D2 9v	D2 10v
dan	0	2	6	9	15	30	60	90	PAKOVANJE	120	210	270

E1 – kobasica napravljena u domaćinstvu i sušena u kontrolisanim uslovima

oznaka	E0	E1 1	E1 2	E1 3	E1 4	E1 5	E1 6	neupakovana	E1 7	E1 8	E1 9	E1 10
								vakuum	E1 7v	E1 8v	E1 9v	E1 10v
								hitozan	E1 7h	E1 8h	E1 9h	E1 10h
dan	0	2	6	9	15	30	60	PAKOVANJE	90	120	210	270

E2 – kobasica napravljena u domaćinstvu uz dodatak starter kulture i sušena u kontrolisanim uslovima

oznaka	E0	E2 1	E2 2	E2 3	E2 4	E2 5	E2 6	neupakovana	E2 7	E2 8	E2 9	E2 10
								vakuum	E2 7v	E2 8v	E2 9v	E2 10v
								hitozan	E2 7h	E2 8h	E2 9h	E2 10h
dan	0	2	6	9	15	30	60	PAKOVANJE	90	120	210	270

#### 4.8.1. Ispitivanje fizičkih i hemijskih parametara u fermentisanim kobasicama

Određivanje aktivnosti vode ( $a_w$  vrednost) kobasica izvršeno je na aparatu Testo 650 (Testo AG, USA).

Vrednosti pH određene su upotrebom portabl pH metra (Consort C931, Tumahout, Belgium) opremljenog sa ubodnom ojačanom staklenom kombinovanom elektrodom (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland). Kao krajnji rezultat uzeta je aritmetička sredina četiri vrednosti pH izmerenih u istoj tački.

Sadržaj hlorida u uzorcima kobasica određen je referentnom SRPS ISO 1841-1:1999 metodom koja se zasniva na ekstrakciji dela ispitujućeg uzorka vrućom vodom i taloženju proteina. Nakon filtracije i zakišeljavanja, ekstraktu je dodat rastvor srebrno nitrata u višku, a ovaj višak titriran rastvorom kalijum tiocijanata.

### 4.9. Ispitivanje briseva i namirnica

#### 4.9.1. Mikrobioško ispitivanje briseva i namirnica

Mikrobiološko ispitivanje briseva i namirnica u cilju određivanja prisustva bakterija roda *Listeria* izvršena je na identičan način kako je opisano u poglavlju 4.7.1., s tim što su ispitivane namirnice odmerene u sterilne kese za uzorkovanje u količini od 25 g.

U cilju kvantifikacije tj. određivanja broja bakterije *L. monocytogenes*, inicijalna (osnovna) suspenzija je revitalizovana  $1 \text{ h} \pm 5 \text{ min}$  na  $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon predviđenog vremena, napravljena su dva decimalna razblaženja i po 0.1 ml svakog razblaženja je nanošeno na površinu PALCAM selektivne podloge. Podloge su inkubirane 24 do 48 h na  $37^\circ\text{C}$  i nakon predviđenog vremena inkubacije izbrojane su izrasle tipične kolonije *Listeria* sp. Izrasle kolonije *Listeria* sp. su podvrgnute daljim testovima u cilju dokazivanja prisustva bakterija roda *Listeria* kako je opisano u poglavlju 4.7.1.

#### 4.9.2. Imunoenzimsko ispitivanje briseva i namirnica

Od svakog ispitivanog uzorka odmerena je odgovarajuća količina u Stomacher kesu sa lateralnim filterom. Odmerenom uzorku je aseptično dodata devet puta veća količina Frejzer bujona, a potom je u suspenziju dodat prethodno homogenizovan saplement. Ispitivani uzorci su ostavljeni na termostatiranju 26 – 30 h na  $37 \pm 1$  °C. Nakon predviđenog vremena inkubacije, u sterilnu epruvetu je prebačeno oko 1- 2 ml bujona, a potom je epruveta zagrejana  $5 \pm 1$  min na 95 – 100 °C. Epruveta je ohlađena i 250 µl obogaćenog uzorka je uzeto za rad.

Nakon završetka automatizovanog imunoenzimskog postupka, instrument automatski analizira rezultate. Fluorescencija se meri dva puta u stripu sa obogaćenim, ispitivanim uzorkom. Prvo čitanje obuhvata pozadinski šum, pre nego što SPR nastavak bude uronjen u supstrat. Drugo čitanje se odvija nakon inkubacije supstrata sa enzimom unutar SPR nastavka. Izmerena vrednost RFV (relativna fluorescentna vrednost) dobija se oduzimanjem vrednosti šuma od finalnog rezultata i takav rezultat se štampa. Dobijenu RFV vrednost VIDAS® sistem deli sa RFV vrednošću standarda i ukoliko je količnik veći od vrednosti praga uzorak je pozitivan i smatra se sumnjivim na prisustvo *L. monocytogenes*.

Svi dobijeni pozitivni rezultati su potvrđeni referentnom ISO 11290 metodom ili korišćenjem ALOA hromogene podloge.

## 5. Rezultati

### 5.1. Uporedno ispitivanje mikrobioloških, molekularno bioloških i imunoenzimskih metoda za izolaciju, detekciju i karakterizaciju *L. monocytogenes*

U toku uporednog ispitivanja mikrobioloških, molekularno bioloških i imunoenzimskih metoda za izolaciju, detekciju i karakterizaciju *L. monocytogenes*, ukupno je ispitano 99 uzoraka.

Klasičnim mikrobiološkim metodama identifikovano je prisustvo vrste *L. monocytogenes* u 7 uzoraka i ti izolati su označeni 1, 9, D11, D21, E11, D23 i E23. Rezultati su prikazani u Tabeli 5.1. Ovi izolati su dalje proveravani klasičnom PCR metodom pomoću prajmera specifičnih za virulentni *hlyA* gen. Svih 7 izolata su bili pozitivni na prisustvo *hlyA* gena (Tabela 5.1. i Slika 5.1.). Sekvenciranjem DNK fragmenta, dobijenog amplifikacijom pomoću istog para prajmera, i poređenjem dobijene sekvence sa bazom podataka dostupnom na internetu (NCBI), utvrđena je homologija od 100 % i 99 % sa sojevima *L. monocytogenes* soj NRRL B-33446 i *L. monocytogenes* soj NRRL B-33467 (Tabela 5.1.). Literaturni podaci (Ward *et al.*, 2008) ukazuju da oba soja pripadaju serotipu 1/2a, koji zajedno sa serotipovima 1/2b i 4b najčešće izaziva listeriozu. Primenom imunoenzimske mini Vidas metode i Real time PCR metode, nakon jednog koraka predobogaćenja, isti uzorci su bili pozitivni na prisustvo *L. monocytogenes* (Tabela 5.1.).

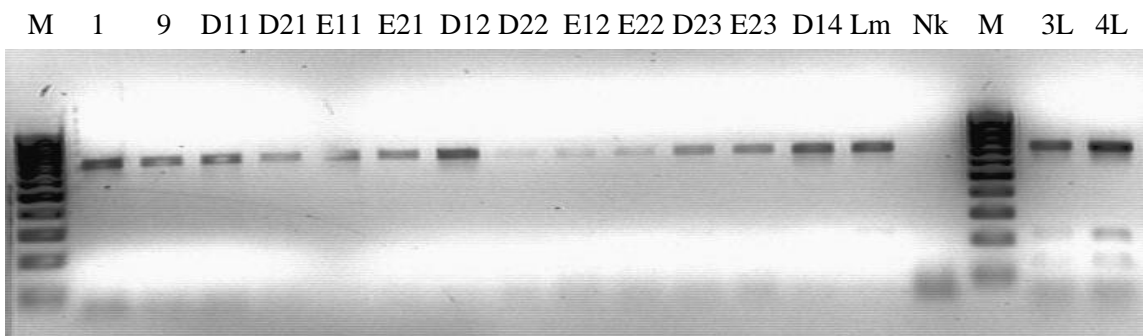
Pored toga, klasičnim mikrobiološkim metodama identifikovano je prisustvo i drugih vrsta iz roda *Listeria* (*L. innocua*, *L. grayi* i *L. welshimeri*), koje mogu biti indikator mogućeg prisustva bakterije *L. monocytogenes*. Klasičnim mikrobiološkim metodama determinisani su kao pripadnici vrste *L. grayi* izolati 3L, 4L, E21 i D14, kao i 4 izolata sa biohemijski neprihvatljivim profilom D12, D22, E12 i E22 kod kojih su sve relevantne morfološke i fiziološke karakteristike ukazivale da se radi o bakterijama iz roda *Listeria*. PCR metodom pokazano je da ovih 8 izolata, prema veličini dobijenog fragmenta koji iznosi 702 bp, poseduju virulentni *hlyA* gen, specifičan za *L. monocytogenes* (Slika 5.1.). Pozitivna reakcija na prisustvo *L. monocytogenes* je dobijena i nakon jednog koraka predobogaćenja primenom Real Time PCR metode

(Tabela 5.1.). Međutim, nakon sekvenciranja DNK fragmenta ovog gena i poređenja dobijene sekvence sa bazom podataka dostupnom na internetu (NCBI), utvrđeno je da ovih 8 izolata pripadaju retkom, prirodnom, atipičnom, avirulentnom, hemolitičnom soju *L. innocua* J1-023. Nakon jednog koraka predobogaćenja, primenom imunoenzimske mini Vidas metode, ovi uzorci su bili negativni na prisustvo vrste *L. monocytogenes* (Tabela 5.1.).

Klasičnim mikrobiološkim metodama dobijena su i 2 izolata *L. innocua* (5L, 1234/05) i 1 izolat *L. welshimeri* (D13). Primenom klasične PCR metode, Real time PCR i imunoenzimske metode, ovi uzorci su bili negativni na prisustvo vrste *L. monocytogenes* pa nije bilo potrebno raditi dalje sekvenciranje.

Tabela 5.1. Uporedna analiza klasičnih, molekularno bioloških i imunoenzimskih metoda za uzorke pozitivne na prisustvo *L. monocytogenes* i *Listeria* sp.

Šifra uzorka	Predobogaćenje		Klasičan metod	Klasičan PCR	Sekvenciranje DNK molekula
	mini Vidas	Real Time PCR			
1	+	+	<i>L. monocytogenes</i>	+	<i>L. monocytogenes</i> NRRL_B-33446
9	+	+	<i>L. monocytogenes</i>	+	<i>L. monocytogenes</i> NRRL_B-33446
3L	-	+	<i>L. grayi</i>	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023
4L	-	+	<i>L. grayi</i>	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023
5L	-	-	<i>L. innocua</i>	-	Nije utvrđeno
1234/0 5	-	-	<i>L. innocua</i>	-	Nije utvrđeno
D11	+	+	<i>L. monocytogenes</i>	+	<i>L. monocytogenes</i> NRRL_B-33467
D21	+	+	<i>L. monocytogenes</i>	+	<i>L. monocytogenes</i> NRRL_B-33467
E11	+	+	<i>L. monocytogenes</i>	+	<i>L. monocytogenes</i> NRRL_B-33467
E21	-	+	<i>L. grayi</i>	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023
D12	-	+	neprihvatljiv profil	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023
D22	-	+	neprihvatljiv profil	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023
E12	-	+	neprihvatljiv profil	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023
E22	-	+	neprihvatljiv profil	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023
D13	-	-	<i>L. welshimeri</i>	-	Nije utvrđeno
D23	+	+	<i>L. monocytogenes</i>	+	<i>L. monocytogenes</i> NRRL_B-33467
E23	+	+	<i>L. monocytogenes</i>	+	<i>L. monocytogenes</i> NRRL_B-33467
D14	-	+	<i>L. grayi</i>	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023



Slika 5.1. Rezultati elektroforeze PCR proizvoda dobijenih pomoću prajmera specifičnih za *hlyA* gen.

### 5.1.2. Određivanje osjetljivosti PCR metode kod identifikacije *Listeria* sp. i *Listeria monocytogenes*

#### 5.1.2.1. Određivanje ukupnog broja bakterija iz roda *Listeria*

U cilju praćenja parametara koji utiču na osjetljivost PCR metode, korišćena su serijska decimalna razblaženja referentnih sojeva *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115 i *L. innocua* ATCC 33090 kod eksperimentalno kontaminiranih uzoraka pasterizovanog mleka. Koncentracije listerija, pravljene u opsegu od 1 do  $1 \times 10^7$  CFU ml<sup>-1</sup>, su pripremljene u sterilnom fiziološkom rastvoru (0.9% NaCl). Paralelno je izvršena eksperimentalna kontaminacija uzoraka pasterizovanog mleka i zasejavanje na BHA u cilju određivanja početnog broja ćelija sojeva *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115 i *L. innocua* ATCC 33090.

Broj kolonija referentnih sojeva *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115 i *L. innocua* ATCC 33090, izraslih na BHA podlozi nakon 24 h inkubacije, je prikazan u Tabeli 5.1.2.1.

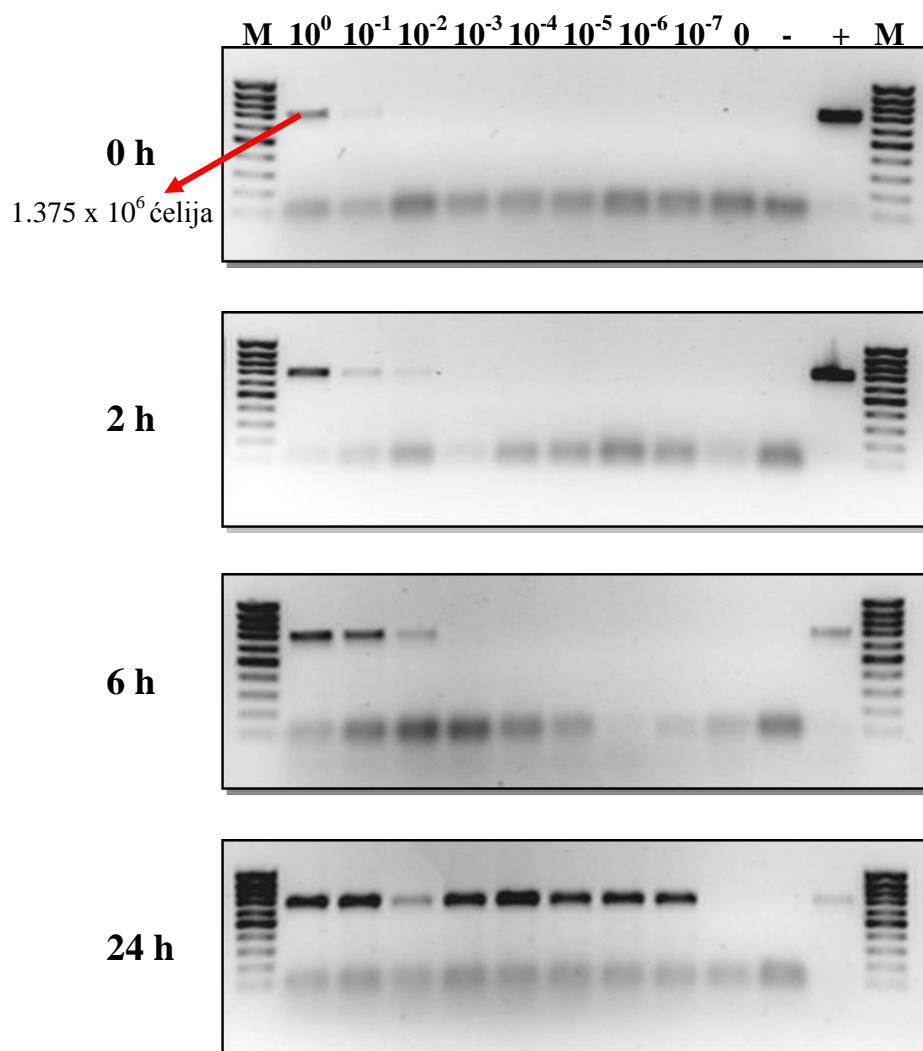
Tabela 5.1.2.1. Broj izraslih kolonija referentnih sojeva listerije na BHA.

Referentni soj	Vreme inkubacije na 37°C	CFU/ml
<i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 19115	24 h	$2.2 \times 10^8$
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	24 h	$1.5 \times 10^8$



### 5.1.2.2. Uticaj predobogaćenja na osetljivost PCR detekcije *L. monocytogenes*

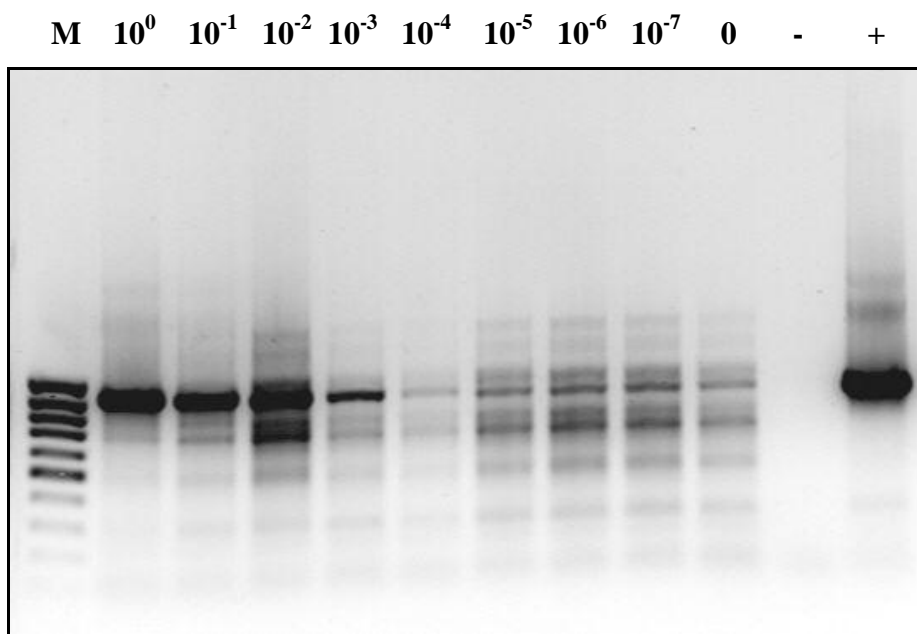
Tokom predobogaćenja, *L. monocytogenes* se umnožava u uzorku, što povećava mogućnost njene detekcije primenom PCR metode. Rezultati PCR reakcije direktno iz uzoraka eksperimentalno kontaminiranog mleka različitim koncentracijama *L. monocytogenes* (0 h) i istih uzoraka inkubiranih na 37°C tokom 2, 6 i 24 h su prikazani na Slici 5.1.2.2.1.



Slika 5.1.2.2.1. Rezultati elektroforeze PCR proizvoda dobijenih pomoću prajmera specifičnih za *hlyA* gen kod eksperimentalno kontaminiranih uzoraka mleka bez inkubacije (0 h) i nakon 2, 6 i 24 h inkubacije: M marker (MassRuler™ DNA Ladder),  $10^0$ - $10^{-7}$  serijska razblaženja *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, 0 nekontaminirani uzorak mleka, “-” negativna kontrola, “+” pozitivna kontrola *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115.

Broj ćelija *L. monocytogenes* koji je detektovan PCR metodom direktno iz uzoraka iznosio je  $1.375 \times 10^6$ . Nakon inkubacije od 24 h na 37°C, detektovana je 1 CFU/ml mleka.

U slučaju eksperimentalne kontaminacije uzoraka pasterizovanog mleka serijskim razblaženjima soja *L. innocua* ATCC 33090, izvršena je direktna izolacija bakterijskih DNK. Rezultati PCR reakcija sa prajmerima specifičnim za 16S rDNK, ukazuju da je moguća detekcija referentnog soja *L. innocua* ATCC 33090 u svim razblaženjima, kao i u nekontaminiranom uzorku mleka (Slika 5.1.2.2.2.). Dobijeni rezultati su u korelaciji sa podacima iz literature, s obzirom da su Aznar i Alarcón (2003) dobili PCR proizvode očekivane dužine u nekontaminiranom uzorku, pomoću prajmera (L1/L2) komplementarnih 16S rDNK. Zbog univerzalne prirode ciljnog gena, isti autori dovode u sumnju specifičnost prajmera komplementarnih 16S rDNK. Veličina specifičnog fragmenta za 16S rDNK iznosi 938 bp.



Slika 5.1.2.2.2. Rezultati elektroforeze PCR proizvoda dobijenih pomoću prajmera specifičnih za 16S rDNK kod eksperimentalno kontaminiranih uzoraka mleka bez inkubacije: M marker (MassRuler™ DNA Ladder), 10<sup>0</sup>-10<sup>-7</sup> serijska razblaženja *L. innocua* ATCC 33090, 0 nekontaminirani uzorak mleka, "-" negativna kontrola, "+" pozitivna kontrola *L. innocua* ATCC 33090.

## 5.2. Ispitivanje briseva sa površina u restoranu

U ovoj studiji su ispitani brisevi, uzeti iz restorana u okolini Beograda. Uzorkovanje je izvršeno sa 47 mesta u restoranu, u tri ponavljanja. Izabrane su sledeće lokacije: prostorija za prijem robe, prostorije za skladištenje sirovina i kuhinja.

### 5.2.1. Rezultati prvog, drugog i trećeg uzorkovanja briseva

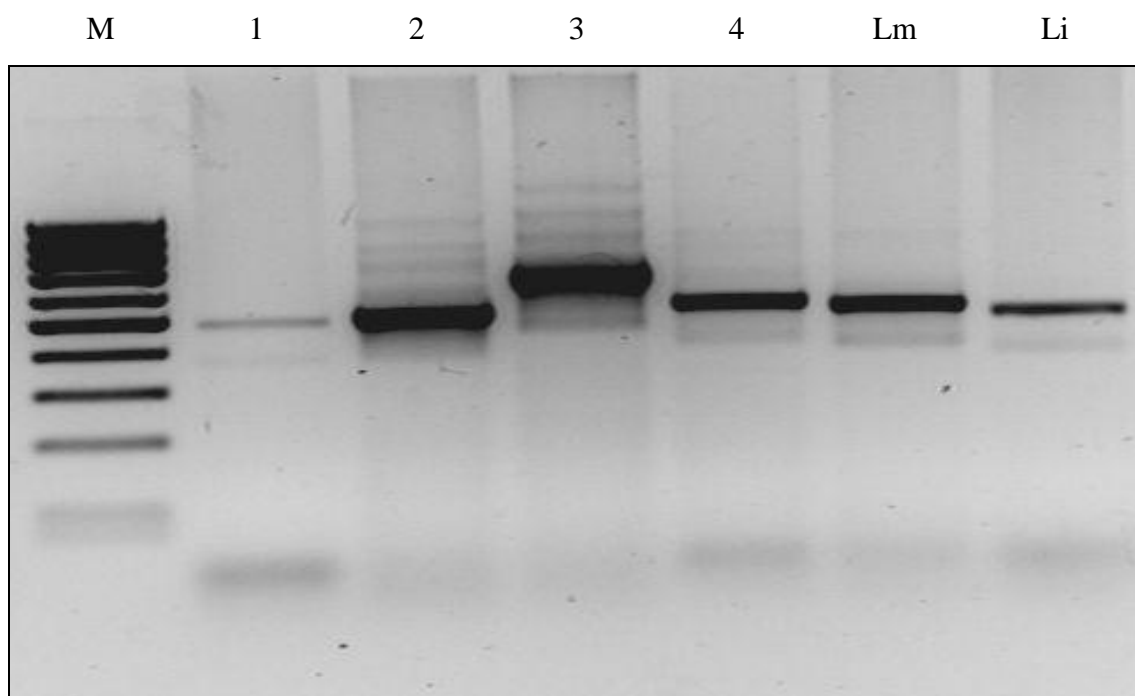
Od ukupno 47 briseva, u toku prvog uzorkovanja, 4 izolata je bilo pozitivno na prisustvo bakterija iz roda *Listeria* (Prilog A). Klasičnim mikrobiološkim metodama identifikovano je prisustvo *L. welshimeri* u brisu sa poda komore (U2-02-2) i u brisu iz slivnika lavaboa za odmrzavanje mesa (U3-01-2), *L. monocytogenes* u brisu sa daske za sečenje hleba (U3-03-2) i *L. innocua* u brisu iz slivnika na podu (U3-05-2). Na mikroskopskim preparatima, svi navedeni izolati su bili Gram-pozitivni štapići sa zaobljenim krajevima. Relevantna karakteristika je i pozitivna katalaza reakcija sva četiri izolata. Međutim, samo je izolat U3-03-2 pokazao pozitivnu reakciju  $\beta$  hemolize na ovčijem krvnom agaru. U toku mikrobioloških analiza, identifikacija do nivoa vrste je izvršena API *Listeria* sistemom (API *Listeria*, bioMerieux, Francuska). Kompjuterskim upoređivanjem dobijenih biohemijskih karakteristika sa referentnim sojevima vrsta *Listeria*, značajnost rezultata je izražena u procentima.

Izolati, koji su na osnovu klasičnih mikrobioloških metoda determinisani kao pripadnici roda *Listeria*, su podvrgnuti proveru PCR metodom pomoću prajmera specifičnih za virulentni *hlyA* gen i visoko konzervisani *iap* gen. PCR metodom sa prajmerima za *hlyA* gen, potvrđeno je da izolat U3-03-2 pripada vrsti *L. monocytogenes* (Slika 5.2.1.4., oznaka br. 2).

Dobijeni rezultati PCR metodom pomoću prajmera za visoko konzervisani *iap* gen prisutan kod bakterija roda *Listeria*, ukazuju na postojanje fragmenata koji se malo razlikuju po veličini između vrsta (Slika 5.2.1.1.), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Cocolin *et al.*, 2002) da *L. monocytogenes* i *L. innocua* u izabranom regionu *iap* gena sadrže delecije u poređenju sa drugim vrstama iz roda *Listeria* (*L. seeligeri*, *L. ivanovii* i *L. welshimeri*).

U ovom eksperimentu, na osnovu dužine dobijenog PCR proizvoda za izolat U3-05-2 (Slika 5.2.1.1., oznaka br. 4), moglo se pretpostaviti da se radi o vrsti *L. monocytogenes*. Međutim, nakon sekvenciranja i poređenja dobijene sekvence sa bazom podataka dostupnom na internetu (NCBI), utvrđena je homologija od 92% sa vrstom *L. innocua*.

U toku prvog uzorkovanja, dobijeni rezultat klasičnih mikrobioloških metoda nije bio pouzdan samo u slučaju brisa U2-02-2 (Prilog A). U toku mikrobiološke analize, API Listeria biohemijskim nizom, izolat U2-02-2 je identifikovan da pripada vrsti *L. welshimeri* sa verovatnoćom od 96.8% i vrsti *L. innocua* sa verovatnoćom 3.1%. Rezultati PCR metode su pokazali da izolat U2-02-2 ipak pripada vrsti *L. innocua* (Slika 5.2.1.1., oznaka br. 1). PCR metodom je potvrđeno da izolat U3-01-2 pripada vrsti *L. welshimeri*.



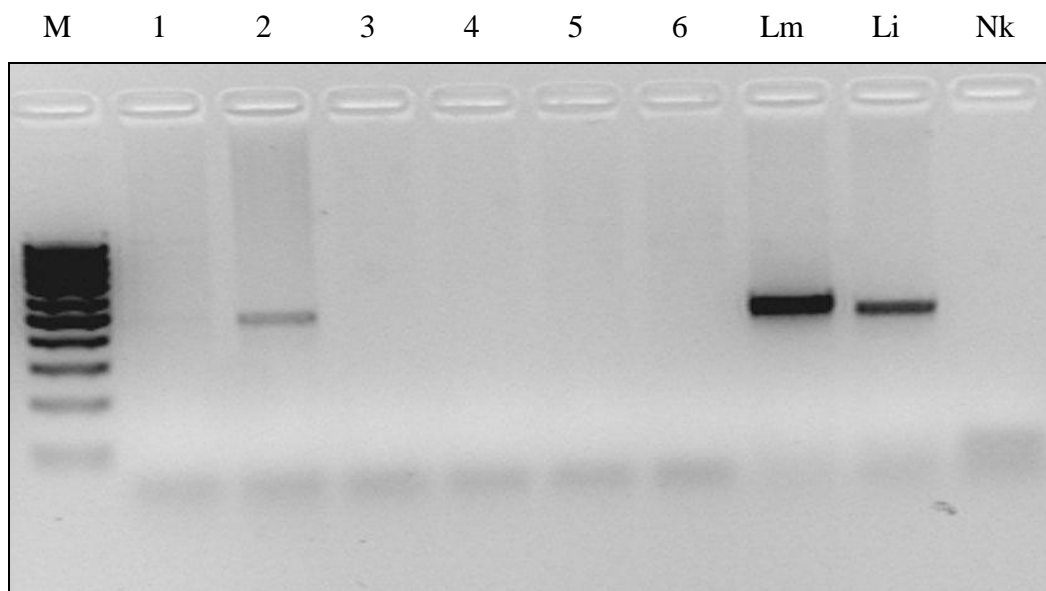
Slika 5.2.1.1. Rezultati elektroforeze PCR proizvoda dobijenih pomoću prajmera specifičnih za *iap* gen u toku prvog uzorkovanja: *M* marker (MassRuler™ DNA Ladder), *1*. izolat sa poda komore za hlađenje (U2-02-2), *2*. izolat sa daske za sečenje hleba (U3-03-2), *3*. izolat iz slivnika lavaboa za odmrzavanje mesa (U3-01-2), *4*. izolat iz slivnika na podu (U3-05-2), *Lm* - *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, *Li* - *L. innocua* ATCC 33090.

Od ukupno 47 briseva, u toku drugog uzorkovanja, 6 izolata je bilo pozitivno na prisustvo bakterija iz roda *Listeria* (Prilog A). Klasičnim mikrobiološkim testovima identifikovano je prisustvo pet izolata vrste *L. monocytogenes* u uzorcima briseva poreklom sa donje ivice komore za hlađenje (U2-01-2), iz slivnika u prostorijama za skladištenje sirovina (U2-08-1) i pripremu hrane (U3-05-2), sa poda komore za hlađenje (U3-08-2) i sa zadnjeg štita mašine za narezivanje (U3-11-2), kao i jedan uzorak brisa iz slivnika pozitivan na prisustvo *L. innocua* (U3-05-1). Na mikroskopskim preparatima, svi navedeni izolati su bili Gram-pozitivni štapići sa zaobljenim krajevima. Relevantna karakteristika izolata je bila i pozitivna katalaza reakcija. U toku ispitivanja, svi pozitivni izolati iz roda *Listeria* nisu stvarali  $\beta$  hemolizu na ovčijem krvnom agaru.

Izolati, koji su na osnovu klasičnih mikrobioloških metoda determinisani kao pripadnici roda *Listeria*, su podvrgnuti proveru PCR metodom pomoću prajmera specifičnih za virulentni *hlyA* gen i visoko konzervisani *iap* gen.

U PCR reakciji, gde su korišćeni prajmeri specifični za *iap* gen, dobijen je fragment odgovarajuće veličine samo u slučaju izolata U2-08-1 (Slika 5.2.1.2., oznaka br. 2). Ostalih pet izolata nisu pokazali pozitivnu PCR reakciju na prisustvo vrsta iz roda *Listeria* (Slika 5.2.1.2., oznake br. 1, 3, 4, 5 i 6).

Rezultat PCR reakcije pomoću prajmera specifičnih za *hlyA* gen, je pokazao odsustvo PCR proizvoda kod izolata U2-08-1, čime je potvrđeno da izolat pripada vrsti *L. innocua*. Dobijeni rezultat je u saglasnosti i sa činjenicom da u toku mikrobiološke analize nijedan od prethodno identifikovanih izolata nije pokazao pozitivnu reakciju  $\beta$  hemolize na ovčijem krvnom agaru. Ostali izolati nisu podvrgnuti proveru ovim parom prajmera, jer nisu pokazali pozitivnu PCR reakciju na prisustvo vrsta iz roda *Listeria*.



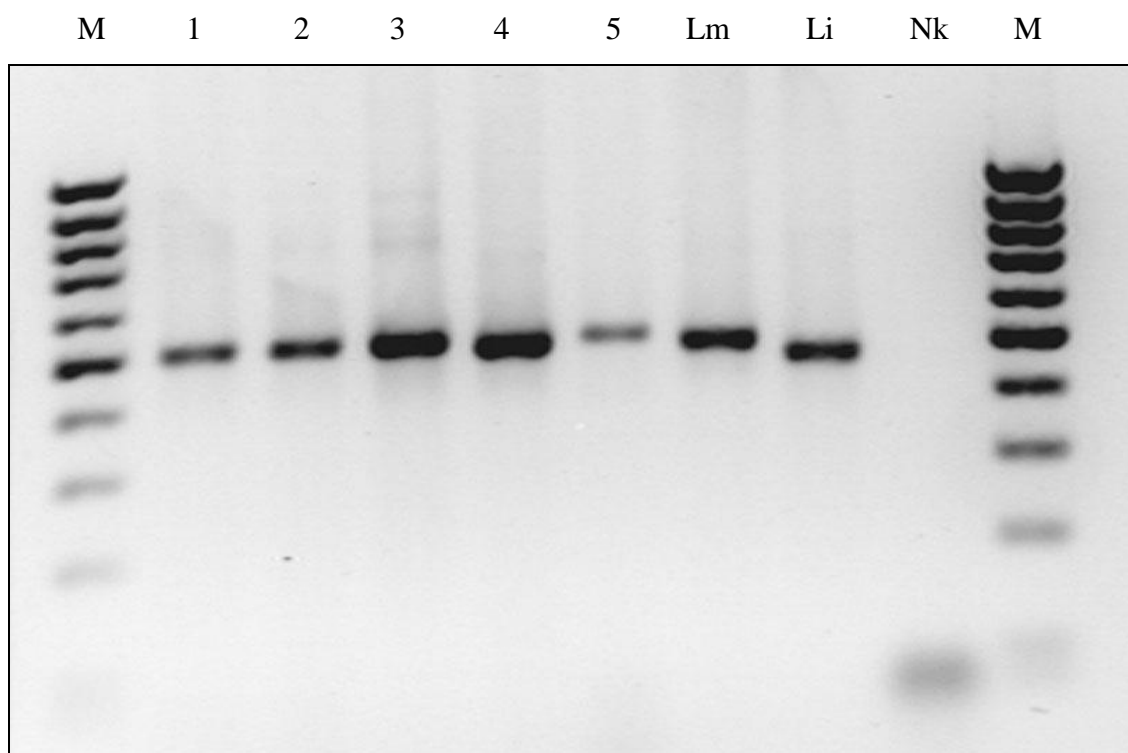
Slika 5.2.1.2. Rezultati elektroforeze PCR proizvoda dobijenih pomoću prajmera specifičnih za *iap* gen, u toku drugog uzorkovanja: *M* marker (MassRuler™ DNA Ladder), *1*. izolat sa donje ivice komore za hlađenje (U2-01-2), *2*. izolat iz slivnika (U2-08-1), *3*. izolat iz slivnika (U3-05-1), *4*. izolat iz slivnika (U3-05-2), *5*. izolat sa poda komore za hlađenje (U3-08-2), *6*. izolat sa zadnjeg štita mašine za narezivanje (U3-11-2), *Lm* - *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, *Li* - *L. innocua* ATCC 33090, "*Nk*" - negativna kontrola.

Od ukupno 47 briseva, u toku trećeg uzorkovanja, 5 izolata je bilo pozitivno na prisustvo bakterija iz roda *Listeria* (Prilog A). Tri izolata, poreklom iz briseva sa poda (U2-05-1) i iz slivnika (U2-08-1 i U3-05-2), sa verovatnoćom od 65.7% pripadao je vrsti *L. welshimeri*, izolat poreklom iz brisa iz ugla zida (U2-06-2) vrsti *L. innocua* (99.6%) i izolat poreklom iz brisa iz slivnika lavaboa za odmrzavanje mesa (U3-01-2) vrsti *L. monocytogenes*. U toku mikrobiološke analize, API *Listeria* biohemijskim nizom, izolati U2-05-1, U2-08-1 i U3-05-2 su identifikovani kao vrsta *L. welshimeri* sa verovatnoćom od 65.7% i kao vrsta *L. innocua* sa verovatnoćom od 34.1%. Na mikroskopskim preparatima, svi izolati su bili Gram-pozitivni štapići sa zaobljenim krajevima. Relevantna karakteristika je bila i pozitivna katalaza reakcija svih pet izolata. Međutim, samo je izolat U3-01-2 pokazao pozitivnu reakciju  $\beta$  hemolize na ovčijem krvnom agaru.

Izolati, koji su na osnovu klasičnih mikrobioloških metoda determinisani kao pripadnici roda *Listeria*, su podvrgnuti proveru PCR metodom pomoću prajmera specifičnih za virulentni *hlyA* gen i visoko konzervisani *iap* gen. Rezultati PCR reakcije

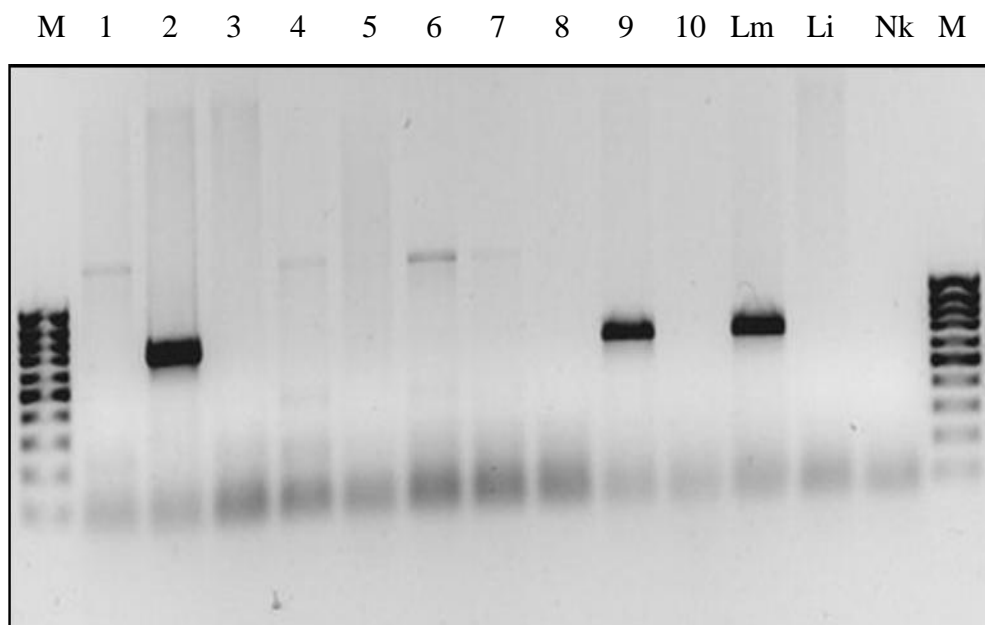
pomoću prajmera specifičnih za *iap* gen, su pokazali da pet izolata pripadaju vrstama iz roda *Listeria* (Slika 5.2.1.3., oznake br. 1, 2, 3, 4, 5). Među njima su i tri izolata koja su, primenom API Listeria biohemijskog niza, sa verovatnoćom od 65.7% identifikovana kao *L. welshimeri*, a primenom *iap* prajmera je pokazano da pripadaju vrsti *L. innocua* (Slika 5.2.1.3., uzorci br. 1, 3, 5).

PCR metodom pomoću prajmera specifičnih za *hlyA* gen, je potvrđeno da izolat U3-01-2 pripada vrsti *L. monocytogenes* (Slika 5.2.1.4., oznaka br. 9).



Slika 5.2.1.3. Rezultati elektroforeze PCR proizvoda dobijenih pomoću prajmera specifičnih za *iap* gen, u toku trećeg uzorkovanja: *M* marker (MassRuler™ DNA Ladder), *1*. izolat sa poda (U2-05-1), *2*. izolat iz ugla zida (U2-06-2), *3*. izolat iz slivnika (U2-08-1), *4*. izolat iz slivnika lavaboa za odmrzavanje mesa (U3-01-2), *5*. izolat iz slivnika na podu (U3-05-2), *Lm* - *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, *Li* - *L. innocua* ATCC 33090, "*Nk*" - negativna kontrola.

Na Slici 5.2.1.4. predstavljeni su rezultati provere pozitivnih izolata PCR metodom, u toku prvog, drugog i trećeg uzorkovanja. Dobijeni rezultati PCR reakcija pomoću prajmera specifičnih za *hlyA* gen, ukazuju da izolat U3-03-2 u toku prvog uzorkovanja i izolat U3-01-2 u toku trećeg uzorkovanja pripadaju vrsti *L. monocytogenes* (Slika 5.2.1.4., oznake br. 2 i 9).



*Slika 5.2.1.4.* Rezultati elektroforeze PCR proizvoda dobijenih pomoću prajmera specifičnih za *hlyA* gen u toku prvog, drugog i trećeg uzorkovanja: M marker (MassRuler™ DNA Ladder), 1 izolat sa poda komore za hlađenje (U2-02-2), 2. izolat sa daske za sečenje hleba (U3-03-2), 3. izolat iz slivnika lavaboa za odmrzavanje mesa (U3-01-2), 4. izolat iz slivnika na podu (U3-05-2), 5. izolat iz slivnika (U2-08-1), 6. izolat sa poda (U2-05-1), 7. izolat iz ugla zida (U2-06-2), 8. izolat iz slivnika (U2-08-1), 9. izolat iz slivnika lavaboa za odmrzavanje mesa (U3-01-2), 10. izolat iz slivnika na podu (U3-05-2), *Lm* - *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, *Li* - *L. innocua* ATCC 33090, "Nk" - negativna kontrola.

### **5.3. Rezultati detekcije vrsta iz roda *Listeria* u toku proizvodnje tradicionalne fermentisane suve kobasice**

#### **5.3.1. Ispitivanje briseva i namirnica**

Rezultati ovih eksperimenata su ukazali da potencijalni izvori populacija bakterija iz roda *Listeria* u toku proizvodnje tradicionalne fermentisane suve kobasice mogu biti različiti. Tako je ova grupa bakterija u toku proizvodnje izolovana iz: brisa sa buta, brisa kecelje, nadeva bez i sa starter kulturom i začinske paprike (Tabela 5.3.1.1.).



Tabela 5.3.1.1. Potencijalni izvori populacije bakterija *Listeria* u toku proizvodnje tradicionalno fermentisane suve kobasice

Šifra uzorka	Naziv uzorka	Predobogaćenje		Klasičan metod	Klasičan PCR	Sekvenciranje DNK molekula
		mini Vidas	Real Time PCR			
1	bris buta	+	+	<i>L. monocytogenes</i>	+	<i>L. monocytogenes</i> NRRL_B-33446
9	bris kecelje	+	+	<i>L. monocytogenes</i>	+	<i>L. monocytogenes</i> NRRL_B-33446
3L	nadev bez starter kulture	-	+	<i>L. grayi</i>	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023
4L	nadev sa starter kulturom	-	+	<i>L. grayi</i>	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023
5L	začinska paprika	-	-	<i>L. innocua</i>	-	Nije utvrđeno

U cilju utvrđivanja zdravstvene ispravnosti tradicionalne fermentisane suve kobasice, koja pogoduje rastu i razvoju *L. monocytogenes*, praćena je kontaminacija bakterijama iz roda *Listeria* tokom njihovog skladištenja prema važećoj zakonskoj regulativi. Rezultati su pokazali prisustvo ove populacije bakterija u uzorcima kobasica skladištenim drugog (D11, D21, E11, E21), šestog (D12, D22, E12, E22), devetog (D13, D23, E23) i petnaestog dana (D14) (Tabela 5.3.1.2.).

Tabela 5.3.1.2. Rezultati detekcije *Listeria* sp. u uzorcima tokom proizvodnje tradicionalne fermentisane suve kobasice

Šifra uzorka	Naziv uzorka	Predobogaćenje		Klasičan metod	Klasičan PCR	Sekvenciranje DNK molekula
		mini Vidas	Real Time PCR			
D11	kobasica (2. dan)	+	+	<i>L. monocytogenes</i>	+	<i>L. monocytogenes</i> NRRL_B-33467
D21	kobasica (2. dan)	+	+	<i>L. monocytogenes</i>	+	<i>L. monocytogenes</i> NRRL_B-33467
E11	kobasica (2. dan)	+	+	<i>L. monocytogenes</i>	+	<i>L. monocytogenes</i> NRRL_B-33467
E21	kobasica (2. dan)	-	+	<i>L. grayi</i>	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023
D12	kobasica (6. dan)	-	+	neprihvatljiv profil	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023
D22	kobasica (6. dan)	-	+	neprihvatljiv profil	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023
E12	kobasica (6. dan)	-	+	neprihvatljiv profil	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023
E22	kobasica (6. dan)	-	+	neprihvatljiv profil	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023
D13	kobasica (9. dan)	-	-	<i>L. welshimeri</i>	-	Nije utvrđeno
D23	kobasica (9. dan)	+	+	<i>L. monocytogenes</i>	+	<i>L. monocytogenes</i> NRRL_B-33467
E23	kobasica (9. dan)	+	+	<i>L. monocytogenes</i>	+	<i>L. monocytogenes</i> NRRL_B-33467
D14	kobasica (15. dan)	-	+	<i>L. grayi</i>	+	<i>L. innocua</i> FSL J1-023

### 5.3.2. Ispitivanje fizičkih i hemijskih parametara u fermentisanim kobasicama

Preživljavanje i razmnožavanje populacije bakterija iz roda *Listeria* u uzorcima kobasica zavisi od aktivnosti vode, pH i drugih faktora koji učestvuju u zrenju fermentisanih kobasica.

Dobijene vrednosti fizičkih i hemijskih parametara u fermentisanim kobasicama (aktivnost vode, pH, sadržaj hlorida) prikazane su u Tabelama 5.3.2.1., 5.3.2.2. i 5.3.2.3.

Utvrđene vrednosti aktivnosti vode oglednih grupa fermentisanih kobasica D1, D2, E1 i E2 na početku fermentacije su iznosile 0.981, 0.957, 0.957 i 0.960. Na kraju procesa zrenja, vrednosti aktivnosti vode za ogledne grupe kobasica sušene na tradicionalan način (D1 i D2) su bile skoro ujednačene i iznosile su 0.804 i 0.820. Kobasice sušene u kontrolisanim uslovima su, na kraju procesa zrenja, imale daleko niže vrednosti aktivnosti vode (E1: 0.767 i E2: 0.783) od kobasica sušenih na tradicionalan način (Tabela 5.3.2.1.).

Tabela 5.3.2.1. Rezultati određivanja aktivnosti vode u fermentisanim kobasicama

UZORAK	VREME (dan)								
	0	2	6	9	15	30	65	90	120
D1		0.981	0.973	0.963	0.950	0.927	0.886	0.856	0.804
D2		0.957	0.969	0.955	0.964	0.925	0.898	0.858	0.820
E1		0.957	0.958	0.928	0.953	0.911	0.860	0.799	0.767
E2		0.960	0.964	0.943	0.952	0.914	0.873	0.793	0.783

Inicijalne vrednosti pH oglednih grupa fermentisanih kobasica D1, D2, E1 i E2 su iznosile  $5.54 \pm 0.03$ ,  $5.57 \pm 0.03$ ,  $5.55 \pm 0.01$  i  $5.55 \pm 0.03$ , respektivno. Nakon ovog perioda, vrednosti pH su u zavisnosti od vrste kobasice opadale negde sporije a negde brže. Najniže vrednosti pH za kobasice sušene na tradicionalan način (D1 i D2) su dostignute 30. dana fermentacije, da bi potom vrednosti pH kobasica počele polako da rastu, te su 120. dana proizvodnje iznosile  $5.22 \pm 0.06$  i  $5.10 \pm 0.03$ . Najniže vrednosti pH za kobasice sušene u kontrolisanim uslovima (E1 i E2) su dostignute 9. dana, a potom su procesi zrenja rezultirali u porastu pH, da bi u fazi optimalne zrelosti tj. 120. dana ova vrednost iznosila  $5.10 \pm 0.07$  i  $5.06 \pm 0.02$  (Tabela 5.3.2.2.).

Tabela 5.3.2.2. Rezultati određivanja pH u fermentisanim kobasicama

UZORAK	VREME (dan)								
	0	2	6	9	15	30	60	90	120
D1		5.54	5.62	5.50	5.22	4.98	5.00	5.11	5.15
		5.51	5.51	5.48	5.26	5.05	5.06	5.16	5.21
		5.58	5.62	5.55	5.25	5.07	5.01	5.14	5.22
		5.54	5.58	5.50	5.29	5.07	5.06	5.19	5.29
		<b>5.54</b>	<b>5.58</b>	<b>5.51</b>	<b>5.26</b>	<b>5.04</b>	<b>5.03</b>	<b>5.15</b>	<b>5.22</b>
		0.03	0.05	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.06
D2		5.54	5.57	5.31	5.03	4.88	4.96	5.12	5.08
		5.54	5.53	5.32	5.12	4.97	5.01	5.16	5.12
		5.59	5.58	5.39	5.04	4.91	4.96	5.08	5.08
		5.59	5.51	5.38	5.12	4.96	5.01	5.12	5.13
		<b>5.57</b>	<b>5.55</b>	<b>5.35</b>	<b>5.08</b>	<b>4.93</b>	<b>4.99</b>	<b>5.12</b>	<b>5.10</b>
		0.03	0.03	0.04	0.05	0.04	0.03	0.03	0.03
E1		5.55	5.00	4.85	4.83	4.92	5.03	5.19	5.03
		5.55	5.00	4.92	4.92	4.94	5.10	5.25	5.11
		5.57	4.95	4.80	4.85	4.91	5.09	5.20	5.08
		5.54	4.99	4.91	4.94	4.94	5.12	5.23	5.19
		<b>5.55</b>	<b>4.99</b>	<b>4.87</b>	<b>4.89</b>	<b>4.93</b>	<b>5.09</b>	<b>5.22</b>	<b>5.10</b>
		0.01	0.02	0.06	0.05	0.02	0.04	0.03	0.07
E2		5.59	4.75	4.71	4.73	4.84	4.96	5.15	5.05
		5.51	4.85	4.80	4.78	4.87	4.98	5.16	5.08
		5.55	4.78	4.71	4.72	4.84	4.94	5.16	5.04
		5.54	4.83	4.77	4.79	4.86	4.96	5.17	5.07
		<b>5.55</b>	<b>4.80</b>	<b>4.75</b>	<b>4.76</b>	<b>4.85</b>	<b>4.96</b>	<b>5.16</b>	<b>5.06</b>
		0.03	0.05	0.04	0.04	0.02	0.02	0.01	0.02

Sadržaj hlorida na početku ispitivanja oglednih grupa fermentisanih kobasica D1, D2, E1 i E2 je bio ujednačen i iznosio je  $1.80 \pm 0.03$ ,  $1.82 \pm 0.03$ ,  $1.80 \pm 0.03$  i  $1.82 \pm 0.03$ , respektivno. U gotovom proizvodu, sadržaj hlorida je varirao od  $3.85 \pm 0.06$  do  $3.95 \pm 0.03$  (Tabela: 5.3.2.3.) i povećavao se direktno u korelaciji sa sadržajem vode. Dakle, vrednosti sadržaja NaCl u fermentisanim kobasicama su se kretale u veoma uskom intervalu i niže su od većine do sada utvrđenih vrednosti ovog parametra u različitim fermentisanim kobasicama.

Tabela 5.3.2.3. Rezultati određivanja sadržaja hloriga u fermentisanim kobasicama

		Hloridi								Neupakovana		Vakuum
Uzorak	Dani	0	2	6	9	15	30	65	90	120	120	
<b>D1</b>	<b>1</b>	1.78	1.91	2.03	2.17	2.29	2.61	3.27	3.36	3.88	3.70	
	<b>2</b>	1.82	2.01	2.10	2.03	2.37	2.62	3.09	3.22	3.93	3.58	
	<b>3</b>	1.80	1.96	2.07	2.10	2.33	2.62	3.18	3.29	3.91	3.64	
	<b>Xsr</b>	<b>1.80</b>	<b>1.96</b>	<b>2.07</b>	<b>2.10</b>	<b>2.33</b>	<b>2.62</b>	<b>3.18</b>	<b>3.29</b>	<b>3.91</b>	<b>3.64</b>	
	<b>Sd</b>	<b>0.03</b>	<b>0.07</b>	<b>0.05</b>	<b>0.10</b>	<b>0.06</b>	<b>0.01</b>	<b>0.13</b>	<b>0.10</b>	<b>0.04</b>	<b>0.08</b>	

		Hloridi								Neupakovana		Vakuum
Uzorak	Dani	0	2	6	9	15	30	65	90	120	120	
<b>D2</b>	<b>1</b>	1.84	1.87	2.08	2.15	2.12	2.61	3.14	3.49	3.81	3.56	
	<b>2</b>	1.80	1.92	1.96	2.08	2.24	2.50	3.10	3.46	3.89	3.54	
	<b>3</b>	1.82	1.90	2.02	2.12	2.18	2.56	3.12	3.48	3.85	3.55	
	<b>Xsr</b>	<b>1.82</b>	<b>1.90</b>	<b>2.02</b>	<b>2.12</b>	<b>2.18</b>	<b>2.56</b>	<b>3.12</b>	<b>3.48</b>	<b>3.85</b>	<b>3.55</b>	
	<b>Sd</b>	<b>0.03</b>	<b>0.04</b>	<b>0.08</b>	<b>0.05</b>	<b>0.08</b>	<b>0.08</b>	<b>0.03</b>	<b>0.02</b>	<b>0.06</b>	<b>0.01</b>	

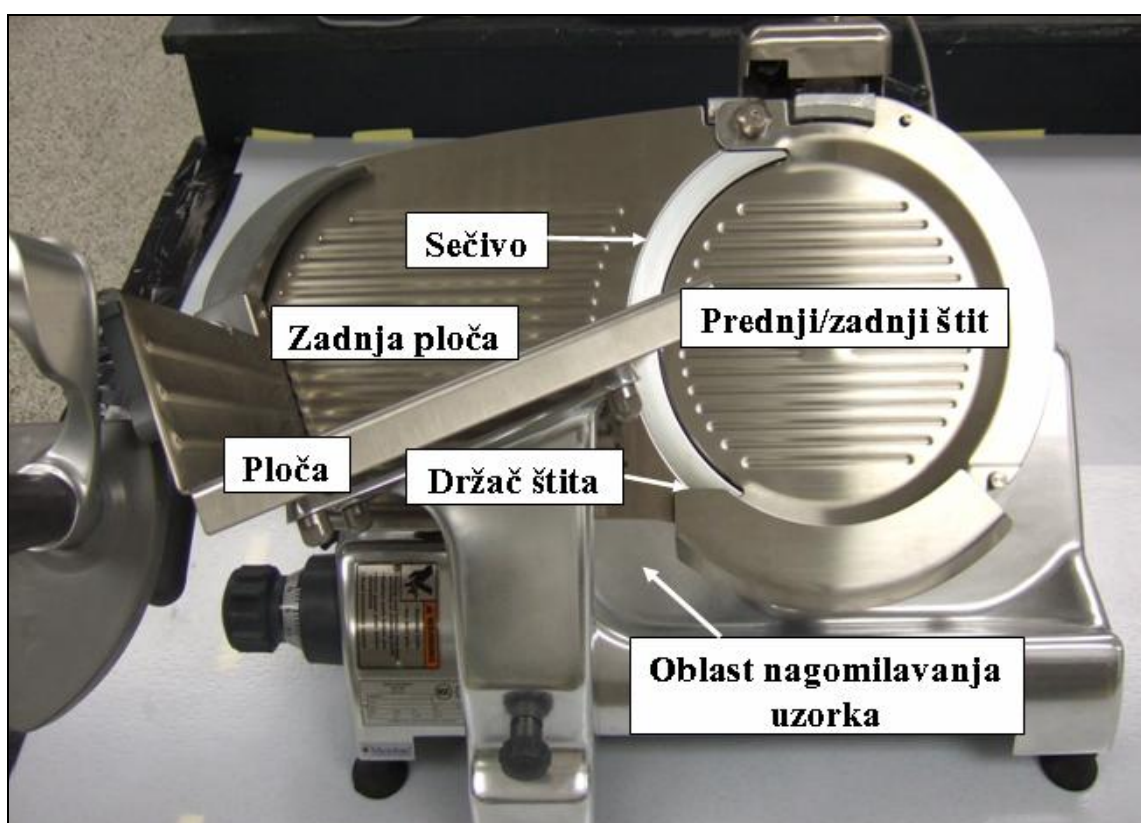
		Hloridi								Neupakovana		Vakuum		Hitozan	
Uzorak	Dani	0	2	6	9	15	30	65	90	120	90	120	90	120	
<b>E1</b>	<b>1</b>	1.78	1.98	2.27	2.26	2.53	2.99	3.39	3.63	3.93	3.50	3.39	3.78	3.93	
	<b>2</b>	1.82	2.13	2.31	2.34	2.44	2.88	3.46	3.68	3.97	3.40	3.47	3.75	3.91	
	<b>3</b>	1.80	2.05	2.29	2.30	2.49	2.94	3.43	3.66	3.95	3.45	3.43	3.77	3.92	
	<b>Xsr</b>	<b>1.80</b>	<b>2.05</b>	<b>2.29</b>	<b>2.30</b>	<b>2.49</b>	<b>2.94</b>	<b>3.43</b>	<b>3.66</b>	<b>3.95</b>	<b>3.45</b>	<b>3.43</b>	<b>3.77</b>	<b>3.92</b>	
	<b>Sd</b>	<b>0.03</b>	<b>0.11</b>	<b>0.03</b>	<b>0.06</b>	<b>0.06</b>	<b>0.08</b>	<b>0.05</b>	<b>0.04</b>	<b>0.03</b>	<b>0.07</b>	<b>0.06</b>	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>	

		Hloridi								Neupakovana		Vakuum		Hitozan	
Uzorak	Dani	0	2	6	9	15	30	65	90	120	90	120	90	120	
<b>E2</b>	<b>1</b>	1.84	1.92	2.23	2.42	2.38	2.94	3.35	3.73	3.82	3.27	3.40	3.73	3.82	
	<b>2</b>	1.80	2.04	2.30	2.32	2.46	3.03	3.40	3.69	3.96	3.36	3.36	3.63	3.78	
	<b>3</b>	1.82	1.98	2.27	2.37	2.42	2.99	3.38	3.71	3.89	3.32	3.38	3.68	3.80	
	<b>Xsr</b>	<b>1.82</b>	<b>1.98</b>	<b>2.27</b>	<b>2.37</b>	<b>2.42</b>	<b>2.99</b>	<b>3.38</b>	<b>3.71</b>	<b>3.89</b>	<b>3.32</b>	<b>3.38</b>	<b>3.68</b>	<b>3.80</b>	
	<b>Sd</b>	<b>0.03</b>	<b>0.09</b>	<b>0.05</b>	<b>0.07</b>	<b>0.06</b>	<b>0.06</b>	<b>0.04</b>	<b>0.03</b>	<b>0.10</b>	<b>0.06</b>	<b>0.03</b>	<b>0.07</b>	<b>0.03</b>	

## 5.4. Kontaminacija suvomesnatih proizvoda bakterijom *Listeria monocytogenes* u toku narezivanja

Kvantitativni transfer *L. monocytogenes*, sa kontaminiranih suvomesnatih proizvoda na različite kontaktne površine uređaja za narezivanje, zavisi od temperature čuvanja i vlažnosti proizvoda.

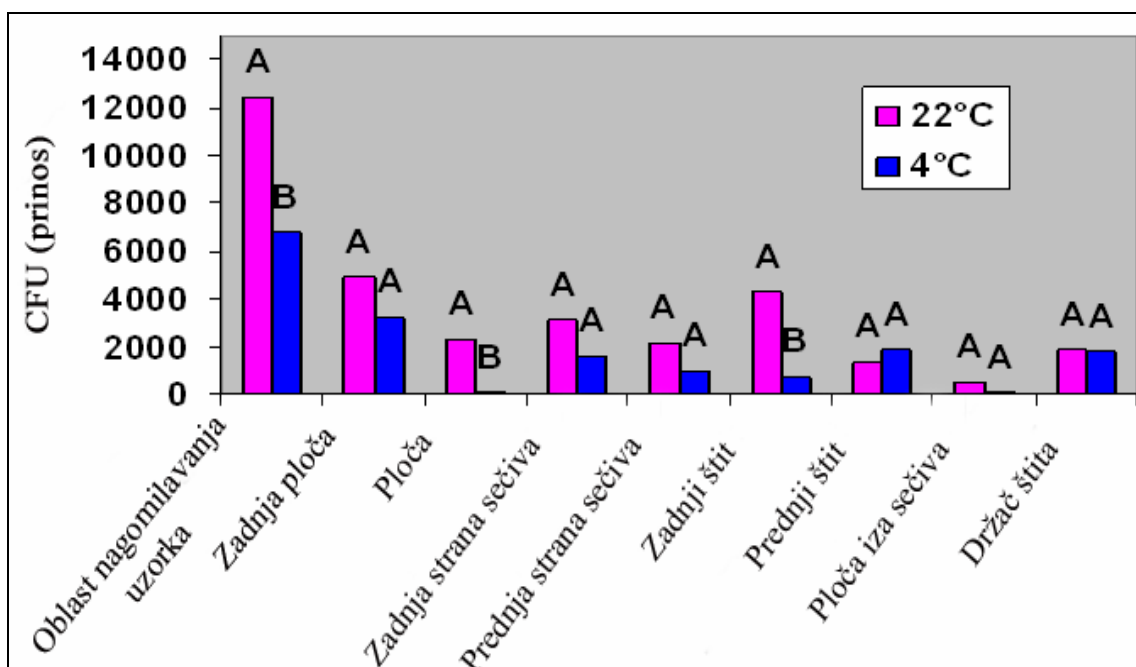
Obrada različitih suvomesnatih proizvoda izvršena je na uređaju za narezivanje (proizvođač Hobart, model 2612), prikazanom na Slici 5.4.1.



Slika 5.4.1. Kontaktne površine uređaja za narezivanje.

Rezultati su pokazali da, u toku komercijalne obrade šunke, čuvane na različitim temperaturama, sve kontaktne površine uređaja za narezivanja predstavljaju potencijalni izvor bakterije *L. monocytogenes*. Rezultati dobijeni klasičnim mikrobiološkim metodama su pokazali da je transfer *L. monocytogenes* sa sečiva na različite komponente uređaja značajno veći posle narezivanja šunke koja je čuvana na sobnoj temperaturi nego na temperaturi hlađenja, kako je prikazano na Slici 5.4.2. Procena

rizika za kontaminaciju bakterijom *L. monocytogenes* u odnosu na različite delove uređaja za narezivanje je izvršena na osnovu broja ćelija *Listeria* po cm<sup>2</sup> površine korišćenjem finih, jednoslojnih abrazivnih maramica. Dobijeni rezultati ukazuju da, iako svi delovi predstavljaju izvor patogenih bakterija, ipak postoje visoko rizične kontaktne površine uređaja. Tako su visoko rizične kontaktne površine: oblast nagomilavanja uzorka, zadnja ploča, zadnji štit i držač štita. Osim toga, rezultati su pokazali da za 3 kontaktne površine (oblast nagomilavanja uzorka, ploča i zadnji štit) postoji značajno različit potencijal ( $P < 0.05$ ) za transfer bakterije *L. monocytogenes* na različitim temperaturama. Da bi se prikazao značajno različiti transfer na sobnoj temperaturi i temperaturi hlađenja, prethodno navedene kontaktne površine su označene simbolima A i B, gde B predstavlja vrednost statističke značajnosti ( $P < 0.05$ ) (Slika 5.4.2.). Svi proračuni su izvršeni korišćenjem Statgraphics programa, verzija 3.3 (Sigma Plus, Pariz, Francuska).

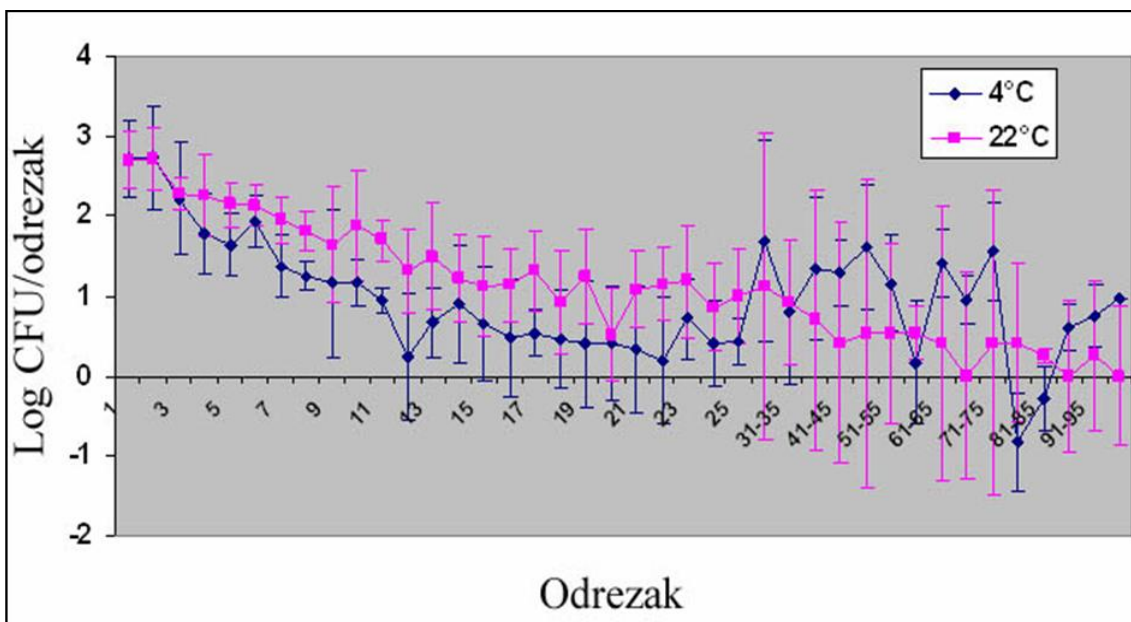


Slika 5.4.2. Transfer *L. monocytogenes* sa sečiva na različite kontaktne površine mesoreznice posle narezivanja. Simboli AB označavaju kontaktne površine sa značajno različitim potencijalom za transfer bakterije *L. monocytogenes* ( $P < 0.05$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

Rezultati eksperimenata su pokazali i da kvantitativni transfer *L. monocytogenes*, sa eksperimentalno kontaminirane šunke na kontaktne površine uređaja za narezivanje, a zatim na nekontaminiranu šunku, zavisi od temperature čuvanja proizvoda, sadržaja vode i procenta masti u samim proizvodima. Naime, ustanovljeno je da šunka sa većim sadržajem vode (73% vlažnost/3.7% masti) pokazuje značajno veći potencijal za transfer bakterija ukoliko je čuvana na sobnoj temperaturi nego na temperaturi hlađenja (Slika 5.4.3.). Osim toga, Slika 5.4.3. pokazuje da je za šunku sa visokim sadržajem vode transfer bakterije *L. monocytogenes* najveći za odreske označene brojevima 1 i 2. Za ostale odreske, označene brojevima do 25, može se uočiti da mogućnost transfera logaritamski opada. Odresci mikrobiološki ispravne šunke, označeni od 1 do 25, su ispitivani klasičnim metodama direktno po narezivanju na mesoreznici. Ukoliko se posle perioda inkubacije kod nekih uzoraka nisu pojavile tipične kolonije *L. monocytogenes*, dati uzorci su posle koraka predobogaćenja nanošeni na MOX agar u cilju njihove detekcije.

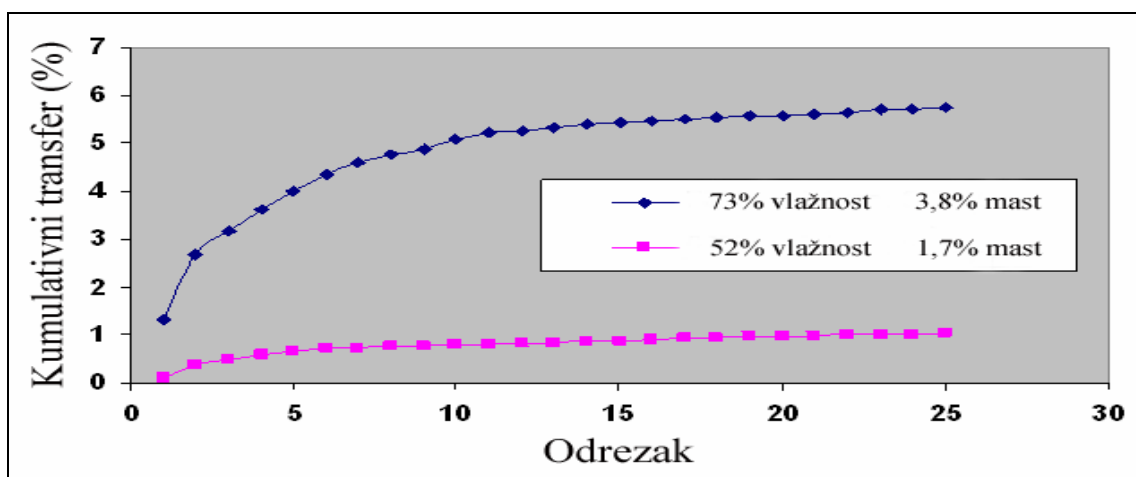
Eksperiment je ukazao i na činjenicu da je u odrescima označenim brojevima od 26 do 100, čuvanim pet dana na temperaturi hlađenja, potencijal za transfer bio sporadičan sa značajnim razlikama u standardnim devijacijama (Slika 5.4.3.).

Posle koraka predobogaćenja, procenti detektovane *L. monocytogenes* u uzorcima šunke od 26 do 100, su bili 96% i 98.7% na temperaturama čuvanja od 4°C i 22°C.



Slika 5.4.3. Uzastopni transfer *L. monocytogenes* sa sečiva mesoreznice na parčiće (odreske) šunke (73%vlažnost/3.7% masti) koja je držana na temperaturi 4 i 22 °C.

Osim toga, rezultati eksperimenata su pokazali da se na šunku sa većim sadržajem vode (73% vlažnost/3.7% masti) brže i lakše prenosi bakterija *L. monocytogenes* u odnosu na šunku sa nižim sadržajem vode i masti (52% vlažnost/1.7% masti). U ovom slučaju, proizvodi čuvani na istoj temperaturi, ali drugačijeg sastava pokazuju različiti stepen transfera bakterije *L. monocytogenes* (Slika 5.4.4.).



Slika 5.4.4. Kumulativni (ukupni) transfer *L. monocytogenes* sa oštrice uređaja za narezivanje na dva proizvoda šunke različitog sastava, čuvana na 22 °C



## 6. Diskusija

*Listeria monocytogenes* je fakultativni intraćelijski parazit, prouzročivač listerioze, ozbiljnog infektivnog oboljenja kod ljudi i životinja (Farber and Peterkin, 1991). Starije osobe, trudnice, novorođenčad i osobe sa oslabljenim imunskim sistemom predstavljaju visoko osetljivu populaciju u odnosu na listeriozu i kod njih češće dolazi do nastanka meningoencefalitisa, septikemije, konvulzija, gastroenteritisa, intrauterinih ili cervikalnih infekcija i mogućeg smrtnog ishoda.

Rezervoari *L. monocytogenes* su: prirodna staništa, industrijski pogoni za proizvodnju hrane, hrana, čovek i životinje. Smatra se da je kontaminirana hrana primarni izvor infekcije u epidemijama i sporadičnim slučajevima listerioze ljudi. *L. monocytogenes* je izolovana iz mnogih vrsta namirnica, kako animalnog, tako i biljnog porekla. Mnoge domaće i divlje životinje mogu da budu latentno inficirane *L. monocytogenes*, a samim tim i da predstavljaju značajan rezervoar ovog mikroorganizma (Dimitrijević *et al.*, 2008).

Poslednjih godina *L. monocytogenes* se smatra ozbiljnim postprocesnim kontaminantom, jer dovodi do kontaminacije termički obrađenih namirnica. U okviru 20 kategorija "Ready to eat" hrane, suvomesnati proizvodi predstavljaju hranu visokog rizika u odnosu na pojavu listerioze (U. S. Food and Drug Administration, the Food Safety and Inspection Service, 2001). Smatra se da su putevi unakrsne kontaminacije u domaćinstvima, maloprodajnim objektima i komercijalnim kuhinjama: daske za sečenje, suđeri, rukavice, krpe za držanje vrelih sudova, krpe za brisanje i delovi opreme za rad izrađeni od različitih materijala (Vorst *et al.*, 2006a).

S obzirom na značaj *L. monocytogenes* za bezbednost hrane, kao i činjenica da se ovaj mikroorganizam umnožava u hrani tokom skladištenja u hladnom lancu, veoma je važno da se *L. monocytogenes* detektuje što brže i primenom visoko osetljivih, specifičnih i pouzdanih metoda. Stoga smo u ovom radu uporedno ispitivali mikrobiološke, molekularno biološke i imunoenzimske metode za izolaciju, detekciju i karakterizaciju *L. monocytogenes*.

## **6.1. Usporedno ispitivanje mikrobioloških, molekularno bioloških i imunoenzimskih metoda za izolaciju, detekciju i karakterizaciju *L. monocytogenes***

Kao što se iz podataka prikazanih u Tabeli 5.1. vidi, klasičnim mikrobiološkim metodama identificirano je 7 izolata kao *L. monocytogenes*. Kao osnova za dalju molekularnu identifikaciju ovih izolovanih sojeva korišćena je sekvenca DNK molekula veličine 702 bazna para koja kodira listeriolizin O (LLO), esencijalni virulentni faktor *L. monocytogenes*. Dobijeni rezultati sekvenciranja su predstavljeni u obliku hromatograma i datoteka u FAST formatu. Nakon učitavanja datoteka u BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) softver, odabran je algoritam za prepoznavanje visokosličnih sekvenci kod mikroorganizama. Obradom podataka o sekvenciranim delovima gena, dobijeni su rezultati identifikacije izolata listerija u vidu naziva pripadnosti soja kao i o procentu poklapanja redosleda baza referentnog soja u odnosu na ispitivani soj. Tako je utvrđena homologija od 100 % i 99 % sa sojevima *L. monocytogenes* strain NRRL B-33446 i *L. monocytogenes* NRRL B-33467 koji pripadaju serotipu 1/2a. Literaturni podaci ukazuju da kod ljudi ili životinja obolelih od listerioze, izolovana *L. monocytogenes* pripada u 95% slučajeva serotipovima 1/2a, 1/2b i 4b (CFSSAN, 2000; Harris, 2005). Serotip 4b je najdominantniji na prostorima Kanade, SAD i Evrope i prema podacima Harris-a dokazan je u 35-50% slučajeva sporadičnih humanih listerioza (Harris, 2005).

Samo mikrobiološka izolacija i identifikacija mikroorganizama iz roda *Listeria* na osnovu morfoloških i biohemijskih osobina u nekim slučajevima nije dovoljna. Tome u prilog idu rezultati dobijeni u ovoj disertaciji, u kojima je utvrđeno da izolati koji su na osnovu klasičnih mikrobioloških metoda determinisani kao *L. grayi* ili su sa biohemijski neprihvatljivim profilom pripadaju retkom, hemolitičnom, nepatogenom soju *L. innocua* strain FSL J1-023. Genomska sekvenca ovog soja je od izuzetne važnosti, jer omogućava da se razume uloga horizontalnog genskog transfera i rekombinacija tokom evolucije patogenosti roda *Listeria* (Volokhov *et al.*, 2007). Volokhov i saradnici su 2007. godine ukazali i na druge atipične sojeve *L. innocua* (PRL/NW 15B95, J1-155 i J1-156). Karakteristike ovih atipičnih, hemolitičnih sojeva su da ne fermentišu šećere ramnozu, ksilozu i manitol, kao i nedostatak *L.*

*monocytogenes iap* alela i *L. monocytogenes* r-RNA-16S. Zbog toga se, identifikacijom ovih aberantnih izolata standardnim mikrobiološkim potvrđnim testovima dobijaju kontradiktorni rezultati (Volokhov *et al.*, 2007).

Razlikovanje među blisko srodnim vrstama u okviru roda *Listeria*, kao i među sojevima unutar iste vrste, nije uvek moguće s obzirom na njihovu visoku fenotipsku sličnost. Shodno tome, malo se zna o rasprostranjenosti vrste roda *Listeria*, različitih od *L. monocytogenes* (Cocolin *et al.*, 2002).

Sprovođenje kontrole proizvoda i sirovina koje se koriste u njihovoj proizvodnji klasičnim mikrobiološkim metodama za detekciju *L. monocytogenes* povezano je sa izvesnim problemima vezanim za izvodljivost metode i vreme njenog trajanja. Izolacija i detekcija *L. monocytogenes* klasičnim mikrobiološkim metodama nije uvek moguća s obzirom da njeno prisustvo često može biti "maskirano" prisustvom drugih vrsta roda *Listeria*, posebno *L. innocua* (Curiale and Lewus, 1994; Ryser *et al.*, 1996). Osim toga, bakterije iz roda *Listeria* sp. mogu biti oštećene, prisutne u malom broju i često udružene sa velikim brojem drugih rodova. Zato su u izolaciji i detekciji ovih bakterija klasičnim mikrobiološkim testovima, neophodne četiri sukcesivne faze koje podrazumevaju korake predobogaćenja, obogaćenja, subkultivaciju na selektivnim podlogama i potvrđaciju. U fazi predobogaćenja je, zahvaljujući prisustvu antimikrobnih selektivnih agenasa, inhibiran rast drugih Gram pozitivnih bakterija (akriflavin), Gram negativnih bakterija (nalidiksična kiselina) i plesni (cikloheksimid).

Vreme izolacije i detekcije listerija primenom klasičnih mikrobioloških metoda iznosi 5-7 dana, a za to vreme proizvodnja je, uglavnom gotova i proizvodi dospevaju u prodajne objekte. Na taj način postoji visok rizik ugrožavanja potrošača koji konzumiraju proizvode koji nisu prošli mikrobiološku kontrolu (Braguta, 2008). Uvođenje brzih, visoko osetljivih i specifičnih molekularno bioloških i imunoloških metoda u rutinsku dijagnostiku je od izuzetnog značaja u proizvodnji hrane bezbedne za konzumiranje i treba da obezbedi dobijanje pouzdanih rezultata za što kraće vreme. Međutim, brze metode ne mogu u potpunosti da zamene klasične metode, i u slučaju sumnjivih ili pozitivnih nalaza moraju se primeniti referentne metode izolacije i identifikacije *L. monocytogenes*.

Molekularne metode zasnovane na PCR amplifikaciji daju omogućavaju brzu i specifičnu identifikaciju širokog spektra bakterijskih vrsta i one su postale ključna

tehnika za detekciju mikroorganizama (Jovicic *et al.*, 2005). Osobine koje molekularno biološkim metodama daju prednost u odnosu na klasične mikrobiološke metode su njihova: visoka senzitivnost koja se odnosi na minimalnu količinu materijala neophodnog za umnožavanje određenog fragmenta DNK molekula, visoka specifičnost koja je određena selektivnim vezivanjem prajmera sa komplementarnim DNK sekvencama koje ograničavaju DNK fragment koji se umnožava, kao i jednostavnost, brzina i niska cena. Međutim, na osetljivost molekularno bioloških metoda značajno utiče izbor prajmera, neophodnih za otpočinjanje sinteze DNK. Na osnovu izabranog hemolizina (*hlyA*) gena, specifičnog za *L. monocytogenes*, u ovoj studiji smo detektovali i prirodni, avirulentni hemolitični soj *L. innocua* FSL J1-023. Prve studije koje se odnose na osetljivost PCR detekcije su urađene na čistim kulturama (Border *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1992) i eksperimentalno kontaminiranim uzorcima hrane (Furrer *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1992). Najčešće korišćeni ciljni geni u PCR reakcijama su: *hlyA* (Furrer *et al.*, 1991; Bohnert *et al.*, 1992; Niederhauser *et al.*, 1992; Ericsson and Stålhandske, 1997; Aznar and Alarcón, 2003), *iap* (invasion-associated protein) (Köhler *et al.*, 1990; Niederhauser *et al.*, 1992; Wang and Hong, 1999), *dth-18* (delayed type hypersensitivity) (Wernars *et al.*, 1991), 16S rDNK (Wang *et al.*, 1992) i *inlA* (internalin operon) (Almeida and Almeida, 2000).

Vidas LMX je kvalitativna, specifična, alternativna imunološka metoda koja se koristi za direktan skrining *L. monocytogenes* u uzorcima hrane i okruženja pomoću ELFA tehnike. Svi Vidas LMX pozitivni rezultati moraju biti potvrđeni klasičnim testovima opisanim u referentnim ISO metodama. U ovoj disertaciji, a na osnovu sveukupne uporedne analize, automatizovana imunoenzimaska mini Vidas metoda se pokazala kao visoko osetljiva, specifična i najbrža metoda u detekciji *L. monocytogenes*. Vasut i Robeci (2009) su u svojim eksperimentima ukazali na korelaciju rezultata dobijenih referentnom ISO 11290 i imunoenzimskom mini Vidas metodom. U cilju identifikacije bakterija iz roda *Listeria* i *L. monocytogenes*, isti autori su koristili različite namirnice: sirovo meso, proizvode od mesa, sirovo mleko i mlečne proizvode. Limit detekcije ove metode iznosi 1 CFU/g, a njene prednosti su: automatsko štampanje rezultata po završetku analize, skraćeno vreme obogaćivanja i detekcije u odnosu na referentne ISO metode, fleksibilnost u radu (postavljanje uzoraka u bilo koje vreme), validovani protokoli i lakoća rukovanja (brza obuka zaposlenih).

### 6.1.1. Određivanje osetljivosti PCR metode kod identifikacije *Listeria* sp. i *Listeria monocytogenes*

U ovoj disertaciji, određivanje osetljivosti PCR metode je izvršena na eksperimentalno kontaminiranim uzorcima pasterizovanog mleka. Da bi se utvrdila osetljivost metode kod eksperimentalno kontaminiranih uzoraka mleka sojem *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, praćena je mogućnost detekcije *L. monocytogenes* nakon direktne izolacije (0 h) i 2, 6 i 24 h inkubacije na 37°C. Dobijeni rezultati su pokazali da je broj ćelija *L. monocytogenes* koji se može detektovati PCR metodom pomoću prajmera specifičnih za virulentni *hlyA* gen, nakon direktne izolacije iznosio  $1.375 \times 10^6$  CFU/ml. Veći nivo osetljivosti su dobili Aznar i Alarcón (2003) ispitujući uzorke sirovog goveđeg mesa ( $1 \times 10^4$  CFU/ml).

Ranija istraživanja ukazuju da problem kod direktne detekcije *L. monocytogenes* u hrani, predstavljaju inhibitori PCR reakcije (kolagen, hem, kiseli polisaharidi itd.) i PCR proizvodi poreklom iz mrtvih ćelija *L. monocytogenes*. Da bi se prevazišli ovi nedostaci, nekoliko studija je izvršeno na prethodno obogaćenim uzorcima namirnica (Bansal *et al.*, 1996; Manzano *et al.*, 1997; Agersborg *et al.*, 1997; O'Connor *et al.*, 2000). Kratko obogaćivanje, koje prati fizičku separaciju organizma iz kulture ima svoje prednosti u odvajanju patogena od matriksa hrane, razređenju koncentracije inhibitornih komponenti i povećanju broja ciljnog organizma. Ovaj pristup je gotovo univerzalano prihvaćen, tamo gde je moguća njegova primena, zahvaljujući značajnom povećanju osetljivosti čak i u periodu kratkog obogaćivanja.

Osim toga, postoje podaci koji ukazuju da na povećanje osetljivosti PCR reakcije, može uticati izbor: medijuma za obogaćenje, procedure za pripremu uzoraka, zapremine ispitivanog uzorka, vreme inkubacije kao i izbor prajmera (Aznar and Alarcón, 2003).

Na osnovu dobijenih rezultata u ovoj studiji može se zaključiti da se sa vremenom inkubacije povećava stepen detekcije *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115. Nakon 24 h inkubacije na 37°C, bilo je moguće detektovati 1 CFU/ml mleka. Aznar i Alarcón (2003) su u svom radu pokazali da je inkubacija važan i neophodan korak u ponovljivosti rezultata. Cocolin i saradnici (2002) ističu da se u toku

dvadesetčetvoročasovne inkubacije povećava broj ciljnih ćelija *Listeria* i izbegava umnožavanje mrtvih ćelija.

Osim soja *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, u eksperimentalnoj kontaminaciji uzoraka pasterizovanog mleka korišćen je i nepatogeni soj *L. innocua* ATCC 33090. Nakon direktne izolacije i PCR reakcije pomoću prajmera specifičnih za 16S rDNK roda *Listeria*, dobijeni su PCR proizvodi kako za uzorke mleka kontaminirane serijskim razblaženjima soja *L. innocua* ATCC 33090, tako i u nekontaminiranom uzorku. Dobijeni rezultati su u korelaciji sa podacima iz literature, s obzirom da su Aznar i Alarcón (2003) dobili PCR proizvode očekivane dužine u nekontaminiranom uzorku, pomoću prajmera (L1/L2) komplementarnih 16S rDNK. Najverovatnije zbog univerzalne prirode ciljnog gena, isti autori ukazuju da se pomenuti prajmeri vezuju i za druge bakterije prisutne u uzorcima hrane koja nije prethodno sterilizovana i time dovode u sumnju specifičnost prajmera komplementarnih 16S rDNK.

Rezultati validacije izvršeni na velikom broju namirnica, nisu bili uporedivi, s obzirom da su u eksperimentima korišćeni različiti uzorci hrane, različite procedure i uslovi PCR reakcija (Bohnert *et al.*, 1992; Niederhauser *et al.*, 1992, 1993).

Za pospešivanje efikasnosti PCR metode koriste se različiti aditivi: dimetilsulfoksid (DMSO), formamid, glicerol, goveđi serum albumin (BSA), želatin, Tween 20, Triton X100. PCR aditivi imaju višestruku funkciju: omogućavaju kompletniju denaturaciju molekula DNK, eliminišu sekundarne strukture ciljnih sekvenci i / ili prajmera, snižavaju tačku topljenja prajmera, stabilizuju *Taq* polimerazu, eliminišu dejstvo raznih inhibitora PCR-a. Nabrojane funkcije aditivi ispoljavaju u opsegu određenih koncentracija, a preko maksimalne koncentracije inhibiraju PCR metodu.

## **6.2. Ispitivanje briseva sa površina u restoranu**

U cilju ispitivanja potencijalnih izvora kontaminacije bakterijama iz roda *Listeria*, u radu je analiziran restoran, model sistem za pripremu kuvane hrane. Heisick i saradnici (1995) ističu da je izolacija i detekcija bilo koje vrste iz roda *Listeria* sp.

indikator mogućeg prisustva *L. monocytogenes*, a samim tim i indikator lošeg higijenskog statusa površina (Mc Lauchlin, 1997).

Dok industrijski pogoni predstavljaju relativno zatvorenu sredinu sa stanovišta sprečavanja kontaminacije finalnih proizvoda (zaštitna odeća, strogo definisani standardi ponašanja osoblja, čiste sobe, pravilno korišćenje dezinficijensa) (Cutter *et al.*, 2006), restorani su otvoreni sistemi. U otvorenim objektima, uvođenje *L. monocytogenes* je moguće na različitim mestima i u bilo koje vreme, što otežava samu kontrolu kontaminacije.

Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje i prometa (Sl. glasnik RS broj 72/10) postavlja zahtev da subjekt u poslovanju hranom mora obavezno da uzima uzorke s proizvodnih površina i opreme (brisevi) u objektima u kojima se proizvodi gotova hrana koja pogoduje rastu i razvoju bakterije *L. monocytogenes*, u cilju provere prisustva te bakterije.

U ovom radu, uzorkovanje je izvršeno sa opreme za pripremu hrane i iz kuhinje restorana, u tri ponavljanja.

U toku prvog uzorkovanja, klasičnim mikrobiološkim testovima identifikovano je prisustvo *L. welshimeri* u brisu sa poda komore za hlađenje (U2-02-2) i u brisu iz slivnika lavaboa za odmrzavanje mesa (U3-01-2), *L. monocytogenes* u brisu sa daske za sečenje hleba (U3-03-2) i *L. innocua* u brisu iz slivnika na podu (U3-05-2). Međutim, dobijeni rezultati PCR metodom pomoću prajmera specifičnih za *iap* gen, su pokazali da izolat U2-02-2 pripada vrsti *L. innocua*, a ne *L. welshimeri* kako je utvrđeno mikrobiološkim testovima.

Rezultati ukazuju i da na osnovu izabrane sekvence *iap* gena, klasičnom PCR metodom nije moguće sa sigurnošću razlikovati *L. monocytogenes* od *L. innocua*. Naime, PCR metodom je ustanovljeno da dužina dobijenog produkta izolata U3-05-2 odgovara pre soju *L. monocytogenes* 4 b ATCC 19115 nego soju *L. innocua* ATCC 33090. Nakon sekvenciranja dobijenog PCR proizvoda i pretraživanja homologije dobijene sekvence sa bazom podataka dostupnom na internetu (NCBI) utvrđena je homologija od 92% sa *L. innocua*.

Cocolin i saradnici (2002) su u svom radu istakli da *L. monocytogenes* i *L. innocua* u izabranom regionu *iap* gena sadrže delecije u poređenju sa *L. seeligeri*, *L. ivanovii* i *L. welshimeri*, kao i da su prajmeri List-univ 1/List-univ 2 dizajnirani na

osnovu sekvence ovog gena visoko specifični za rod *Listeria*. Osim toga, pomenuti autori su koristeći prajmere List-univ 1/List-univ 2, ustanovili DGGE (gel elektroforeza sa gradijentom denaturišućeg agensa) metodu na osnovu koje je moguće razlikovati ne samo vrste unutar roda *Listeria*, već i različite serotipove unutar vrste *L. monocytogenes*.

U toku drugog uzorkovanja, klasičnim mikrobiološkim testovima identifikovano je prisustvo pet izolata vrste *L. monocytogenes* u uzorcima briseva poreklom sa donje ivice komore za hlađenje (U2-01-2), iz slivnika u prostorijama za skladištenje sirovina (U2-08-1) i pripremu hrane (U3-05-2), sa poda komore za hlađenje (U3-08-2) i sa zadnjeg štita mašine za narezivanje (U3-11-2), kao i jedan uzorak brisa iz slivnika (U3-05-1) pozitivan na prisustvo *L. innocua*. Međutim, rezultati dobijeni PCR metodom pomoću prajmera specifičnih za virulentni *hlyA* i *iap* gen, su pokazali da samo uzorak brisa U2-08-1 pripada rodu *Listeria*, odnosno *L. innocua*.

Kao što se navodi u literaturi (Joković, 2004), neefikasnost fenotipskih i biohemijskih API testova je posledica činjenice da bakterijske populacije često imaju slične nutritivne zahteve i rastu u sličnim ekološkim uslovima. Stoga ovi testovi daju pogrešne i kontradiktorne rezultate.

U toku trećeg uzorkovanja, klasičnim mikrobiološkim testovima identifikovano je ukupno pet izolata roda *Listeria*, od kojih su tri izolata poreklom iz briseva sa podova (U2-05-1) i iz slivnika (U2-08-1 i U3-05-2) najverovatnije pripadaju vrsti *L. welshimeri* (sa verovatnoćom od 65.7%), a u manjem procentu (sa verovatnoćom od 34.1%) pripadaju vrsti *L. innocua*, jedan izolat poreklom iz ugla zida (U2-06-2) pripada vrsti *L. innocua* (99.6%) i jedan izolat poreklom iz slivnika lavaboja za odmrzavanje mesa (U3-01-2) pripada vrsti *L. monocytogenes*. Slično rezultatima prvog uzorkovanja, rezultati dobijeni PCR metodom pomoću prajmera specifičnih za *iap* gen, su pokazali da tri izolata identifikovana biohemijskim API sistemom kao *L. welshimeri* pripadaju vrsti *L. innocua*.

Uopšteno, rezultati ovih eksperimenata su ukazali da potencijane izvore kontaminacije bakterijama iz roda *Listeria* u restoranu, predstavljaju prijemne prostorije kao i prostorije za skladištenje sirovina i pripremu hrane. Mesta najčešće kontaminacije su predstavljali podovi i slivnici u samom okruženju restorana. Slične rezultate su dobili Hoessler i saradnici (2011), koji su u svom radu ukazali na visoku prevalencu *L.*



*monocytogenes* na površinama koje ne dolaze u kontakt sa hranom, kao i na nepoznati transfer ove bakterije na hranu i površine koje su u kontaktu s njom.

Literaturni podaci ukazuju da u restoranima, maloprodajnim objektima i industrijskim pogonima mesta kontaminacije *L. monocytogenes* najčešće predstavljaju: slivnici, podovi, zidovi, ventilacioni otvori i moguća mesta ulaska glodara i insekata (Cutter *et al.*, 2006), kao i da se posebna pažnja mora obratiti prilikom čišćenja slivnika i drugih visoko vlažnih površina kako bi se smanjila mogućnost širenja kontaminacije ka drugim delovima okruženja.

Za razliku od rezultata dobijenih u našim istraživanjima, u maloprodajnim i industrijskim objektima mogu postojati i perzistentni i sporadični sojevi *L. monocytogenes*, koji se bitno razlikuju u vezivanju i formiranju biofilma kao i otpornosti na dezinficijense (Lundén, 2004). Nedovoljno ili neadekvatno čišćenje i ne pridržavanje zdravstvenih propisa doprinose visokoj stopi rasta bakterija *L. monocytogenes* u objektima. Ovaj pristup je posebno važan, jer *L. monocytogenes* ima sposobnost vezivanja i formiranja biofilma na kontaktnim površinama. Literaturni podaci ukazuju da sojevi koji formiraju jake biofilme imaju bolju sposobnost adaptacije na uslove stresa (Keskinen *et al.*, 2008).

### **6.3. Rezultati detekcije vrsta iz roda *Listeria* u toku proizvodnje tradicionalne fermentisane suve kobasice**

Tradicionalni proizvodi od mesa u tipu fermentisanih suvih kobasica, sa određenog geografskog područja Srbije, proizvode se uglavnom u seoskim domaćinstvima, prema iskustvu i tradicionalnoj tehnologiji. Na svojstva i kvalitet ovih proizvoda značajno utiču, pored ostalog, i opšte karakteristike podneblja, a posebno specifični klimatski uslovi, karakteristični za određeno geografsko područje (Radovanović *et al.*, 2005). Proizvodnja fermentisanih kobasica je jedna od oblasti prerade mesa koja je poslednjih decenija, predmet intenzivnih naučnih istraživanja. Sa povećanjem konkurencije i liberalizacijom svetskog tržišta, industrija mesa se, slično drugim prehrambenim granama, usmerava na veću produktivnost i profit (Žlender i Gašperin, 2004). Danas se poklanja veća pažnja tradicionalnom načinu proizvodnje fermentisanih proizvoda od mesa, zbog sve naglašenije njihove potražnje na tržištu,

usled poželjnih i prepoznatljivih senzornih svojstava. Aktuelnost kao i značaj istraživanja vezanih za tradicionalne proizvode prepoznat je i u našoj zemlji, te su izvršena brojna istraživanja o optimalnom sirovinskom sastavu, upotrebljenim začinima i aditivima i mogućnosti korišćenja starter kultura (Rašeta *et al.*, 2010), kao i istraživanja radi zaštite i standardizacije kvaliteta nekoliko fermentisanih suvih kobasica (Petrović *et al.*, 2011). U nastavku ovog rada, predloženi su potencijalni izvori kontaminacije bakterijama iz roda *Listeria* u toku proizvodnje tradicionalne fermentisane suve kobasice, jer njihovo razumevanje predstavlja važan korak u razvoju i primeni odgovarajućih postupaka u cilju dobijanja bezbednog proizvoda.

Rezultati ove oblasti ispitivanja su potvrdili da životinje, zaposleno osoblje i sastojci nadeva predstavljaju potencijalne izvore kontaminacije bakterijama iz roda *Listeria*. Prisustvo *L. monocytogenes*, u toku proizvodnje tradicionalne fermentisane suve kobasice je identifikovano u brisu sa buta i brisu kecelje. Prisustvo ovog nepoželjnog mikroorganizma na trupovima životinja za klanje, obično se pripisuje fekalnoj kontaminaciji neposredno pre kao i za vreme klanja, dok zaposleno osoblje može putem prljavih ruku i prljave odeće biti izvor kontaminacije *L. monocytogenes*.

U cilju utvrđivanja zdravstvene ispravnosti tradicionalne fermentisane suve kobasice, praćena je kontaminacija bakterijama iz roda *Listeria* tokom različitog perioda njihovog zrenja. Kao što se iz podataka prikazanih u Tabeli 5.3.1.2. vidi, prisustvo bakterija iz roda *Listeria* detektovano je u uzorcima kobasica tokom zrenja u domaćinstvu (nekontrolisani uslovi) drugog (D11, D21), šestog (D12, D22), devetog (D13, D23) i petnaestog dana (D14), odnosno tokom zrenja u industrijskim (kontrolisani uslovi) uslovima drugog (E11, E21), šestog (E12, E22) i devetog dana (E23). Dobijeni rezultati ukazuju da se tokom meseca februara, kada je detektovano prisustvo bakterija iz roda *Listeria* u uzorcima kobasica sušenim u domaćinstvu, opseg dnevne temperature kretao između -1.00 i 12.00 °C (Prilog B). Tokom zrenja kobasica sušenih u kontrolisanim uslovima, u IM „Topola“, u ovom periodu opseg dnevne temperature je bio viši i iznosio je između 3.50 i 17.60 °C (Prilog B). Ovakve vrednosti temperature omogućile su razmnožavanje *L. monocytogenes*.

Preživljavanje i razmnožavanje *L. monocytogenes* u hrani spremnoj za konzumiranje je u funkciji karakteristika hrane i uslova pod kojima se ona proizvodi, pakuje i skladišti. Karakteristike hrane su u literaturi opisane kao intrinzične i ekstrinzične

svojstva hrane spremne za konzumiranje. Najvažnije karakteristike proizvoda koje utiču na preživljavanje i razmnožavanje *L. monocytogenes* u hrani spremnoj za konzumiranje su pH, aktivnost vode ( $a_w$ ) i temperatura, kao i dužina skladištenja proizvoda (Katić, 2010).

U toku proizvodnje tradicionalne fermentisane suve kobasice, bakterije iz roda *Listeria* nisu detektovane kod kobasice napravljene u domaćinstvu i sušene u industriji, i to devetog dana skladištenja (E13), što se može objasniti činjenicom da je  $a_w < 0.94$  i  $pH < 5$  (Tabela 5.3.2.1. i Tabela 5.3.2.2.). Tokom petnaestog dana skladištenja, *Listeria* je detektovana samo kod kobasice napravljene u domaćinstvu i sušene na tradicionalan način (D14). Istog dana uočen je gubitak ove populacije bakterija kod kobasica napravljenih u domaćinstvu uz dodatak starter kulture i sušenih u industriji (E24) i na tradicionalan način (D24), iako je hrana imala svojstva  $a_w$  i pH koja pogoduju njenom rastu i razmnožavanju (Tabela 5.3.2.1. i Tabela 5.3.2.2.). Ovo se može objasniti činjenicom da konzervansi i zaštitna mikroflora, posebno starter kulture imaju značajan uticaj na preživljavanje i razmnožavanje *Listeria* u proizvodima (Katić, 2010). Jedan od mikroorganizama komercijalne starter kulture (Quick-starter, Lay), korišćene u ovoj disertaciji, je i *Lactobacillus sake*. Podaci iz literature pokazuju da različiti sojevi *Lb. sakei*, izolovani iz mesa ili proizvoda od mesa (fermentisane kobasice), imaju sposobnost produkcije sekundarnih metaboličkih materija – bakteriocina sa izraženim, najčešće, antilisterijskim spektrom delovanja (Hugas *et al.*, 1995; Kaiser and Montville, 1996). Naime, velika taksonomska bliskost pozicija roda *Listeria* rodu *Lactobacillus*, uslovljava visoku osetljivost *Listeria* vrsta prema bakteriocinima produkovanim od strane bakterija *Lactobacillus* sp. (Ludvig *et al.*, 1984; Wilkinson and Jones, 1997). S obzirom na osobine ovog, hranom prenosivog patogena, uticaj bakteriocina se smatra značajnim sa aspekta zdravstvene bezbednosti (Obradović and Vesković-Moračanin, 2007).

Dodat natrijumhlorid, u toku procesa proizvodnje, svoj antimikrobni efekat zasniva na izazivanju osmotskog stresa kod patogenih mikroorganizama i mikroorganizama kvara, što za posledicu ima snižavanje  $a_w$ -vrednosti. Iako je *L. monocytogenes* halotolerantan mikroorganizam, dodata so, u kombinaciji sa drugim faktorima, može uticati na inhibiciju rasta i destrukciju ovog patogena (Kamat and Nair, 1996; Buchanan *et al.*, 1989; Fernandez *et al.*, 1997).

Dim predstavlja jedan od antilisterijskih faktora koji u toku procesa proizvodnje tradicionalne kobasice utiče, istovremeno, na higijensku ispravnost i dužinu održivosti. Brojne antimikrobne komponente dima (organske kiseline, aldehidi, fenoli, formaldehid i dr.) ispoljavaju izraženo antibakterijsko dejstvo (Radetić, 1982) dovodeći do stvaranja zdravstveno bezbednog proizvoda i sigurnosti potrošača. Upotrebom nekarakterističnih vrsta drveta u praksi dimljenja proizvoda od mesa, kao što su višnja, trešnja i kasija postiže se specifična boja i aroma suve fermentisane kobasice. Pored vrste upotrebljenog drveta, izuzetno je značajno trajanje i temperatura tokom procesa dimljenja. Proces hladnog dimljenja treba da traje od 10 do 15 dana, sa pauzama, odnosno svaki drugi dan, a temperatura ne bi trebala da pređe 10°C (Ikonić *et al.*, 2010). U protivnom, može se izazvati suviše brza fermentacija i nagli pad pH do vrednosti  $\approx 5$ , što može nepovoljno uticati na ukus (kiseo), te formiranje poželjne crvene boje komadića mesa i njihovo povezivanje (Petrović *et al.*, 2010).

Brojna istraživanja su pokazala da postupci čišćenja i sanitacije mogu da uklone prisutnu *L. monocytogenes* sa linije proizvodnje, kao i sa opreme, ali se rekontaminacija može pojaviti ubrzo posle obnavljanja, tj. otpočinjanja nove proizvodnje. Kako se *L. monocytogenes* brzo adaptira na uslove tokom proizvodnog procesa, distribucije i maloprodaje, postprocesna kontaminacija se ne može isključiti i otuda nije realno očekivati proizvode slobodne od listerija i pored primene svih propisanih mera sanitacije. Međutim, proizvodni procesi i pogoni moraju biti pod stalnom kontrolom, kako bi se mogućnost rekontaminacije proizvoda smanjila na minimum tokom proizvodnje (Dimitrijević *et al.*, 2008).

#### **6.4. Kontaminacija suvomesnatih proizvoda *Listeria monocytogenes* u toku obrade na uređaju za narezivanje**

U toku obrade proizvoda od mesa (šunke, salame, mortadele i sl.), uređaj za narezivanje se najčešće koristi kao poslednji korak u pripremi pre pakovanja i umotavanja hrane spremne za konzumiranje (RTE hrana). Ovi proizvodi su dostupni u supermarketima u rashladnim vitrinama, bilo da se prave u samom objektu (po porudžbini), bilo kao proizvodi poznatih i na tržištu priznatih proizvođača (masovna proizvodnja). Osim toga, hrana spremna za konzumiranje se može naći u radnjama

specijalizovanim za prodaju delikatesa i restoranima brze hrane, kada se suvomesnati proizvodi mogu konzumirati odmah po narezivanju, ili se koriste u pripremi sendviča. Nedovoljno ili neadekvatno čišćenje uređaja za narezivanje povećava rizik od unakrsne kontaminacije bakterijom *L. monocytogenes* (Sheen, 2008).

U ovoj disertaciji, analiziran je uređaj za narezivanje, model sistem za pripremu suvomesnatih proizvoda, koji predstavlja vektor prilikom bakterijskog transfera sa kontaminiranih na mikrobiološki bezbedne proizvode od mesa (Vorst *et al.*, 2006b). U procesu obrade suvomesnatih proizvoda, korišćena su dva proizvoda šunke, izabrana na osnovu razlika u njihovom sastavu: šunka sa visokim sadržajem vode (73% vlažnost/3.8% masti) i šunka sa niskim sadržajem vode (52% vlažnost/1.7% masti).

Vidljive razlike u zaprljanosti uređaja nakon uzastopnih koraka narezivanja su posledica različitog sastava ispitivanih proizvoda. Nakon uzastopnog narezivanja šunke sa visokim sadržajem vode, mogu se uočiti vidljivi komadići mesa zaostali na sečivu uređaja (Vorst *et al.*, 2006b). Rezultati klasičnih mikrobioloških metoda ukazuju da je transfer *L. monocytogenes* brži i veći prilikom komercijalnog narezivanja šunke sa višim sadržajem vode u odnosu na šunku sa nižim sadržajem vode ukoliko su čuvane na sobnoj temperaturi. Ranija istraživanja su pokazala da mehanička obrada suvomesnatih proizvoda sa višim procentom masti i nižim sadržajem vode (36% masti, 43% vode), kao što su salame, rezultuje u formiranju izraženog sloja masti na oštrici uređaja za narezivanje. Ovaj sloj masti predstavlja pogodan medijum za disperziju bakterija roda *Listeria* i njihovu zaštitu od sila trenja u toku narezivanja (Vorst *et al.*, 2006b). Lin i saradnici (2006) su pokazali da sloj masti koji se formira na oštrici uređaja za narezivanje i pokretnim trakama u industrijskim pogonima dovodi do dugotrajne unakrsne kontaminacije mikrobiološki bezbednih proizvoda. Isti autori su pokazali da se sloj masti ne formira u toku narezivanja ćurećeg mesa sa niskim procentom masti (<1%) i visokim sadržajem vode (78%).

Rezultati dobijeni u ovom radu su pokazali i da je kvantitativni transfer *L. monocytogenes* prilikom mehaničke obrade šunke sa visokim sadržajem vode, značajno veći ukoliko je čuvana na sobnoj temperaturi nego na temperaturi hlađenja, što je najverovatnije posledica veće rastvorljivosti masti i efekta spiranja na višim temperaturama (Vorst *et al.*, 2006b; Yan *et al.*, 2007). Osim toga, eksperimenti su pokazali i da bakterijski transfer logaritamski opada sukcesivnim narezivanjem šunke sa

visokim sadržajem vode. Stoga najveći rizik izloženosti potrošača predstavlja konzumiranje prvih odrezaka dobijenih isecanjem na kontaminiranom uređaju za narezivanje. U kasnijim koracima, bakterijski transfer je sporadičan i korak predobogaćenja je neophodan u cilju izolacije i detekcije *L. monocytogenes*.

Cilj ovog rada je bio i procena rizika za kontaminaciju bakterija *L. monocytogenes* u odnosu na različite kontaktne površine uređaja za narezivanje. Ispitivane kontaktne površine uređaja su: oblast nagomilavanja uzorka, zadnja ploča, ploča, zadnja strana sečiva, prednja strana sečiva, zadnji štit, prednji štit, ploča iza sečiva i držač štita. Rezultati su pokazali da bakterijski transfer sa sečiva na različite komponente uređaja za narezivanje zavisi od temperature čuvanja suvomesnatih proizvoda, sa značajno većim transferom na višim temperaturama. Kontaminirane kontaktne površine sa značajno različitim stepenom bakterijskog transfera ( $P < 0.05$ ) na različitim temperaturama čuvanja proizvoda, predstavljaju oblast nagomilavanja uzorka, ploča i zadnji štit.

Činjenica da se 80% inokulisanog koktela *L. monocytogenes* prenosi sa sečiva na druge kontaktne površine, ukazuje na važnost čišćenja i dezinfekcije uređaja za narezivanje na svaka 4 sata (preporuka od strane: Food and Drug Administration Food Code, 2001).

Ranija istraživanja su pokazala da su polivinil hlorid i polietilen, materijali od kojih se prave pokretne trake u industrijskim pogonima, pogodniji za transfer populacije bakterija roda *Listeria* od nerđajućeg čelika (Arnold and Silvers, 2000; Midelet and Carpentier, 2002). Međutim, kontakne površine uređaja za narezivanje, izrađene od nerđajućeg čelika, su podložne grebanju i koroziji pod dejstvom hlornih i kiselinskih dezinficijenasa što dovodi do zadržavanja bakterija i formiranja biofilma (Chmielewski and Frank, 2003). U formiranom biofilmu, *L. monocytogenes* pokazuje značajnu otpornost na dezinficijense u odnosu na pojedinačno vezane ćelije (Møretrø and Langsrud, 2004) što doprinosi daljoj unakrsnoj kontaminaciji finalnih proizvoda.

Osim uređaja za narezivanje, potencijalni izvor *L. monocytogenes* može biti i zaprljana ili neadekvatno očišćena oprema za čuvanje, transport i pripremu hrane (transportna kolica, hladnjaci, vitrine, noževi, daske za sečenje, rukavice i sl.) (Cutter *et al.*, 2006).

\*  
\*      \*

*Listeria monocytogenes* može da izazove oboljenja ljudi, a kao najčešći izvor zaražavanja ljudi opisana je hrana različitog porekla. Ubikvitarnost *L. monocytogenes* i povećana sposobnost da se razmnožava ili preživljava pri temperaturama hlađenja u poređenju sa najvećim brojem drugih mikroorganizama, čini da ovaj mikroorganizam predstavlja značaj problem u proizvodnji hrane. To je posebno slučaj sa hranom spremnom za konzumiranje koja nije obrađena toplotom za vreme proizvodnje a u kojoj *L. monocytogenes* može da se razmnožava, kao i sa hranom koja može da bude kontaminirana za vreme proizvodnje iz sredine, uključujući sredinu gde se proizvodnja obavlja (Katić, 2010). Različite zemlje su prihvatile različite mere predostrožnosti za prisustvo *L. monocytogenes* u hrani. Tako, zbog učestalosti pojavljivanja epidemija i specifičnih karakteristika ovog patogena SAD i Novi Zeland su odredile takozvanu «nultu toleranciju» za prisustvo *L. monocytogenes* u hrani spremnoj za konzumiranje. Drugim rečima, hrana se smatra zaraženom ako se u uzorku od 25 g detektuje prisustvo *L. monocytogenes*.

I naša zemlja je prihvatila određene mere predostrožnosti u odnosu na *L. monocytogenes*. Novi mikrobiološki kriterijumi obuhvataju svu hranu spremnu za konzumiranje tokom njenog roka upotrebe. Razlika je napravljena između sledećih kategorija hrane spremne za konzumiranje: hrana spremna za konzumiranje koja podržava razmnožavanje *L. monocytogenes* i hrana spremna za konzumiranje koja ne podržava razmnožavanje *L. monocytogenes*. Za hranu spremnu za konzumiranje koja podržava razmnožavanje *L. monocytogenes* predviđene su dve granične vrednosti. Jedna granična vrednost se odnosi na proizvod spreman za konzumiranje stavljen u promet tokom njegovog roka upotrebe kada je granična vrednost za broj *L. monocytogenes* 100 cfu/g, a druga granična vrednost se odnosi na hranu pre nego što ona prestane da bude pod neposrednom kontrolom subjekta u poslovanju hranom kada je granična vrednost odsustvo *L. monocytogenes* u 25 g. Prisustvo *L. monocytogenes* se ispituje i u proizvodima spremnim za konzumiranje koji ne podržavaju rast *L. monocytogenes*, i to dok je proizvod u prometu tokom roka upotrebe i za sve proizvode sa rokom upotrebe

kraćim od pet dana kada je granična vrednost za broj *L. monocytogenes* 100 cfu/g (Katić, 2010).

Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje i prometa (Sl. glasnik RS broj 72/10) postavlja zahtev da “subjekti u poslovanju hranom, a koji su odgovorni za izradu proizvoda, ako je potrebno, sprovode studijska ispitivanja kako bi istražili usklađenost sa kriterijumima održivosti proizvoda”. Ta ispitivanja treba da uzmu u obzir ”razumno predvidive uslove skladištenja” (naročito temperaturu i rok upotrebe), kao i varijacije u temperaturama hlađenja zapažene u rashladnim uređajima u prometu kao i u domaćinstvu.

Studija roka upotrebe uvek treba da uključi:

- specifikaciju fizičko-hemijskih karakteristika proizvoda (kao što su: pH,  $a_w$ , sadržaj soli, koncentracija konzervansa i tip pakovanja) uzimajući u obzir procesne korake i uslove skladištenja i mogućnost kontaminacije, kao i predviđeni rok upotrebe i
- podatke iz raspoložive naučne literature, kao i podatke iz istraživanja koji se odnose na održivost i karakteristike rasta *L. monocytogenes*.

Kada se u napred navedenoj studiji ne obezbedi dovoljno podataka, neophodnih da se dobije potrebna sigurnost u bezbednost proizvoda, subjekt u poslovanju hranom radi dodatnu studiju. Takva studija mora da uključi:

- matematički model predviđanja rasta mikroorganizma uspostavljen za hranu koja je u pitanju, koristeći kritične karakteristike rasta i održivosti mikroorganizama značajnog za proizvod i/ili
- studiju u kojoj će se oceniti razmnožavanje ili održivost mikroorganizma značajnog za bezbednost hrane, koji može da bude prisutan u proizvodu za vreme roka upotrebe, u očekivanim uslovima distribucije, skladištenja i upotrebe (opisanim kao studija održivosti ili adekvatni istorijski podaci) i/ili
- test u kojem će se ispitati sposobnost mikroorganizma značajnog za bezbednost hrane, na odgovarajući način inokulisanog u proizvod, da se razmnožava ili preživljava u proizvodu pod različitim uslovima skladištenja (opisan kao *challenge test*) (Katić, 2010).

U nekim *challenge* testovima se koriste surogat mikroorganizami koji pokazuju karakteristike rasta i rezistencije slične ili nešto veće od *L. monocytogenes*. Literaturni



podaci ukazuju na činjenicu da se *L. innocua* može koristiti kao surogat mikroorganizam (Scott *et al.*, 2005; Noriega *et al.*, 2008), kao i na to da dve blisko povezane vrste, *L. innocua* i *L. monocytogenes* nastanjuju iste ekološke niše (MacGowan *et al.*, 1994; de Luca *et al.*, 1998; Aguado *et al.*, 2004) i imaju slične fiziološke karakteristike (Perni *et al.*, 2006; Antwie *et al.*, 2007; Bermúdez -Aguirre and Barbarosa Cánovas, 2008).

## 7. Zaključci

U ovoj doktorskoj disertaciji, kandidat je doneo sledeće zaključke:

1. Prajmeri specifični za 16S rDNK nisu bili specifični za detekciju bakterija iz roda *Listeria*. Utvrđeno je da prajmer *hlyA* nije specifičan za detekciju *Listeria monocytogenes*, pošto je pomoću ovog prajmera detektovan i atipičan hemolitičan soj *L. innocua* J1-023. Stoga je potrebno da se za detekciju *Listeria monocytogenes* u hrani primene prajmeri sa sekvencom nukleotida jedinstvenom samo za *Listeria monocytogenes*.
2. Osetljivost PCR metode se povećava predobogaćenjem *Listeria monocytogenes* u triptoza soja bujonu tokom 24 h na 37°C tako da se može detektovati 1 CFU/ml.
3. Potencijalni izvor kontaminacije bakterijama iz roda *Listeria* u kuhinji restorana predstavljaju objekti i oprema za pripremu hrane, a najčešće su vrste iz roda *Listeria* izolovane sa poda i slivnika restorana.
4. Pri proizvodnji tradicionalnih fermentisanih suvih kobasica bakterije iz roda *Listeria* su duže preživljavale u uzorcima kobasica tokom zrenja u nekontrolisanim uslovima u domaćinstvu nego u uzorcima kobasica tokom zrenja u kontrolisanim industrijskim uslovima.
5. Na preživljavanje *Listeria monocytogenes*, tokom proizvodnje fermentisanih kobasica u tradicionalnim uslovima, najveći uticaj su imali upotrebljena starter kultura i koncentracija natrijum hlorida, kada je proces fermentacije pravilno vođen i pri tome postizane pH vrednosti i aktivnost vode karakteristične za određenu fazu proizvodnje.
6. Površine uređaja za narezivanje mogu da budu izvor rekontaminacije šunke *Listeria monocytogenes*. Na prenos *Listeria monocytogenes* sa eksperimentalno kontaminirane šunke na uređaj za narezivanje proizvoda od mesa su uticali temperatura šunke u trenutku narezivanja i sadržaj vode i masti. Veći transfer *Listeria monocytogenes* sa šunke na uređaj za narezivanje je bio pri višim temperaturama i većoj vlažnosti.

## 8. Literatura

- Aarnisalo, K., Salo, S., Miettinen, H., Suihko, M. L., Wirtanen, G., Autio, T., Lundén, J., Korkeala, H. and Sjöberg, A. M. 2000. Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *J. Food Safety*. 20: 237-250.
- Aarnisalo, K., Autio, T., Sjöberg, A. M., Lundén, J., Korkeala, H. and Suihko, M. L. 2003. Typing of *Listeria monocytogenes* isolates originating from the food processing industry with automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Food Prot.* 66: 249-255.
- Agersborg, A., Dahl, R. and Martinez, I. 1997. Sample preparation and DNA extraction procedures for polymerase chain reaction identification of *Listeria monocytogenes* in seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 35: 275-280.
- Aguado, V., Vitas, A. I. and García Jalon, I. 2001. Random amplified polymorphic DNA typing applied to the study of cross-contamination by *Listeria monocytogenes* in processed food products. *J. Food Prot.* 64: 716-720.
- Aguado, V., Vitas, A. I. and García Jalon, I. 2004. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *Int. J. Food Microbiol.* 90: 341-347.
- Al-Ghazali, M. R. and al-Azawi, S. K. 1988. Storage effects of sewage sludge cake on the survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 203-208.
- Almeida, P. F. and Almeida, R. C. C. 2000. A PCR protocol using *inl* gene as a target for specific detection of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 11: 97-101.
- Alvarez Domínguez, C., Vázquez Boland, J. A., Carrasco Marín, E., López Mato, P. and Leyva Cobián, F. 1997a. Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect. Immun.* 65: 78-88.
- Alvarez Domínguez, C., Roberts, R. and Stahl, P. D. 1997b. Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome. *J. Cell Sci.* 110: 731-743.
- Antoniollo, P. C., Bandeira Fda, S., Jantzen, M. M., Duval, E. H. and da Silva, W. P. 2003. Prevalence of *Listeria* spp. in feces and carcasses at a lamb packing plant in Brazil. *J. Food Prot.* 66: 328-330.
- Antwie, M., Bernaerts, K., van Impe, J. F. and Geeraerd, A. H. 2007. Modelling the combined effects of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono- and co-culture. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 71-84.

- Arnold, J. W. and Silvers, S. 2000. Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. *Poult. Sci.* 79: 1215-1221.
- Auerbuch, V., Loureiro, J. J., Gertler, F. B., Theriot, J. A. and Portnoy, D. A. 2003. Ena/VASP proteins contribute to *Listeria monocytogenes* pathogenesis by controlling temporal and spatial persistence of bacterial actin-based motility. *Mol. Microbiol.* 49: 1361-1375.
- Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjöberg, A. M., Aarnisalo, K., Björkroth, J., Mattila Sandholm, T. and Korkeala, H. 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 150-155.
- Avery, S. M., Hudson, J. A. and Buncic, S. 1996. Multilocus enzyme electrophoresis typing of New Zealand *Listeria monocytogenes* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 351-359.
- Aznar, R. and Alarcón, B. 2003. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. *J. Appl. Microbiol.* 95: 958-966.
- Bansal, N. S., McDonnell, F. H. Y., Smith, A., Arnold, G. and Ibrahim, G. F. 1996. Multiplex PCR assay for the routine detection of *Listeria* in food. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 293-300.
- Beauregard, K. E., Lee, K. D., Collier, R. J. and Swanson, J. A. 1997. pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 186: 1159-1163.
- Begley, M., Gahan, C. G. and Hill, C. 2002. Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: adaptation, cross-protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6005-6012.
- Beresford, M. R., Andrew, P. W. and Shama, G. 2001. *Listeria monocytogenes* adheres to many material found in food processing environments. *J. Appl. Microbiol.* 90: 1000-1005.
- Bermúdez-Aguirre, D. and Barbarosa-Cánovas, G. V. 2008. Study of butter fat content in milk on the inactivation of *Listeria innocua* ATCC 51742 by thermo-sonication. *Innov. Food Sci. Emerg Technol.* 9: 176-185.
- Berrang, M. E., Meinersmann, R. J., Northcutt, J. K. and Smith, D. P. 2002. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a poultry further processing facility and from fully cooked product. *J. Food Prot.* 65: 1574-1579.
- Beumer, R. R., Giffel, M. C. T., Kok, M. T. C. and Rombouts, F. M. 1996. Confirmation and identification of *Listeria* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* 22: 448-452.

- Bhagwat, A. A. 2003. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *Inter. J. Food Microbiol.* 84: 217-224.
- Bierne, H., Dramsi, S., Gratacap, M. P., Randriamampita, C., Carpenter, G., Payrastré, B. and Cossart, P. 2000. The invasion protein InlB from *Listeria monocytogenes* activates PLC-gamma downstream from PI 3-kinase. *Cell Microbiol.* 2 :456-476.
- Bierne, H., Gouin, E., Roux, P., Caroni, P., Yin, H. L. and Cossart, P. 2001. A role of cofilin and LIM kinase in *Listeria*-induced phagocytosis. *J. Cell Biol.* 155: 101-112.
- Bierne, H. and Cossart, P. 2002. InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasion and growth factor. *J. Cell Sci.* 115: 3357-3367.
- Bierne, H., Mazmanian, S. K., Trost, M., Pucciarelli, M. G., Liu, G., Dehoux, P., Jansch, L., Garcia del Portillo, F., Schneewind, O. and Cossart, P. 2002. Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Mol. Microbiol.* 43: 869-881.
- Bierne, H., Garandeau, C., Pucciarelli, M. G., Sabet, C., Newton, S., Garcia del Portillo, F., Cossart, P. and Charbit, A. 2004. Sortase B, a new class of sortase in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 186: 1972-1982.
- Boerlin, P., Bannerman, F., Ischer, J., Rocourt, J. and Bille, J. 1995. Typing *Listeria monocytogenes*: a comparison of random amplification of polymorphic DNA with 5 other methods. *Res. Microbiol.* 146: 35-49.
- Bohnert, M., Dilasser, F., Dalet, C., Mengaud, J. and Cossart, P. 1992. Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR. *Res. Microbiol.* 143: 271-280.
- Border, P. M., Howard, J. J., Plastow, G. S. and Siggins, K. W. 1990. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 11: 158-162.
- Borezee, E., Pellegrini, E., Beretti, J. L. and Berche, P. 2001. SvpA, a novel surface virulence-associated protein required for intracellular survival of *Listeria monocytogenes*. *Microbiol.* 147: 2913-2923.
- Bosgiraud, C., Menudier, A., Cornuejols, M. J., Hangard-Vidaud, N. and Nikolas, J. A. 1989. Etude de la virulence de *Listeria monocytogenes* isolées d'aliments de l'homme. *Microbiol. Alim. Nutr.* 7: 413-420.
- Boujemaa-Paterski, R., Gouin, E., Hansen, G., Samarin, S., Le Clainche, C., Didry, D., Dehoux, P., Cossart, P., Kocks, C., Carlier, M. F. and Pantaloni, D. 2001. *Listeria* protein ActA mimics WASp family proteins: It activates filament barbed end branching by Arp2/3 complex. *Biochemistry* 40: 11390-11404.

- Braguta, A. 2008. Razvoj ekspres metoda za izolaciju *L. monocytogenes* iz prehrambenih proizvoda primenom PCR metode u stvarnom vremenu. Tehnologija mesa 49: 25-29.
- Braun, L., Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G. and Cossart, P. 1997. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. Mol. Microbiol. 25: 285-294.
- Braun, L., Ghebrehiwet, B. and Cossart, P. 2000. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. EMBO J. 19: 1458-1466.
- Brehm, K., Ripio, M. T., Kreft, J. and Vázquez Boland, J. A. 1999. The *bvr* locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by beta-glucosides. J. Bacteriol. 181: 5024-5032.
- Brosch, R., Brett, M., Catimel, B., Luchansky, J. B., Ojeniyi, B. and Rocourt, J. 1996. Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Int. J. Food Microbiol. 32: 343.
- Bubert, A., Kuhn, M., Goebel, W. and Kohler, S. 1992. Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. J. Bacteriol. 174: 8166-8171.
- Bubert, A., Kestler, H., Götz, M., Böckmann, R. and Goebel, W. 1997. The *Listeria monocytogenes iap* gene as an indicator gene for the study of PrfA-dependent regulation. Mol. Gen. Genet. 256: 54-62.
- Bubert, A., Sokolovic, Z., Chun, S. K., Papatheodorou, L., Simm, A. and Goebel, W. 1999. Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. Mol. Gen. Genet. 261: 323-336.
- Buchanan, R. L., Stahl, H. G. and Whiting, R. C. 1989. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 52: 844-851.
- Buchrieser, C., Rusiok, C., Kunst, F., Cossart, P. and Glaser, P. 2003. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: Clues for evolution and pathogenicity. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 35: 207-213.
- Buncic, S. 1991. The incidence of *L. monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia. Int. J. Food Microbiol. 12: 173-180.
- Buncic, S., Avery, S. M., Rocourt, J. and Dimitrijevic, M. 2001. Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? Int. J. Food Microbiol. 65: 201-212.

- Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L. and Cossart, P. 2002. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. Trends Microbiol. 10: 238-245.
- Cabanes, D., Dussurget, O., Dehoux, P. and Cossart, P. 2004. Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. Mol. Microbiol. 51: 1601-1614.
- Camilli, A., Tilney, L. G. and Portnoy, D. A. 1993. Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. Mol. Microbiol. 8: 143-157.
- Caro, M. R., Zamora, E., Leon, L., Cuello, F., Salinas, J., Megias, D., Cubero, M. J. and Contreras, A. 1990. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in vegetable by product silages containing preservative additives and destined for animal feeding. Anim. Feed Sci. Technol. 31: 285-291.
- Caugant, D. A., Ashton, F. E., Bibb, W. F., Boerlin, P., Donachie, W., Low, C., Gilmour, A., Harvey, J. and Nørnung, B. 1996. Multilocus enzyme electrophoresis for characterization of *Listeria monocytogenes* isolates: results of an international comparative study. Int. J. Food Microbiol. 32: 301-311.
- Ceylan, T. G., Demirkaya, A. K. and Adigütel, G. 2008. Incidence of *Listeria monocytogenes* in retail chicken meat and establishing relationship with some bacteria by logistic regression. J. Food Quality: 31: 121-130.
- CFSAN. 2000. Center for Food Safety and Applied Nutrition. *Listeria* Risk Assessment.
- Chae, M. S. and Schraft, H. 2000. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. Int. J. Food Microbiol. 62: 103-111.
- Chakraborty, T., Ebel, F., Domann, E., Niebuhr, K., Gerstel, B., Pistor, S., Temm Grove, C. J., Jockusch, B. M., Reinhard, M., Walter, U. and Wehland, J. 1995. A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. EMBO J. 14: 1314-1321.
- Chakraborty, T., Hain, T. and Domann, E. 2000. Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. Int. J. Med. Microbiol. 290: 167-174.
- Chico Calero, I., Suarez, M., Gonzalez Zorn, B., Scotti, M., Slaghuis, J., Goebel, W., The European Listeria Genome Consortium, Vazquez Boland, J. A. 2002. Htp, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 431-436.
- Chmielewski, R. A. N. and Frank, J. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comp. Rev. Food Sci. Food Saf. 2: 22-32.

- Christensen, D. P. and Hutkins, R. W. 1994. Glucose uptake by *Listeria monocytogenes* Scott A and inhibition by pediocin JD. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3870-3873.
- Churchill R. L. T., Lee, H. and Christopher H. J. 2006. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. J. Microbiol. Methods. 64: 141-170.
- Clark, A. G. and McLaughlin, J. 1997. Simple color tests based on an alanyl peptidase reaction which differentiate *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* species. J. Clin. Microbiol. 35: 2155-2156.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Cantoni, K. L. and Comi, G. 2002. Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. Appl. Environ. Microbiol. 68: 6273-6282.
- Coconnier, M. H., Dliissi, E., Robard, M., Laboissee, C. L., Gaillard, J. L. and Servin, A. L. 1998. *Listeria monocytogenes* stimulates mucus exocytosis in cultured human polarized mucosecreting intestinal cells through actions of listeriolysin O. Infect. Immun. 66: 3673-3681.
- Coconnier, M. H., Lorrot, M., Barbat, A., Laboissee, C. and Servin, A. L. 2000. Listeriolysin O-induced stimulation of mucin exocytosis in polarized intestinal mucin-secreting cells: evidence for toxin recognition of membrane-associated lipids and subsequent toxin internalization through caveole. Cell Microbiol. 2: 487-504.
- Coffey, A., Rombousts, F. M. and Abee, T. 1996. Influence of environmental parameters on phosphatidylcholine phospholipase C production in *Listeria monocytogenes*: A convenient method to differentiate *L. monocytogenes* from other *Listeria* species. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1252-1256.
- Collins, M. D., Wallbanks, S., Lane, D. J., Shah, J., Nietupski, R., Smida, R., Dorsch, M. and Stackebrandt, E. 1991. Phylogenic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 240-246.
- Conner, D. E., Scott, V. N., Summer, S. S. and Bernand, D. T. 1989. Pathogenicity of foodborne, environmental and clinical isolates of *Listeria monocytogenes* in mice. J. Food Sci. 54: 1553-1556.
- Copp, J., Marino, M., Banerjee, M., Ghosh, P. and Van der Geer, P. 2003. Multiple regions of internalin B contribute to its ability to turn on the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. J. Biol. Chem. 278: 7783-7789.
- Cossart, P., Vicente, M. F., Mengaud, J., Baquero, F., Perez Diaz, J. C. and Berche, P. 1989. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. Infect. Immun. 57: 3629-3636.



- Cossart, P. and Lecuit, M. 1998. Interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* 17: 3797-3806.
- Cossart, P., Pizarro Cerda, J. and Lecuit, M. 2003. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol.* 13: 23-31.
- Cotoni, L. 1942. A propos des bacteries denommees *Listerella*-rappel d'une observation ancienne de meningite chez l'homme. *Ann. Inst. Pasteur* 68: 92-95.
- Curiale, M. S. and Lewus, C. 1994. Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *J. Food Prot.* 57: 1048-1051.
- Curtis, G. D. W. and Mitchell, R. G. 1992. Bacteriocin (monocin) interactions among *Listeria monocytogenes* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 16: 283-292.
- Cutter, C., McElroy, D. and Penn, S. 2006. Control of *Listeria monocytogenes* in retail establishments. College of Agricultural Sciences, The Pennsylvania State University.
- Dabiri, G. A., Sanger, J. M., Portnoy, D. A. and Southwck, F. S. 1990. *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87: 6068-6072.
- Daneshvar, M. I., Malcolm, J. B. and Pine, L. 1989. Analyses of fermentation products of *Listeria* species by frequency-pulsed electron-capture gas-liquid chromatography. *Can. J. Microbiol.* 35: 786-793.
- de Cesare, A., Bruce, J. L., Dambaugh, T. R., Guerzoni, M. E. and Wiedmann, M. 2001. Automated ribotyping using different enzymes to improve discrimination of *Listeria monocytogenes* isolates, with a particular focus on serotype 4b strains. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3002-3005.
- de Luca, G., Zanetti, F., Fateh-Moghadm, P. and Stampi, S. 1998. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in sewage sludge. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* 201: 269-277.
- Del Corral, F., Buchanan, R. L., Bencivengo, M. M. and Cooke, P. H. 1990. Quantitative comparison of selected virulence associated characteristics in food and clinical isolates of *Listeria*. *J. Food Prot.* 53: 1003-1009.
- Den Bakker, H. C., Bundrant, B. N., Fortes, E. D., Orsi R. H. and Wiedmann. 2010a. A population genetics – based and phylogenetic approach to understanding the evolution of virulence in the genus *Listeria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 6085-6100.
- Den Bakker, H. C., Cummings, C. A., Ferreira, V., Vatta, P., Orsi, R. H., Degoricija, L., Barker, M., Petrauskene, O., Furtado, M. R. and Wiedmann M. 2010b. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics* 11: 688.

- Destro, M. T., Leitao, M. F. and Farber, J. M. 1996. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. Appl. Environ. Microbiol. 62: 705-711.
- Dijkstra, R. G. 1975. The occurrence of *Listeria* encephalitis in cattle in a loose housing after the use of litter, infected with *Listeria* bacteria, from a broiler farm. To what extend do *Listeria* bacteria occur in the gut contents of broilers (author 's trans.). Tijdschr. Diergeneesk. 100: 1154-1155.
- Dimitrijević, M., Karabasil, N., Kilibarda, N., Teodorović, V. and Baltić, M. 2008. Kontrola *Listeria monocytogenes* u pogonima za proizvodnju hrane. Vet. glasnik 62: 301-315.
- Domann, E., Leimeister Wachter, M., Goebel, W. and Chakraborty, T. 1991. Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is specific and physically linked to the listeriolysin gene. Infect. Immun. 59: 65-72.
- Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister Wachter, M., Wuenscher, M. and Chakraborty, T. 1992. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the prolin-rich region of vinculin. EMBO J. 11: 1981-1990.
- Domann, E., Zechel, S., Lingnau, A., Hain, T., Darji, A., Nichterlein, T., Wehland, J. and Chakraborty, T. 1997. Identification and characterization of a novel PrfA-regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeat. Infect. Immun. 65:101-109.
- Donlan, R. M. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. 8: 881-890.
- Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jaquet, C., Kunst, F., Martin, P., Cossart, P., Glaser, P. and Buchrieser, C. 2004. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics. Infect. Immun. 72: 1072-1083.
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J. 2001. Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington DC, USA: 171-191.
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P. and Cossart, P. 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires the expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. Mol. Microbiol. 16: 251-261.
- Dramsi, S., Lévi, S., Thriller, A. and Cossart, P. 1998. Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study. Infect. Immun. 66: 4461-4468.

- Dramsi, S. and Cossart, P. 2002. Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. *J. Cell Biol.* 156: 943-946.
- Dramsi, S. and Cossart, P. 2003. Listeriolysin O mediated calcium influx potentiates entry of *Listeria monocytogenes* into the human Hep-2 epithelial cell line. *Infect. Immun.* 71: 3614-3618.
- Dramsi, S., Bourdichon, F., Cabanes, D., Lecuit, M., Fsihi, H. and Cossart, P. 2004. FbpA, a novel multifunctional *L. monocytogenes* virulence factor. *Mol. Microbiol.* 53: 639-649.
- Draughon, F. A., Antony, B. A. and Denton, M. E. 1999. *Listeria* species in fresh rainbow trout purchased from retail markets. *Dairy Food Environ. Sanit.* 19: 90-94.
- Drevets, D. A., Sawyer, R. T., Potter, T. A. and Campbell, P. A. 1995. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect. Immun.* 63: 4268-4276.
- Dunne, W. M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 155-166.
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M. Buchrieser, C., Glaser, P. and Cossart, P. 2002. *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol. Microbiol.* 45: 1095-1106.
- Dussurget, O., Pizarro Cerda, J. and Cossart, P. 2004. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 587-610.
- EC. 1999. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*. Brussels, Belgium: European Commission. Health and Consumer Protection Directorate – General.
- Eklund, M. W., Poysky, F. T., Paranjpye, R. N., Lashbrook, L. C., Petersen, M. E. and Perloy, G. A. 1995. Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold smoking fishery products and processing plants. *J. Food Prot.* 58: 502-508.
- Engelbrecht, F., Chun, S. K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W. and Sokolovic, Z. 1996. A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol. Microbiol.* 21: 823-837.
- Ericsson, H. and Stålhandske, P. 1997. PCR detection of *Listeria monocytogenes* in “gravid” rainbow trout. *Int. J. Food Microbiol.* 35: 281-285.
- Farber, J. M. and Peterkin, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55: 476-511.
- Farber, J. M., Speirs, J. I., Pontefract, R. and Conner, D. E. 1991a. Characteristics of nonpathogenic strains of *Listeria monocytogenes*. *Can. J. Microbiol.* 37: 647-650.

- Farber, J. M., Peterkin, P. I., Carter, A. O., Varughese, P. V., Ashton, F. E. and Ewan, E. P. 1991b. Neonatal listeriosis due to cross-infection confirmed by isoenzyme typing and DNA fingerprinting. *J. Infect. Dis.* 163: 927-928.
- Fenlon, D. R. 1986. Rapid quantitative assessment of the distribution of *Listeria* in silage implicated in a suspected outbreak of listeriosis in calves. *Vet. Rec.* 118: 240-244.
- Fenlon, D. R., Wilson, J. and Donachie, W. 1996. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 641-650.
- Fenlon, D. R. 1999. *Listeria monocytogenes* in the natural environment, p. 21-38. In E. T. Ryser and E. H. Marth (ed), *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Marcel Decker, Inc., New York, NY.
- Fernandez, P. S., George, S. M., Sills, C. C. and Peck, M. W. 1997. Predictive model of the effect of CO<sub>2</sub>, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 37: 37-45.
- Ferretti, J., McShan, W. M., Ajdic, D., Savic, D. J., Savic, G., Lyon, K., Primeaux, C., Sezate, S., Suvorov, A. N., Kenton, S., Lai, H. S., Lin, S. P., Qian, Y., Jia, H. G., Najjar, F. Z., Ren, Q., Zhu, H., Song, L., White, J., Yuan, X., Clifton, S. W., Roe, B. A. and McLaughlin, R. 2001. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 4658-4663.
- Fischetti, V. A., Pancholi, V. and Schneewind, O. 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Mol. Microbiol.* 4: 1603-1605.
- Fonnesbech Vogel, B., Huss, H., Ojeniyi, B., Ahrens, P. and Gram, L. 2001. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2586-2595.
- Food and Drug Administration Food Code. 2001. Available at [www.cfsan.fda.gov/~dms/foodcode.html](http://www.cfsan.fda.gov/~dms/foodcode.html).
- Food and Drug Administration/United States Department of Agriculture. 2003. Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Available at [www.foodsafety.gov/~dms/LMr2-toc.html](http://www.foodsafety.gov/~dms/LMr2-toc.html).
- Frank, J. F. and Koffi, R. A. 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.* 53: 550-554.
- Fung, D. Y. C. 2002. Predictions for rapid methods and automation in food microbiology. *J. AOAC Int.* 85: 1000-1002.

- Furrer, B., Candrian, U., Hoefelein, C. and Luethy, J. 1991. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of haemolysin gene fragments. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 372-379.
- Gaillard, J. L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S. and Sansonetti, P. 1987. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 55: 2822-2829.
- Gaillard, J. L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. and Cossart, P. 1991. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 65: 1127-1141.
- Gedde, M. M., Higgins, D. E., Tilney, L. G. and Portnoy, D. A. 2000. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 68: 999-1003.
- Geese, M., Loureiro, J. J., Bear, J. E., Wehland, J., Gertler, F. B. and Sechi, A. S. 2002. Contribution of Ena/VASP proteins to intracellular motility of *Listeria* requires phosphorylation and praline-rich core but not F-actin binding or multimerization. *Mol. Biol. Cell* 13: 2383-2396.
- George, S. M. and Lund, B. M. 1992. The effect of culture medium and aeration on growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 49-52.
- Gerner Smidt, P., Boerlin, P., Ischer, F. and Schmidt, J. 1996. High-frequency endonuclease (REA) typing: results from the WHO collaborative study group on subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 32: 313-324.
- Gilmore, A. P. and Burrige, K. 1996. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4,5-biphosphate. *Nature* 381: 531-535.
- Gilot, P., André, P. and Content, J. 1999. *Listeria monocytogenes* possesses adhesins for fibronectin. *Infect. Immun.* 67: 6698-6701.
- Giovannacci, I., Ragimbeau, C., Queguiner, S., Salvat, G., Vendevre, J. L., Carlier, V. and Ermel, G. 1999. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants: use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *Int. J. Food Microbiol.* 53: 127-140.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominiquez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K. D., Fsihi, H., Portillo, F. G., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L. M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapatk, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J. M., Nedjari, E. Ng. H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J. C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J.

- A., Voss, H., Wehland, J. and Cossart, P. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294: 849-852.
- Goebel, W. and Kreft, J. 1997. Cytolysins and the intracellular life of bacteria. *Trends Microbiol.* 5: 86-88.
- Goebel, W., Kreft, J. and Böckmann, R. 2000. Gram Positive Pathogens. Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A. and Rood, J. I. editors. Washington, D. C: Am. Soc. Microbiol. 499-506.
- Goldfine, H., Wadsworth, S. J. and Johnston, N. C. 2000. Activation of host phospholipases C and D in macrophages after infection with *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 68: 5735-5741.
- Goldfine, H. and Wadsworth, S. J. 2002. Macrophage intracellular signaling induced by *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect.* 4: 1335-1343.
- Golsteyn, R. M., Beckerele, M., Koay, T. and Friederich, E. 1997. Structural and functional similarities between the human cytoskeletal protein zyxin and the ActA protein of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Sci.* 110: 1893-1906.
- Gombas, D. E., Chen, Y., Clavero, R. S. and Scott, V. N. 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *J. Food Prot.* 66: 559-569.
- Gouin, E., Mengaud, J. and Cossart, P. 1994. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infect. Immunol.* 62: 3550-3553.
- Gouin, E., Gantelet, H., Egile, C., Lasa, I., Ohayon, H., Villiers, V., Gounon, P., Sansonetti, P. J. and Cossart, P. 1999. A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *J. Cell Sci.* 112: 1697-1708.
- Gouin, E., Egile, C., Dehoux, P., Villiers, V., Adams, J., Gertler, F., Li, R. and Cossart, P. 2004. The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. *Nature* 427: 457-461.
- Goulet, V., Jacquet, C., Vallant, V., Rebiere, I., Mouret, E., Lorente, C., Maillot, E., Stainer, F. and Rocourt, J. 1995. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. *Lancet* 345: 1501-1502.
- Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, E. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Milillo, S. R., den Bakker, H. C., Wiedmann, M., Swaminathan, B. and Sauders, B. D. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment. Finger Lakes National Forest. *Inter. J. System. Evolution. Microbiol.* 60: 1280-1288.

- Gregory, S. H., Sagnimeni, A. J. and Wing, E. J. 1996. Expression of the *inlAB* operon by *Listeria monocytogenes* is not required for entry into hepatic cells in vivo. *Infect. Immun.* 64: 3983-3986.
- Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K. S., Daniels, J. and Kuhn, M. 2000. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: an electron microscopic study. *Infect. Immun.* 68: 3275-3279.
- Greenwood, M., Willis, C., Doswell, P., Allen, G. and Pathak, K. 2005. Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1340-1345.
- Grundling, A., Gonzales, M. D. and Higgins, D. E. 2003. Requirement of the *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase PC-PLC during infection of human epithelial cells. *J. Bacteriol.* 185: 6295-6307.
- Guilbaud, M., de Coppet, P., Bourion, F., Rachman, C., Prévost, H. and Dousser, X. 2005. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in biofilms by Real Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2190-2194.
- Gunn, J. S. 2000. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes Infect.* 2: 907-913.
- Gutekunst, K. A., Pine, L., White, E., Kathariou, S. and Carlone, G. M. 1992. A filamentous-like mutant of *Listeria monocytogenes* with reduced expression of a 60-kilodalton extracellular protein invades and grows in 3T6 and Caco-2 cells. *Can. J. Microbiol.* 38: 843-851.
- Guzman, C. A., Domann, E., Rohde, M., Bruder, D., Darji, A., Weiss, S., Wehland, J., Chakraborty, T. and Timmis, K. N. 1996. Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 20: 119-126.
- Harris, J. L. 2005. Department of Food Science and Technology, University of California – Davis, April 18, 2005. *Listeria monocytogenes* Class Notes PHR 150.
- Heisick, J. E., Rosas Marty, L. I. and Tatini, S. R. 1995. Enumeration of viable *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* in foods. *J. Food Prot.* 58: 733-736.
- Hein, I., Klein, D., Lehner, A., Bubert, A., Brandl, E. and Wagner, M. 2001. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by new real-time quantitative assay. *Res. Microbiol.* 152: 37-46.
- Heredia, N., García, S., Rojas, G. and Salazar, L. 2001. Microbiological condition of ground meat retailed in Monterrey, Mexico. *J. Food Prot.* 64: 1249-1251.
- Hitchins, A. D. 2003. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. US Food and Drug Administration's Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10 (on line). Available in <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html> (1 February, 2006).

- Hoezler, K., Sauders, B. D., Sanchez, M. D., Olsen P. T. Pickett, M. M., Mangione, K. J., Rice, D. H., Corby, J., Stich, S., Fortes, E. D., Roof, S. E., Grohn, Y. T., Wiedmann, M., Oliver, H. F. 2011. Prevalence, distribution, and diversity of *Listeria monocytogenes* in retail environments, focusing on small establishments and establishments with a history of failed inspections. *J. Food Prot.* 74: 1083-1095.
- Hof, H. 1984. Virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* serovar 1/2. *Med. Microbiol. Immunol.* 173: 207-218.
- Hoffman, A. D., Gall, K. L., Norton, D. M. and Wiedmann, M. 2003. *Listeria monocytogenes* contamination patterns for the smoked fish processing environment and for raw fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 52-60.
- Hudson, J. A., Mott, S. J. and Penney, N. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *J. Food Prot.* 57: 204-208.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M. T. and Montfort, J. M. 1995. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 322-330.
- Huss, H. H., Jorgensen, L. V. and Vogel, B. F. 2000. Control options for *Listeria monocytogenes* in seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 267-274.
- Husu, J. R., Seppänen, J. T., Sivelä, S. K. and Rauramaa, A. L. 1990. Contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* on dairy farms. *J. Vet. Med.* 37: 268-275.
- Ikonić, P., Petrović, Lj., Tasić, T., Džinić, N., Jokanović, M. and Tomović, V. 2010. Physicochemical, biochemical and sensory properties for the characterization of Petrovská klobása (traditional fermented sausage). *Acta Per. Tech.* 41: 19-31.
- ISO. 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. International Standard ISO 11290 – 1. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- Ivanek, R., Gröhn, Y. T. and Wiedmann, M. 2006. *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host population: review of available data for mathematical modeling. *Foodborne Pathog. Dis.* 3: 319-336.
- Janzen, M. M., Navas, J., Corujo, A., Moreno, R., Lopez, V., Martínez-Suárez, J. V. 2006. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to Real Time PCR. *Span. J. Agric. Res.* 4: 235-247.
- Jayarao, B. M. and Henning, D. R. 2001. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* 84: 2157-2161.
- Jensen, A., Thomsen, L. E., Jorgensen, R. L., Larsen, M. H., Roldgaard, B., Christensen, B. B., Vogel, B. F., Gram, L. and Ingmer, H. 2008. Processing plant



- persistent strains of *Listeria monocytogenes* appear to have a lower virulence potential than clinical strains in selected virulence models. *Int. J. Food Microbiol.* 123: 254-261.
- Johansson, T., Rantala, L., Palmu, L. and Honkanen-Buzalski, T. 1999. Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish product and in production plant. *Int. J. Food Microbiol.* 47: 111-119.
- Johnson, J., Jinneman, K., Stelma, G., Smith, B. G., Lye, D., Messer, J., Ulaszek, J., Evsen, L., Gewndel, S., Bennett, R. W., Swaminathan, B., Pruckler, J., Steigerwalt, A., Kathariou, S., Yildirim, S., Volokhov, D., Rasooly, A., Chizhikov, V., Wiedmann, M., Fortes, E., Duvall, R. E. and Hitchins, A. D. 2004. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4256-4266.
- Joković, N. 2004. Izolacija i karakterizacija bakterija mlečne kiseline iz sira sa planine Radan. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.
- Jonquieres, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P. and Cossart, P. 1999. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanisms of protein association at the surface of gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 34: 902-914.
- Jorgensen, F., Stephens, P. J. and Knoche, S. 1995. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 274-281.
- Jovcic, B., Golic, N., Kojic, M., Topisirovic, Lj. 2005. Molecular characterization of semi hard homemade cheese microflora. *Acta Vet.* 55: 511-519.
- Kaiser, A. L. and Montville, T. J. 1996. Purification of the bacteriocin Bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* scott A-cell and lipid vesicles, *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4529-4535.
- Kalmokoff, K. L., Austin, J. W., Wan, X. D., Sanders, G., Banerjee, S. and Farber, J. M. 2001. Adsorption attachment and biofilm formation among isolate of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *J. Appl. Microbiol.* 91: 725-734.
- Kamat, A. S. and Nair, P. M. 1996. Identification of *Listeria innocua* as a biological indicator for inactivation of *L. monocytogenes* by some meat processing treatments. *Food Sci. Technol. Lebensm. Wiss. Technol.* 29: 714-720.
- Kämpfer, P., Böttcher, S., Dott, W. and Rüdén, H. 1991. Physiological characterization and identification of *Listeria* species. *Zbl. Bakteriol.* 275: 423-435.
- Katarious, S., Metz, P., Hof, H. and Goebel, W. 1987. Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 169: 1291-1297.

- Kathariou, S., Kanenaka, R., Allen, R. D., Fok, A. K. and Mizumoto, C. 1995. Repression of motility and flagellin production at 37°C is stronger in *Listeria monocytogenes* than in the nonpathogenic species *Listeria innocua*. *Can. J. Microbiol.* 41: 572-577.
- Katić, V. 2010. Primena kriterijuma za *L. monocytogenes*. Bezbednost i kvalitet namirnica animalnog porekla. Zbornik radova, 2. Simpozijum, Beograd, 32-43.
- Kayal, S., Lilienbaum, A., Join Lambert, O., Li, X., Israel, A. and Berche, P. 2002. Listeriolysin O secreted by *Listeria monocytogenes* induced NF-kappaB signaling by activating the IkappaB kinase complex. *Mol. Microbiol.* 44: 1407-1419.
- Keskinen, L. A., Todd, E. C. and Ryser, E. T. 2008. Transfer of surface-dried *Listeria monocytogenes* from stainless steel knife blades to roast turkey breast. *J. Food Prot.* 71: 176-81.
- Keto, R. and Rahkio, M. 1998. *Listeria* in fish products. National Food Administration Research notes.
- Keto Timonen, R., Autio, T. and Korkeala, H. 2003. An improved amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol for discrimination of *Listeria* isolates. *System. Appl. Microbiol.* 26: 236-244.
- Kimura, B. 2006. Recent advances in the study of the genotypic diversity and ecology of *Listeria monocytogenes*. *Microbes Environ.* 2: 69-77.
- Klausner, R. B. and Donnelly, C. W. 1991. Environmental sources of *Listeria* and *Yersinia* in Vermont dairy plants. *J. Food Prot.* 54: 607-611.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. and Cossart, P. 1992. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* 68: 521-531.
- Kohda, C., Kawamura, I., Baba, H., Nomura, T., Ito, Y., Kimoto, T., Watanabe, I. and Mitsuyama, M. 2002. Dissociated linkage of cytokine-inducing activity and cytotoxicity to different domains of listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 70: 1334-1341.
- Köhler, S., Leimeister-Wachter, M., Chakraborty, T., Lottspeich, F. and Goebel, W. 1990. The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 58: 1943-1950.
- Köhler, S., Burbert, A., Vogel, M. and Goebel, W. 1991. Expression of the iap gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* is controlled on the posttranslation level. *J. Bacteriol.* 173: 4668-4674.
- Kovincic, I., Mrdjen, M., Komnenov-Pupovac, V., Vujicic, I. F., Vulic, M., Svabic-Vlahovic, M. and Tierney, J. T. 1991. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in naturally infected and inoculated cow 's milk. *Acta Microbiol. Hung.* 38: 3-6.

- Krull, M., Nost, R., Hippenstiel, S., Domann, E., Chakraborty, T. and Suttorp, N. 1997. *Listeria monocytogenes* potently induced up-regulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J. Immunol.* 159: 1970-1976.
- Kuhn, M. and Goebel, W. 1989. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect. Immunol.* 57: 55-61.
- Lachica, R. V. 1996. Hemolytic activity reevaluation of putative nonpathogenic *Listeria monocytogenes* strains. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 4293-4295.
- Larsen, H. E. and Seeliger, H. P. R. 1966. A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp. In Proceedings of the third international symposium on listeriosis. Bilthoven, The Netherland.
- Lasa, I., David, V., Gouin, E., Marchand, J. B. and Cossart, P. 1995. The amino-terminal part of ActA is critical for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator. *Mol. Microbiol.* 18: 425-436.
- Lasa, I., Gouin, E., Goethals, M., Vancompernelle, K., David, V., Vandekerckhove, J. and Cossart, P. 1997. Identification of two regions in the N-terminal domain of ActA involved in the actin comet tail formation by *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* 16: 1531-1540.
- Lasa, I., Dehoux, P. and Cossart, P. 1998. Actin polymerization and bacterial movement. *Biochim. Biophys. Acta.* 1402: 217-228.
- Laurent, V., Loisel, T. P., Harbeck, B., Wehman, A., Grobe, L., Jockusch, B. M., Wehland, J. and Getler, F. B. 1999. Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 144: 1245-1258.
- Lawrence, L. M. and Gilmour, A. 1994. Incidence of *Listeria* spp and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation of multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4600-4604.
- Lawrence, L. M. and Gilmour, A. 1995. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and from the poultry-processing environment by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2139-2144.
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C. M., Guyonnet, J. P., Mafart, P. and Thuault, D. 2002. Modeling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *Int. J. Food Microbiol.* 73: 219-237.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A., Le Fleche – Mateos, A., Roche, S. M., Buchrieser, C., Cadet – Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M., Allerberger, F.

2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. Inter. J. System. Evolution. Microbiol. 60: 2210-2214.
- Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J., Cossart, P. 1997. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine rich repeat region is sufficient to promote internalization. Infect. Immun. 65: 5309-5319.
- Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor Chaiken, M., Gumbiner, B. and Cossart, P. 1999. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. EMBO J. 18: 3956-3963.
- Leimeister Wachter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W. and Chakraborty, T. 1990. Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8336-8340.
- Leimeister Wachter, M., Domann, E. and Chakraborty, T. 1991. Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiol. 5: 361-366.
- Lianou, A. and Sofos, J. N. 2007. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. J. Food Prot. 70: 2172-2198.
- Lin, C. M., Takeuchi, K., Zhang, L., Dohm, C. B., Meyer, J. D., Hall, P. A. and Doyle, M. P. 2006. Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 69: 71-79.
- Loncarevic, S., Danielsson-Tham, M. L., Mårtensson, L., Rigner, Å., Runehagen, A. and Tham, W. 1997. A case of foodborne listeriosis in Sweden. Lett. Appl. Microbiol. 24: 65-68.
- Low, J. C. and Donachie, W. 1997. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. Vet. J. 153: 9-29.
- Ludwig, W., Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E. 1984. 16S rRNA analysis of *Listeria monocytogenes* and *Brochothrix thermosphacta*. FEMS Microbiol. Lett. 25: 199-204.
- Lundén, J. 2004. Persistent *Listeria monocytogenes* contamination in food processing plants. Academic dissertation, Department of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki.
- Lundén, J., Tolvanen, R. and Korkeala, H. 2008. Acid and heat tolerance of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* food plant strains. Lett. Appl. Microbiol. 46: 276-280.
- MacGowan, A. P., Bowker, K., McLauchlin, J., Bennett, P. M. and Reeves, D. S. 1994. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp in shop bought

- food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 325-334.
- Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J. and Magny, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainlesssteel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *J. Food Prot.* 53: 742-746.
- Mainou Fowler, T., Mac Gowan, A. P. and Postlethwaite, R. 1988. Virulence of *Listeria* spp. Course of infection in resistant and susceptible mice. *J. Med. Microbiol.* 27: 131.
- Mansell, A., Braun, L., Cossart, P. and O'Neill, L. A. 2000. A novel function of InlB from *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappaB in J774 macrophages. *Cell Microbiol.* 2: 127-136.
- Mansell, A., Khelef, N., Cossart, P. and O'Neill, L. A. 2001. Internalin B activates nuclear factor-kappa B via Ras, phosphoinositide 3-kinase, and Akt. *J. Biol. Chem.* 276: 43597-43603.
- Manzano, M., Cocolin, L., Ferroni, P., Cantoni, C. and Comi, G. 1997. A simple and fast PCR protocol to detect *L. monocytogenes* from meat. *J. Sci. Food Agricult.* 74: 25-30.
- Marco, A. J., Prats, N., Ramos, J. A., Briones, V., Blanco, M., Domínguez, L. and Domingo, M. 1992. A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. *J. Comp. Pathol.* 107: 1-9.
- Marquis, H., Doshi, V. and Portnoy, D. A. 1995. The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect. Immun.* 63: 4531-4534.
- McLauchlin, J., Audurier, A., Frommelt, A., Gerner-Smidt, P., Jacquet, C., Loessner, M. J., van derMee-Marquet, N., Rocourt, J., Shah, S. and Wilhelms, D. 1996. WHO study on subtyping *Listeria monocytogenes*: results of phage-typing. *Int. J. Food Microbiol.* 32: 289-299.
- McLauchlin, J. 1997. The identification of *Listeria* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 77-81.
- McLaughlan, A. M. and Foster, S. J. 1998. Molecular characterization of an autolytic amidase of *Listeria monocytogenes* EGD. *Microbiology* 144: 1359-1367.
- Mengaud, J., Braun-Breton, C. and Cossart, P. 1991a. Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? *Mol. Microbiol.* 5: 367-372.
- Mengaud, J., Geoffroy, C. and Cossart, P. 1991b. Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect. Immun.* 59: 1043-1049.

- Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vazquez-Boland, J. A., Milon, G. and Cossart, P. 1991c. Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by gene which is autoregulated. *Mol. Microbiol.* 5: 2273-2283.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R. M. and Cossart, P. 1996. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84: 923-932.
- Midelet, G. and Carpentier, B. 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4015-4024.
- Miettinen, M. K., Björkroth, J. and Korkeala, H. 1999. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice-cream plant by serotyping and pulsed field electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 46: 187-192.
- Miettinen, M. K., Palmu, L., Björkroth, K. J. and Korkeala, H. 2001a. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in broilers at the abattoir, processing plant and the retail level. *J. Food Prot.* 64: 994-999.
- Miettinen, H., Aarnisalo, K., Salo, S. and Sjöberg, A. M. 2001b. Evaluation of surface contamination and the presence of *Listeria monocytogenes* in fish processing factories. *J. Food Prot.* 64: 635-639.
- Miettinen, H. and Wirtanen, G. 2005. Prevalence and location of *Listeria monocytogenes* in farmed rainbow trout. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 135-143.
- Miettinen, H. and Wirtanen, G. 2006. Ecology of *Listeria* spp in fish farm and molecular typing of *Listeria monocytogenes* from fish farming and processing companies. *Int. J. Food Microbiol.* 112: 138-146.
- Milanov, D., Asanin, R., Mistic, D. Vidic, B. and Ratajac, R. 2007. Investigation of biofilm formation *in vitro* ability of *Listeria monocytogenes* strains isolated from animals. *Acta Vet.* 57: 429-440.
- Miller, R. and Britigan, B. E. 1997. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 1-18.
- Milohanic, E., Glaser, P., Coppee, J. Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vazquez Boland, J. A., Kunst, F., Cossart, P. and Buchrieser, C. 2003. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol. Microbiol.* 47: 1613-1625.
- Mitscherlich, E. and Marth, E. H. 1984. Microbial survival in the environment: bacteria and rickettsiae important in human and animal health. Berlin: Springer-Verlag.
- Motes, M. L. 1991. Incidence of *Listeria* spp in shrimps, oysters and estuarine waters. *J. Food Prot.* 54: 170-173.

- Møretrø, T. and Langsrud, S. 2004. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. Cambridge University Press. Biofilms 1: 107-121.
- Nesbakken, T., Kapperud, G. and Caugant, D. A. 1996. Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry. Int. J. Food Microbiol. 31: 161-171.
- Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U. D., Walter, U., Getler, F. B. and Wehland, J. 1997. A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. EMBO J. 16: 5433-5444.
- Niederhauser, C., Candrian, U., Höfelein, C., Jermini, M., Bühler, H. P. and Lüthy, J. 1992. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1564-1568.
- Niederhauser, C., Höfelein, C., Lüthy, J., Kaufmann, U., Bühler, H. P. and Candrian, U. 1993. Comparison of "Gen-Probe" DNA probe and PCR for detection of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated soft cheese and semi-soft cheese. Res. Microbiol. 144: 47-54.
- Niksic, M., Nieburh, S. E., Dickson, J. S., Mendonca, A. F., Koziczowski, J. J. and Ellingson, J. L. 2005. Survival of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 during sauerkraut fermentation. J. Food Prot. 68: 1367-1374.
- Nishibori, T., Xiong, H., Kawamura, I., Arakawa, M. and Mitsuyama, M. 1996. Induction of cytokine gene expression by listeriolysin O and roles of macrophage and NK cells. Infect. Immun. 64: 3188-3195.
- Nolan, D. A., Chamblin, D. C. and Troller, J. A. 1992. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. Int. J. Food Microbiol. 16: 323-335.
- Noriega, E., Laca, A. and Díaz, M. 2008. Modelling of diffusion-limited growth for food safety in simulated cheeses. Food Bioprod. Process. 86: 122-129.
- Norton, D. M., McCamey, M. Gall, A. K., Scarlett, J. M., Boor, K. J. and Wiedmann, M. 2001. Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. Appl. Environ. Microbiol. 67: 198-205.
- Norwood, D. E. and Gilmour, A. 1999. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steecoupons. J. Appl. Microbiol. 86: 576-582.
- Notermans, S. H. W., Dufrenne, J., Leimeisterwachter, M., Domann, E. and Chakraborty, T. 1991. Phosphatidylinositol-specific phospholipase-C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2666-2670.

- Obradović, D. and Vesković-Moračanin, S. 2007. Funkcionalne fermentisane kobasice. Tehnologija mesa 48: 93-98.
- O'Connor, L., Joy, J., Kane, M. and Maher, M. 2000. Rapid polymerase chain reaction/DNA probe membrane-based assay for the detection of *Listeria* and *Listeria monocytogenes* in food. J. Food Prot. 63: 337-342.
- O'Connor, L. 2003. Detection of *Listeria monocytogenes* using a PCR/DNA probe assay. Methods Mol. Biol. 216: 185-192.
- Ofek, I. and Sharon, N. 1988. Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of a bacteria. Infect. Immun. 56: 539-547.
- Oh, D. H. and Marshall, D. L. 1995. Destruction of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel using monolaurin and heat. J. Food Prot. 57: 251-255.
- Ojeniyi, B., Wegener, H. C., Jensen, N. E. and Bisgaard, M. 1996. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. J. Appl. Bacteriol. 80: 395-401.
- Orsi, R. H., den Bakker, H. C., and Wiedmann, M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. Inter. J. Med. Microbiol. 301: 79-96.
- Parida, S. K., Domann, E., Rohde, M., Müller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J. and Chakraborty, T. 1998. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. Mol. Microbiol. 28: 81-93.
- Parish, M. E., and Higgins, D. P. 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth system. J. Food Prot. 52: 144-147.
- Parker, C. and Hutkins, R. W. 1997. *Listeria monocytogenes* Scott A transport glucose by high-affinity and low-affinity glucose transport system. Appl. Environ. Microbiol. 63: 543-546.
- Perni, S., Jordan, S. J., Andrew, P. W. and Shama, G. 2006. Biofilm development by *Listeria innocua* in turbulent flow regimes. Food Control 17: 875-883.
- Petran, R. L. and Zottola, E. A. 1989. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. J. Food Sci. 54: 458-460.
- Petrović Lj., Dzinić, N., Ikonić, P., Tasić, T. and Tomović, V. 2011. Quality and safety standardization of traditional fermented sausages. Tehnologija mesa 52: 234-244.
- Petrović, Lj., Džinić, N., Tomović, V., Jokanović, M., Savatić, S., Šojić, B., Ikonić, P. and Tasić, T. 2010. Kvalitet kobasica u tipu kulena proizvedenih na tradicionalni način i u industrijskim uslovima. Zbornik radova, XV savetovanje o biotehnologiji, Čačak, 827-832.



- Phan Thanh, L. and Gormon, T. 1995. Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 16: 444-450.
- Pine, L., Malcolm, G. B., Brooks, J. B. and Daneshvar, M. I. 1989. Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Can. J. Microbiol.* 35: 245-254.
- Pine, L., Kathariou, S., Quinn, F., George, V., Wenger, J. D. and Weaver, R. E. 1991. Cytopathogenic effects in enterocytelike Caco-2 cells differentiate virulent from avirulent *Listeria* strains. *J. Clin. Microbiol.* 29: 990-996.
- Porsby, C. H., Vogel, B. F, Mohr, M. and Gram, L. 2008. Influence of processing steps in cold-smoked salmon production on survival and growth of persistent and presumed non-persistent *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 26 [Epub ahead of print].
- Portnoy, D. A., Jacks, P. S. and Hinrichs, D. J. 1988. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 167: 1459-1471.
- Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa. 2010. Sl. glasnik RS broj 72/10.
- Premaratne, R. J., Lin, W. J. and Johnson, E. A. 1991. Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3046-3048.
- Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Sarnacki, S., Monnet, J. P., Berche, P. and Gaillard, J. L. 1998. Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infect. Immun.* 66: 747-755.
- Radetić, P. 1982. Uticaj važnijih komponenata dima i odabranih režima dimljenja na sposobnost vezivanja vode u mesu. Doktorska disertacija. Veterinarski fakultet, Beograd.
- Radojičić, S., Valčić, M. and Djuričić, B. 2011. Knjiga: Infektivne bolesti životinja, specijalni deo, Beograd, 2011.
- Radovanović, R., Tomić, N., Tomašević, I. and Rajković, A. 2005. Prinos muskulature namenjene proizvodnji „Govede užičke pršute”, *Tehnologija mesa* 46: 250-260.
- Rahman, T., Sarma, D. K., Goswami, B. K., Upadhyaya, T. N. and Choudhury, B. 1985. Occurrence of listerial meningoencephalitis in pigs. *Ind. Vet. J.* 62: 7-9.
- Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P. and Cocolin, L. 2008. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *Inter. J. Food Microbiol.* 121: 99-105.
- Rašeta, M., Vesković-Moračanin, S., Borović, B., Karan, D., Vranić, D., Trbović, D. and Lilić, S. 2010. Mikroklimatski uslovi tokom zrenja kobasica proizvedenih na tradicionalan način. *Tehnologija mesa* 51: 45-51.

- Rea, M. C., Cogan, T. M. and Tobin, S. 1992. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. *J. Appl. Bacteriol.* 93: 331-336.
- Repp, H., Pamukci, Z., Koschinski, A., Domann, E., Darji, A. *et al.* 2002. Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca<sup>2+</sup>-permeable pores leading to intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillation. *Cell Microbiol.* 4: 483-491.
- Rocourt, J., Grimont, F., Grionot, P. A. D. and Seeliger, H. P. R. 1982. DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes sensu lato*. *Curr. Microbiol.* 7: 383-388.
- Rocourt, J. and Grimont, P. A. D. 1983. *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 866-869.
- Rocourt, J., Schrettenbrunner, A. and Seeliger, H. P. R. 1983a. Différentiation biochimique des groupes génomiques de *Listeria monocytogenes (sensu lato)*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 134A: 65-71.
- Rocourt, J., Alonso, J. M. and Seeliger, H. P. R. 1983b. Virulence compare des cinq groupes génomiques de *Listeria monocytogenes (sensu lato)*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 134A: 359-364.
- Rocourt, J., Audurier, A., Courtieu, A. L., Durst, J., Ortel, S., Schrettenbrunner, A. and Taylor, A. G. 1985. A multi- centre study on the phage typing of *Listeria monocytogenes*. *Zbl. Bakt. Hyg.* 259: 489-497.
- Rocourt, J., Wehmeyer, U., Cossart, P. and Stackebrandt, E. 1987. Proposal to retain *Listeria murrayi* and *Listeria grayi* in the genus *Listeria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 298-300.
- Rocourt, J. and Cossart, P. 1997. Foodborne Pathogenic Bacteria. *Listeria monocytogenes*. In Doyle MP, Beuxhat L, Montville TJ (eds.) : *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Washington, D. C.: ASM Press, 1997: 337-352.
- Romick, T. L., Fleming, H. P. and McFeeters, R. F. 1996. Aerobic and anaerobic metabolism of *Listeria monocytogenes* in defined glucose medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 304-307.
- Ronner, A. B. and Wong, A. C. L. 1993. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. *J. Food Prot.* 56: 750-758.
- Rørvik, L. M., Caugant, D. A. and Yndestad, K. M. 1995. Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *Int. J. Food. Microbiol.* 25: 19-27.
- Rørvik, L. M., Skjerve, E., Knudson, B. R. and Yndestad, K. M. 1997. Risk factor for contamination of smoked salmon with *Listeria monocytogenes* during processing. *Int. J. Food Microbiol.* 37: 215-219.

- Rørvik, L. M., Aase, B., Alvestad, T. and Caugant, D. A. 2000. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in seafoods and seafood-processing plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4779-4784.
- Rørvik, L. M., Aase, B., Alvestad, T. and Caugant, D. A. 2003. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in broilers and poultry products. *J. Appl. Microbiol.* 94: 633-640.
- Rossen, L., Holmstrøm, K., Olsen, J. E. and Rasmussen, O. F. 1991. A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. *Int. J. Food Microbiol.* 14: 145-152.
- Ryser, E. T., Arimi, S. M., Bunduki, M. and Connelly, C. W. 1996. Recovery of different *Listeria* ribotypes from naturally contaminated, raw refrigerated meat and poultry products with two primary enrichment media. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1781-1787.
- Ryser, E. T. and Marth, E. H. 1999. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Quinn, F. and Mabilat, C. 1996. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 669-674.
- Salvat, G., Toquin, M. T., Michel, Y. and Colin, P. 1995. Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: lessons of a listeriosis outbreak in France. *Int. J. Food Microbiol.* 25: 75-81.
- Santiago, N. I., Zipf, A. and Bhunia, A. K. 1999. Influence of temperature and growth phase on expression of a 104-kilodalton *Listeria* adhesion protein in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2765-2769.
- Scheu, P. M., Berghof, K., Stahl, U. 1998. Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiol.* 15: 13-31.
- Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, A. C., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S. and Broome, C. V. 1983. Epidemic listeriosis: Evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* 308: 203-206.
- Schneewind, O., Fowler, A. and Faull, K. F. 1995. Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. *Science* 286: 103-106.
- Schönberg, A., Bannerman, E., Courtieu, A. L., Kiss, R., McLachlin, J., Shah, S. and Wilhelms, W. 1996. Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 32: 279-287.

- Schuch, D. M. T., Moore, J., Madden, R. H. and Espie, W. E. 1992. Hemolytic reaction of *Listeria monocytogenes* on bilayer Columbia agar plates with defibrinated Guinea-pig blood. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 78-79.
- Scott, V. N., Swanson, K., Frier, T. A., Pruett jr., W. P., Sveum, W. H., Hall, P. A., Smoot, L. A. and Brown, D. G. 2005. Guidelines for Conducting *Listeria monocytogenes* Challenge Testing of Foods. *Food Prot. Trends* 25: 818-825.
- Seeliger, H. P. R. 1961. *Listeriosis* 2<sup>nd</sup> edition. Basel: Karger.
- Seeliger, H. P. R. and Hohne, K. 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: T. Bergan and J. R. Norris (ed.). *Academic press, Inc., New York, USA. Meth. Microbiol.* 13: 31-49.
- Seeliger, H. P. R. 1981. Apathogene Listerien: *L. innocua* sp. *Zbl. Bacteriol. Hyg., I. Abt. Orig. A.* 249: 487-493.
- Seeliger, H. P. R., Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Grimont, P. A. D. and Jones, D. 1984. *Listeria ivanovii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 336-337.
- Seeliger, H. P. R., and Jonesy, D. 1986. Genus *Listeria* pirie 1940. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2, eds. P. H. A. Sneathy, N. S. Mair, N. E. Sharpe, and J.G. Holt.
- Seeliger, H. P. R., and Bockemuhl, J. 1986. Kritische Untersuchungen zur Frage einer Kapselbildung bei *Listeria monocytogenes*. *Zbl. Bakteriologie. Parasit. Infekt. Hyg., I. Orig.* 206: 216-227.
- Senczek, D., Stephan, R. and Untermann, F. 2000. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 155-159.
- Shahamat, M., Seaman, A. and Woodbine, M. 1980. Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations. *Zbl. Bacteriol. Hyg. I. Abt. Orig. A.* 246: 506-511.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M. and Ireton, K. 2000. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 103: 501-510.
- Sheen, S. 2008. Modelling surface transfer of *Listeria monocytogenes* on salami during slicing. *J. Food Sci.* 73: 304-311.
- Sibeliuss, U., Rose, F., Chakraborty, T., Darji, A., Wehland, J., Weiss, S., Seeger, W. and Grimminger, F. 1996. Listeriolysin is potent inducer of the phosphatidylinositol response and lipid mediator generation in human endothelial cells. *Infect. Immun.* 64: 674-676.
- Sibeliuss, U., Schultz, E. C., Rose, F., Hattar, K., Jacobs, T., Weiss, S., Chakraborty, T., Seeger, W. and Grimminger, F. 1999. Role of *Listeria monocytogenes* exotoxins

listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C in activation of human neutrophils. *Infect. Immun.* 67: 1125-1130.

Sinde, E. and Carballo, J. 2000. Attachment of *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol.* 17: 439-447.

Skalka, B. and Smola, J. 1982. Hemolytic properties of exo-substance of serovar 5 *Listeria monocytogenes* compared with beta toxin of *Staphylococcus aureus*. *Zbl. Bakteriolog. Hyg. I. Abt. Orig. A.* 252: 17-25.

Skoble, J., Portnoy, D. A. and Welch, M. D. 2000. Three regions within ActA promote Arp2/3 complex-mediated actin nucleation and *Listeria monocytogenes* motility. *J. Cell Biol.* 150: 527-538.

SRPS ISO 1841. 1999. Meso i proizvodi od mesa. Određivanje sadržaja hlorida – Deo 1: Metoda po Volhardu.

Stjepanović, A., Marković, B., Vesković Moračanin, S. 2007. Molekularno biološke metode u mikrobiološkoj kontroli mesa i proizvoda od mesa. *Tehnologija mesa* 48: 123-130.

Stover, C. K., Pharm, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P. *et al.* 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.

Suarez, M., Gonzalez Zorn, B., Vega, Y., Chico Calero, I. and Vazquez Boland, J. A. 2001. A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol.* 3: 853-864.

Suihko, M. L., Salo, S., Niclasen, O., Guobjörnsdóttir, B., Torkelsson, G., Bredholt, S., A., Sjöberg, A. M. and Gustavsson, P. 2002. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from meat, poultry, and seafood industries by automated ribotyping. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 137-146.

Sun, A. N., Camilli, A. and Portnoy, D. A. 1990. Isolation of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 58: 3770-3778.

Tabouret, M., Derycke, J., Audurier, A. and Poutrel, B. 1991. Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* isolates in immunocompromised mice in relation to listeriolysin production. *J. Med. Microbiol.* 34: 13-18.

Tang, P., Rosenshine, I., Cossart, P. and Finlay, B. B. 1996. Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 64: 2359-2361.

Theriot, J. A., Mitchison, T. J., Tilney, L. G. and Portnoy, D. A. 1992. The rare of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* 357: 257-260.

- Tilney, L. G. and Portnoy, D. A. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. J. Cell Biol. 109: 1597-1608.
- Tkáčiková, L., Kantíková, M., Dimitriev, A. and Mikula, I. 2000. Use of the molecular typing methods to evaluate the control of *Listeria monocytogenes* contamination in raw milk and dairy products. Folia Microbiol. 45: 157-160.
- Trajkovic Pavlovic, L. B., Popovic, M. B., Novakovic, B. D., Gusman Pasterko, V. P., Jevtic, M. R. and Mirilov, J. M. 2007. Occurrence of *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in some retail food products in Novi Sad. Cent. Eur. J. Public Health 15: 167-171.
- Troxler, R., von Graevenitz, A., Funke, G., Wiedemann, B. and Stock, I. 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. Clin. Microbiol. Infect. 6: 525-535.
- USDA. 2002. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples, revision 03, April 29, 2002. In: Microbiology Laboratory Guidebook (on line). Available in: <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgbook.htm>, MLG 8.03 pp. 1-20 (1 February, 2006).
- U. S. Food and Drug Administration, the Food Safety and Inspection Service. 2001. Draft assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready - to- eat foods. Available at: <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisk.html>. Accessed 22 March 2006.
- U. S. Food and Drug Administration, Food Safety and Inspection Services. 2003. Interpretative summary: quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Food Safety and Inspection Services, 2003; U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C.
- Unnerstad, H., Bannerman, E., Belle, J., Danielsson-Tham, M. L., Waak, E. and Tham, W. 1996. Prolonged contamination of a dairy with *Listeria monocytogenes*. Neth. Milk Dairy J. 50: 493-499.
- Uytendaele, M., De Troy, P. and Debeuere, J. 1999. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. Int. J. Food Microbiol. 53: 75-80.
- Van der Kelen, D. and Lindsay, J. A. 1990. Differential hemolytic response of *Listeria monocytogenes* strains on various blood agars. J. Food Safety 11: 9-12.

- Vanechoutte, M., Boerlinl, P., Tichy, H. V., Bannerman, E., Jager, B. and Bille, J. 1998. Comparison of PCR-based DNA fingerprinting techniques for the identification of *Listeria* species and their use for atypical isolates Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 127-139.
- Vasut, R. G. and Robeci, M. D. 2009. Identification of *Listeria monocytogenes* in food using immunoenzymatic methods. Luc. Stiin. Med. Vet. XLII: 321-324.
- Vazquez Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez Zorn, B., Wehland, J. and Kreft, J. 2001. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. Clin. Microbiol. Rev. 14: 584-640.
- Volokhov, D. V., Duperrier, S., Neverov, A. A. and Geogre, J. 2007. Presence of internalin AB and LIPI-1 gene clusters in atypical *Listeria innocua* strains suggests descent from a common ancestor of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* species. 16<sup>th</sup> International Symposium on problems of listeriosis. Savannah, Georgia, USA, March, 20-23, 2007.
- Vorst, K. L., Todd, E. C. D. and Ryser, E. T. 2006a. Transfer of *Listeria monocytogenes* during slicing of turkey breast, bologna, and salami with simulated kitchen knives. J. Food Prot. 69: 2939-2946.
- Vorst, K. L., Todd, E. C. D. and Ryser, E. T. 2006b. Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical. slicing of turkey breast, bologna, and salami. J. Food Prot. 69: 619-626.
- Wadsworth, S. J. and Goldfine, H. 2002. Mobilization of protein kinase C in macrophages induced by *Listeria monocytogenes* affects its internalization and escape from the phagosome. Infect. Immun. 70: 4650-4660.
- Wang, C. and Hong, C. 1999. Quantitative PCR for *Listeria monocytogenes* with colorimetric detection. J. Food Prot. 62: 35-39.
- Wang, R. F., Cao, W. W. and Johnson, M. G. 1992. 16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. Appl. Environ. Microbiol. 58: 727-736.
- Ward, T. J., Ducey, T. F., Usgaard, T., Dunn, K. A. and Bielawski, J. P. 2008. Multilocus genotyping assay for single nucleotide polymorphism based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 7629-7642.
- Watkins, J. and Sleath, K. P. 1981. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. J. Appl. Bacteriol. 50: 1-9.
- Weis, J. and Seeliger, H. P. 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. 30: 29-32.
- Welshimer, H. J. and Donker Voet, J. 1971. *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. 21: 516-519.

- Welshimer, H. J. and Meredith, A. L. 1971. *Listeria murrayi*: A nitrate-reducing mannitol-fermenting *Listeria*. Int. J. Syst. Bacteriol. 21: 3-7.
- Wernars, K., Heuvelman, C. J., Chakraborty, T. and Notermans, S. 1991. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. J. Appl. Bacteriol. 70: 121-126.
- Wernars, K., Boerlin, P., Audurier, A., Russell, E. G., Curtis, G. D. W., Herman, L. and van der Mee-Marquet, N. 1996. The WHO multicenter study on *Listeria monocytogenes* subtyping: random amplification of polymorphic DNA (RAPD). Int. J. Food Microbiol. 32: 325-341.
- Wesley, I. V. 1999. Listeriosis in animals, p. 39-73. In E. T. Ryser and E. H. Marth (ed.), *Listeria listeriosis and food safety*, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Wiedmann, M., Bruce, J. L., Knorr, R., Bodis, M., Cole, E. M., McDowel, C. I., McDonough, P. and Batt, C. A. 1996. Rybotype diversity of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of listeriosis in ruminants. J. Clin. Microbiol. 34: 1086-1090.
- Wilkinson, B. J. and Jones, D. 1997. A numerical taxonomic survey of *Listeria* and related bacteria, J. Gen. Microbiol. 98: 399-421.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535.
- Wood, S., Maroushek, N. and Czuprinski, C. J. 1993. Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. Infect. Immun. 61: 3068-3072.
- Wuebscher, M. D., Kohler, S., Bubert, A., Gerike, U. and Goebel, W. 1993. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. J. Bacteriol. 175: 3491-3501.
- Yan, Z., Todd, E. C. D. and Ryser, E. T. 2007. Impact of product temperature on quantitative transfer of *Listeria monocytogenes* during commercial slicing of deli ham. Abst. Ann. Mtg. Int. Assoc. Food Protect. Lake Buena Vista, Florida.
- Yoshida, T., Sugumoto, T., Sato, M. and Hirai, K. 2000. Incidence of *Listeria monocytogenes* in wild animals in Japan. J. Vet. Med. Sci. 62: 673-675.
- Yoshikawa, H., Kawamura, I., Fujita, M., Tsukada, H., Arakawa, M. and Mitsuyama, M. 1993. Membrane damage and interleukin-1 production in murine macrophages exposed to listeriolysin O. Infect. Immun. 61: 1334-1339.
- Žlender, B. and Gašperin, L. 2004. Tradicionalni postupci u preradi mesa i mogućnost njihove primene u savremenim industrijskim tehnologijama, Tehnologija mesa 45: 81-88.



PRILOG A: Rezultati mikrobioloških analiza u toku prvog, drugog i trećeg uzorkovanja

Šifra uzorka	Lokacija	Područje uzorkovanja	prvo	drugo	treće
U1	<b>Prostorija za prijem robe</b>				
U1-01	<i>Granica između spoljašnje sredine i prijema</i>				
U1-01-1		pločice			
U1-01-2		rešetka			
U1-01-3		donja ivica vrata			
U1-02	<i>Vitrina za mlečne proizvode</i>				
U1-02-1		donja ivica vrata			
U1-02-2		zadnji nivo			
U1-02-3		žljeb sa strane			
U1-03	<i>Kolica za transport</i>				
U1-03-1		radna površina			
U1-03-2		točkić 1			
U1-03-3		točkić 2			
U2	<b>Prostorija za skladištenje sirovina</b>				
U2-01	<i>Komore za hlađenje</i>				
U2-01-1		donja ivica komore 1			
U2-01-2		donja ivica komore 2		<i>L. mono</i>	
U2-02	<i>Komore za hlađenje</i>				
U2-02-1		pod komore 1			
U2-02-2		pod komore 2	<i>L. welshimeri 96.8%</i>		
U2-03	<i>Komore za zamrzavanje</i>				
U2-03-1		donja ivica komore 1			
U2-03-2		donja ivica komore 2			
U2-04	<i>Komore za zamrzavanje</i>				
U2-04-1		pod komore 1			
U2-04-2		pod komore 2			
U2-05	<i>Podovi</i>				
U2-05-1		pod			<i>L. welshimeri 65.7%</i>
U2-06	<i>Pod u hodniku</i>				
U2-06-1		pločice			
U2-06-2		ugao zida			<i>L. innocua 99.6%</i>
U2-07	<i>Podovi</i>				
U2-07-1		pod lifta			
U2-08	<i>Opciono</i>				
U2-08-1		slivnik		<i>L. mono</i>	<i>L. welshimeri 65.7%</i>
U2-08-2		stepenište			
U3	<b>Prostorija za pripremu hrane-kuhinja</b>				
U3-01	<i>Lavabo za razleđivanje mesa</i>				
U3-01-1		zid			
U3-01-2		slivnik	<i>L. welshimeri 99.9%</i>		<i>L. mono</i>
U3-01-3		radna površina			
U3-02	<i>Lavabo za pranje</i>				
U3-02-1		zid			
U3-02-2		slivnik			
U3-02-3		radna površina			
U3-03	<i>Daske za sečenje</i>				
U3-03-1		daska za meso			
U3-03-2		daska za hleb	<i>L. mono 98.6%</i>		
U3-03-3		panj za meso			
U3-04	<i>Noževi, satare, alat</i>				
U3-04-1		nož za meso			
U3-04-2		otvarač za konzerve			
U3-04-3		cediljka			
U3-05	<i>Slivnici na podovima</i>				
U3-05-1		slivnik na podu 1		<i>L. innocua</i>	
U3-05-2		slivnik na podu 2	<i>L. innocua 99.6%</i>	<i>L. mono</i>	<i>L. welshimeri 65.7%</i>
U3-06	<i>Pločice</i>				
U3-06-1		podne pločice			
U3-07	<i>Komora za hlađenje</i>				
U3-07-1		donja ivica komore			
U3-08	<i>Komora za hlađenje</i>				
U3-08-1		pod komore			
U3-08-2		pod komore		<i>L. mono</i>	
U3-09	<i>Uređaj za narezivanje</i>				
U3-09-1		Oblast nagomilavanja uzorka			
U3-09-2		Prednji štiti			
U3-09-3		Zadnja ploča (naslon)			
U3-10	<i>Mašina za mlevenje</i>				
U3-10-1		unutrašnjost mašine za mlevenje			
U3-11	<i>Opciono</i>				
U3-11-1		lavabo u kuhinji			
U3-11-2		zadnji štiti mašine za narezivanje		<i>L. mono</i>	

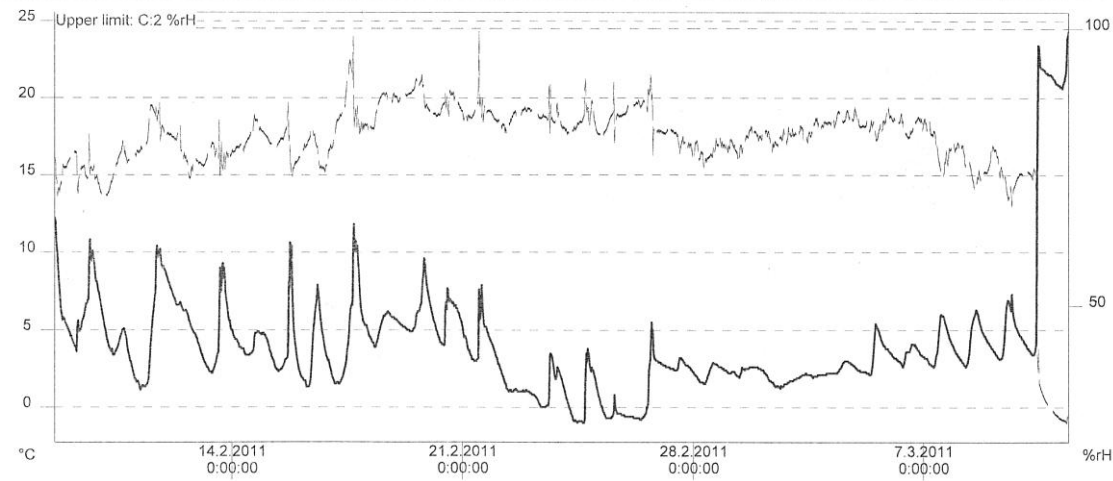
*L. mono* – *L. monocytogenes*

PRILOG B: Promena temperature i relativne vlažnosti ambijenta tokom zrenja kobasice u domaćinstvu/industriji

0 - 30.

Milos - pusnica	Conditions	19.9.2011 8:55:38		Page 1
Starting time: 8.2.2011 15:28:00		Min:	Max:	Mean:
Finishing time: 11.3.2011 9:58:00	C:1 °C	-1.00	24.00	4.12
Channels: 2 (2)	C:2 %rH	29.00	99.40	79.15
Values: 1478				
36607398				
Accuracy		+/- 0.5 [-20..+70] °C		
		+/- 3 [2..98] %rH		

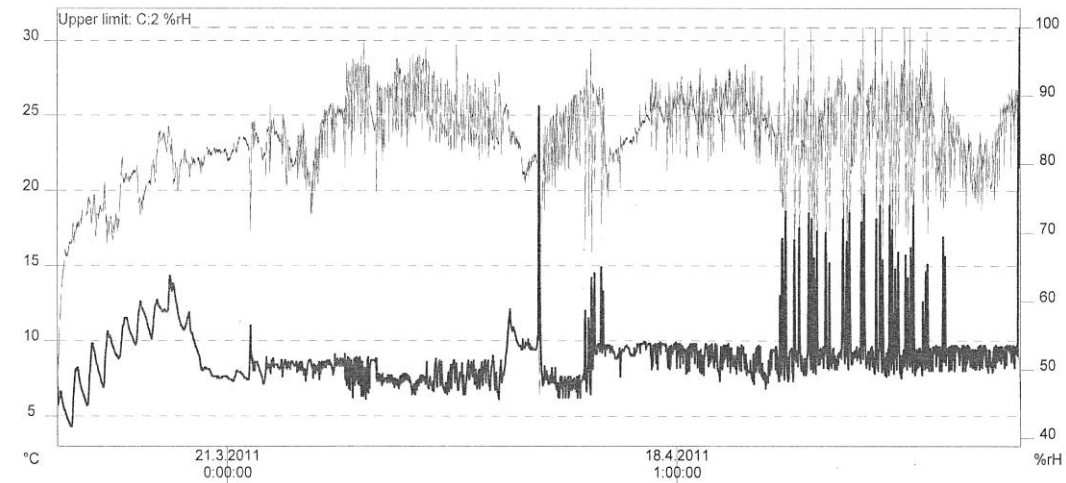
08.02.2011.



30 - 90.

log 2 Petrovac	Conditions	19.9.2011 8:58:32		Page 1
Starting time: 10.3.2011 10:47:00		Min:	Max:	Mean:
Finishing time: 9.5.2011 12:17:00	C:1 °C	4.30	30.80	8.94
Channels: 2 (2)	C:2 %rH	41.70	99.90	83.40
Values: 2882				
36606095				
Accuracy		+/- 0.5 [-20..+70] °C		
		+/- 3 [2..98] %rH		

10.03.2011.

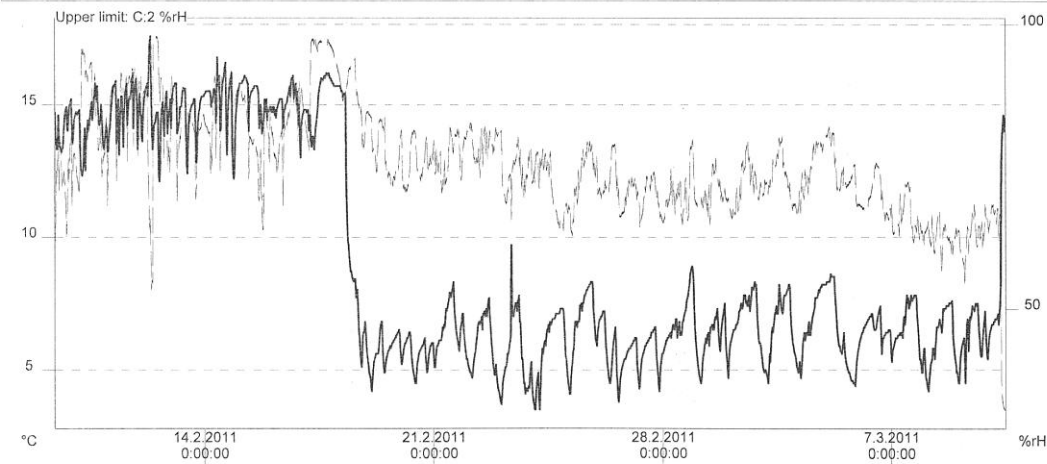


0 - 30.

0 - 30.

Topola-loger1	Conditions	19.9.2011 8:57:10		Page 1
Starting time: 9.2.2011 10:33:00		Min:	Max:	Mean:
Finishing time: 10.3.2011 12:03:00	C:1 °C	3.50	17.60	8.95
Channels: 2 (2)	C:2 %rH	32.50	97.90	75.66
Values: 1396				
36505886				
Accuracy		+/- 0.5 [-20..+70] °C		
		+/- 3 [2..98] %rH		

09.02.2011.

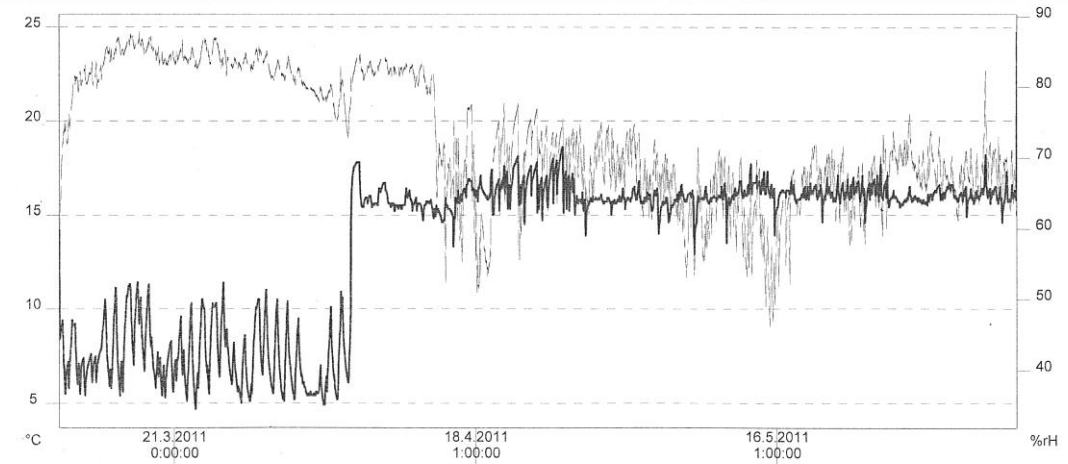


30 - 120.

30 - 120.

Topola-loger2	Conditions	19.9.2011 9:01:07		Page 1
Starting time: 10.3.2011 8:47:00		Min:	Max:	Mean:
Finishing time: 7.6.2011 9:47:00	C:1 °C	4.70	18.60	13.46
Channels: 2 (2)	C:2 %rH	34.60	87.70	72.80
Values: 4273				
36605891				
Accuracy		+/- 0.5 [-20..+70] °C		
		+/- 3 [2..98] %rH		

10.03.2011.



## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Brankica Z. Lakićević je rođena 6. novembra 1976. godine u Beogradu. Osnovnu školu i Medicinsku školu završila je u Beogradu. Godine 1995. upisala je Biološki fakultet, smer Molekularna biologija i fiziologija i diplomirala 2003. godine sa prosečnom ocenom 9.09. Upisala je poslediplomske studije 2004. godine na Biološkom fakultetu, smer Molekularna genetika i genetičko inženjerstvo. Magistarski rad pod nazivom „Molekularno epidemiološka analiza prisustva bakterije *Listeria monocytogenes* u procesu pripreme hrane“, odbranila je 2008. godine na Biološkom fakultetu u Beogradu. Od 2004. godine zaposlena je u Institutu za higijenu i tehnologiju mesa u Odeljenju za mikrobiološka i imunoenzimska ispitivanja.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Ванкица Лошковић

број индекса \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Примена класичних молекуларно-генетских и имунохемијских метода и техника, селекција и карактеризација бактерија из рода Listeria.

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 07. 05. 2018.

Ванкица Лошковић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бранкица Лакселић

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада Примера класичног, суперкласичног и неинвољутивног латина у докторској  
тези, карактеристични примери из рада Лотарија

Ментор PROF. DR. OLIVERA BUNČIĆ

Потписани/а Бранкица Лакселић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 05. 06. 2012.

Бранкица Лакселић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Примена Класичних, молекуларно-биолошких и имунолошких метода у изолацији, детекцији и карактеризацији бактерија из рода *Listeria*.

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 07.06.2022.

Ванкица Јанковић

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.