

ИЗВЕШТАЈА О НАУЧНОЈ ЗАСНОВАНОСТИ ТЕМЕ И ПОДОБНОСТИ КАНДИДАТА ЗА
ИЗРАДУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ
THE EVALUATION REPORT OF CANDIDATE AND SCIENTIFIC THESES SUBMITTED FOR
DOCTORAL DEGREE

I. ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
II. APPOINTMENT OF EVALUATION COMMITTEE
1. Датум и назив органа који је именовао комисију: 125. седница Наставно научног већа Факултета ветеринарске медицине одржана 21.12.2011. године Date and name of the institution that appointed committee 125. Session of The teaching and scientific board of Faculty of Veterinary Medicine attended on December 21st 2011. 2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, године избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен: Members of the committee with full names, titles, research area, year of the appointment to a current position, name of the institution 1. др Вера Катић, редовни професор, Хигијена и технологија млека, 1996. године, Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине dr. Vera Katic, Professor, Hygiene and technology of milk, 1996. Belgrade University, Faculty of Veterinary medicine 2. dr. Sophia Kathariou, Professor, Food Science and Microbiology, 2000., Department of Food Science, Graduate Program in Genomic Sciences, and Department of Microbiology, North Carolina State University, Raleigh, N. Carolina 3. др Душан Мишић, доцент, Микробиологија, 2010. године, Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине. Dr. Dusan Misic, Associate professor, Microbiology, 2010., Belgrade University, Faculty of Veterinary medicine
III. ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
INFORMATION ABOUT CANDIDATE
Име, име једног родитеља, презиме: Мира, Љубивоје, Ракић - Мартинез First name, fathers name, last name: Mira, Ljubivoje, Rakic – Martinez 1. Датум и место рођења, општина, Република: 30.08.1972., Ужице, Србија 2. Date of birth, city, state: 08.30.1972., Uzice, Serbia 3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе*: 4. Place, title and date of defense of Magister tesis*: 5. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*: Scientific area of Magister thesis

6. Приказ научних и стручних радова са оценом:

List of scientific and expert articles with evaluation:

1. **Ракић- Мартинез М. i V. Katic** 2009. Испитивање могућности примене препарата на бази хлор-диоксида за дезинфекцију у погонима за прераду млека. Ветеринарски гласник, 1-2: 87-101, ISSN 0350-2457.

Rakic – Martinez M., and V. Katic. 2009. Evaluation for the possible use of the disinfectant based on chlorine dioxide in dairy plant. Veterinary Journal 63 (1-2):87-101.

2. **Rakic – Martinez, M., D. Drevets, V. Dutta, V. Katic, and S. Kathariou.** 2011. *Listeria monocytogenes* strains selected on ciprofloxacin or the disinfectant benzalkonium chloride exhibit reduced susceptibility to ciprofloxacin, gentamicin, benzalkonium chloride and other toxic compounds. Appl. Environ. Microbiol. doi: 10.1128/AEM.05941-11. Prihvaćen za štampu 07.10.2011.

Мира Ракић- Мартинез је објавила два научна рада из области из које пријављује дисертацију. Рад под редним бројем 2 је прихваћен за штампу у међународном часопису.

Mira Rakic- Martinez published two scientific articles in research area of dissertation. Article under number 2. is accepted for print in international journal.

IV. ОБРАЗЛОЖЕНИ КРИТЕРИЈУМИ И РАЗЛОЗИ НА ОСНОВУ КОЈИХ СЕ ЗАСНИВА ПОЗИТИВНА ОЦЕНА ДА ЈЕ КАНДИДАТ ПОДОБАН ДА РАДИ ДИСЕРТАЦИЈУ
EXPLANATION OF THE CRITERIA AND REASONS FOR THE POSITIVE EVALUATION OF THE DOCTORAL CANDIDATE

Мира Ракић-Мартинез ради као истраживач сарадник на Department of Food, Bioprocessing and Nutrition Sciences, North Carolina State University. Научно истраживачка делатност Мире Ракић-Мартинез је усмерена на проучавање осетљивости *L. monocytogenes* на антимикробна средства и, из те области је у сарадњи са другим ауторима публиковала рад у међународном часопису, који представља добру основу за даље истраживање и квалификују Миру Ракић-Мартинез за израду ове докторске дисертације.

Mira Rakic Martinez works as research assistant at the Department of Food, Bioprocessing and Nutrition Sciences, North Carolina State University. She is primarily interested in the study of antimicrobial resistance of *L. monocytogenes*. In cooperation with other authors she published article in international journal, which presents good bases for further research and qualifies Mira Rakic- Martinez as doctoral candidate.

V. ОЦЕНА ПОДОБНОСТИ ПРЕДЛОЖЕНОГ МЕНТОРА

Предложени ментор, др Вера Катић је у звање редовног професора изабрана 1996. године. Као аутор или коаутор до сада је објавила 193 научна и стручна рада из области хигијене и технологије млека. Више радова је из микробиологије млека и производа од млека. До сада је руководила израдом три докторске дисертације, 4 магистарске тезе и више специјалистичких радова. Учествовала је у комисијама за одбрану магистарских радова и докторских дисертација на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду и Факултету ветеринарске медицине у Скопљу. Учествује у реализацији пројеката које финансира Министарство за науку и технологију Републике Србије.

Списак радова др Вере Катић који је квалификују да буде ментор при изради докторске дисертације:

EVALUATION OF THE SUGGESTED MENTOR

Suggested mentor, dr. Vera Katic is Professor since 1996. As author or coauthor she published 193 scientific and expert articles regarding issues in microbiology of milk and dairy products. Three doctoral dissertations, four magister thesis and number of specialist titles were obtained under her mentorship. Dr. Katic has been member of committees for magister and doctoral degrees at Faculty of Agriculture, Belgrade University and Faculty of Veterinary Medicine in Skopje, Macedonia. She is participating in the projects funded by the Department of science and technology of the Government of the Republic of Serbia.

List of publications that qualifies dr. Vera Katic as a mentor for doctoral dissertation:

1. Collins M. D, Farrow J.A.E, **Katić Vera**, Kandler O, 1984, Taxonomic Studies on Streptococci of Serological groups E.P.U and V: Description of *Streptococcus porcinus* sp. nov. System. App. Microbiol. (5) 402-413.
2. **Katić Vera**, Stojanović L, 1992, The occurrence of *Listeria monocytogenes* in goat and sheep milk. Acta veterinaria. 215-221.
3. **Katić Vera**, 1995, The survival of *Listeria monocytogenes* in white brined cheese. Acta veterinaria. 31-36.
4. **Katić Vera**, Radenkov Silvana, 1998, The fate of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized milk. Acta veterinaria. No 5-6, 345-350.
5. **Katić Vera**, Stojanović L. 2004, The effect of salt concentration and pH on the survival and growth of *E. coli* O157:H7 in white cheese and trypticase soy broth. Acta veterinaria, Vol. 53, No 5-6, 411-418.
6. Petković Jelena, Knut R, Bunčić Olivera, **Katić Vera**, Lepšanović Zorica, 2009, Multilocus Sequence Typing for Investigation of Diversity of *Campylobacter jejuni* strains from humans and Environment in Norway. Acta Vet. Hung. 57 (1) 1-11. ISSN broj 0236-6290.
7. Radovanovic RS and **Katic V**, 2009, Influence of lactic acid bacteria isolates on *Staphylococcus aureus* growth in skimmed milk. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 15 (No 3), 196-203. *Agricultural Academy*.

Будући да ће се део истраживања радити на North Carolina State University, The Department of Food, Bioprocessing and Nutrition Sciences под руководством dr Sophia Kathariou дајемо и списак публикација који dr Sophia Kathariou квалификују да буде коментор при изради ове дисертације.

Research will be partially conducted at the North Carolina State University, The Department of Food, Bioprocessing and Nutrition Sciences under the guidance of dr. Sophia Kathariou. Presented is a list of publications that qualifies dr. Kathariou as a komentor for this dissertation:

1. Lee, S., T.J. Ward, L.M. Graves, L.A. Wolf, K. Sperry, R. M. Siletzky, and **S. Kathariou**. 2011. Characterization of Atypical *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Strains Harboring a Lineage II-Specific Gene Cassette. Appl Environ Microbiol. 2011 Dec 2. [Epub ahead of print].
2. Elhanafi, D., V. Dutta V, and **S. Kathariou**. 2010. Genetic characterization of plasmid-associated benzalkonium chloride resistance determinants in a *Listeria monocytogenes* strain from the 1998-1999 outbreak. Appl Environ Microbiol. 2010 Dec;76(24):8231-8. Epub 2010 Oct 22.
3. Mullapudi, S., R. M. Siletzky, and **S. Kathariou**. 2009. Diverse cadmium resistance determinants in *Listeria monocytogenes* from the environment of turkey processing plants. Appl Environ Microbiol. Nov 30, 2009. [Epub ahead of print]
4. Pan, Y, F. Breidt, Jr, and **S. Kathariou**. 2009. Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed culture biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 75:5846-5852.
5. Kim, J. W., and **S. Kathariou**. 2009. Temperature-dependent phage resistance of *Listeria monocytogenes* epidemic clone II. Appl. Environ. Microbiol. 75:2433-2438.
6. Azizoglu, R. O., J. Osborne, S. Wilson, and **S. Kathariou**. 2009. Role of growth temperature on freeze-thaw tolerance of *Listeria* spp. Appl. Environ. Microbiol. 75:5315-5320.
7. Faith, N., **S. Kathariou**, Cheng, Y., Promadej, N., Neudeck, B. L. , Zhang, Q., Luchansky, J., Czuprynski, C. 2008. The role of *Listeria monocytogenes* serotype 4b *gtcA* in gastrointestinal listeriosis in A/J mice. Foodborne Pathog Dis. 6:39-48.
8. Kim, J. W., Siletzky, R. M., **Kathariou, S.** 2008. Host ranges of *Listeria*-specific bacteriophages from the turkey processing plant environment in the United States. Appl Environ. Microbiol. 74:6623-6630.
9. Mullapudi, S., R. M. Siletzky, and **S. Kathariou**. 2008. Heavy metal and benzalkonium chloride resistance of *Listeria monocytogenes* from the environment of turkey processing plants. Appl. Environ. Microbiol. 74:1464-1468.
10. Sperry, K. E. , **S. Kathariou**, J. S. Edwards, and L. A. Wolf. 2008. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis as a tool for subtyping *Listeria monocytogenes* strains. J. Clin. Microbiol. 46:1435-1450.
11. Cheng, Y., N. Promadej, J. W. Kim, and **S. Kathariou**. 2008. Teichoic acid glycosylation mediated by *gtcA* is required for phage adsorption and susceptibility of *Listeria monocytogenes* serotype 4b. Appl. Environ. Microbiol. 74:1653-1655.

VI. ОЦЕНА ПОДОБНОСТИ ТЕМЕ:

EVALUATION OF THE SCIENTIFIC SIGNIFICANCE OF THE THESIS:

1. Наслов дисертације

Испитивање механизма резистенције и могуће унакрсне резистенције *L.monocytogenes* након адаптације на различита антимикробна средства.

1. Title of dissertation

Identification of the mechanisms of resistance and potential cross resistance upon *L. monocytogenes* adaptation to different antimicrobials.

2. Предмет истраживања

Употреба антимикробних средстава у третману животиња и људи може да доведе до селекције резистентних бактеријских популација. Код животиња које се гаје за производњу хране, антимикробна средства се користе за контролу и лечење инфективних болести бактеријског порекла као и за промоцију раста (32), осим антибиотика који се користе за лечење људи, а у Европској унији су забрањени за лечење животиња намењених за производњу хране. Резултат интензивне употребе антимикробних средстава је потенцијални развој резистентних патогених микроорганизама и последично преношење тих микроорганизама на људе путем хране(12). Додатно, спонтане мутације микроорганизама или ширење резистентних бактерија у недостатку селективног притиска такође могу да допринесу њиховом налазу у храни (13). Забрињавајуће су промене фенотипа у смислу развоја резистенције, које су утврђене код великог броја врста бактерија, укључујући и *L. monocytogenes* (39).

The use of antimicrobials in both animals and humans can select for resistant bacterial populations. In

food animals, antimicrobials are used for the control and treatment of bacteria associated infectious diseases as well as for growth promotion purposes (32), apart from the European Union (EU) ban of certain antibiotics that are used, or related to those used, in human medicine (15). An undesired consequence of antimicrobial use is the potential development of antimicrobial-resistant foodborne bacterial pathogens and subsequent transmission to humans as food contaminants (12). In addition, spontaneous mutation in foodborne bacteria or the spread of resistant bacteria in the absence of selective pressure may also contribute to the antimicrobial resistance burden in food (13). In fact, emerging antimicrobial resistance phenotypes have been recognized among multiple pathogens including *Listeria monocytogenes* (39).

3. Подаци из изабране литературе

L. monocytogenes значајан микроорганизам који се преноси храном, изолован је из различитих производа. Од када је пријављен први случај листериозе, настале после конзумирања хране контаминираних *L. monocytogenes* 1981. године (38), забележене су бројне епидемије листериозе у свету (9; 16). Овај патогени микроорганизам има способност да се колонизује у околини и на опреми у погонима за производњу хране, задржавајући се понекада и годинама (7; 24). Месо, живина, млеко и производи од млека, као и поврће регистровани су као извор листериозе (1; 17). Иако су случајеви листериозе ретки, *L. monocytogenes* остаје водећи узрочник озбиљних обољења са смртним исходом изазваних патогенима преносивим храном у САД (37). Овај патогени микроорганизам додатно изазива читав низ секундарних обољења као што су побачаји, менингитис или септикемија. Посебно су ризику од обољевања изложене труднице, старије особе, пацијенти са канцерозним обољењима, као и пацијенти на хемотерапији или имunosупресивним третманима (10; 30).

О значају *L. monocytogenes*, као узрочника болести преносивих храном, говори и последња епидемија забележена у Сједињеним Америчким Државама настала после конзумирањем диња, а у којој су у време писања овог предлога евидентиране 133 оболеле особе од којих је 28 умрло. Епидемија је захватила 20 држава и постоји бојазан да још увек није достигла врхунац (4).

L. monocytogenes је обично отпорна на широки спектар антибиотика (18), али након прве изолације мултирезистентног соја у Француској 1988. године (33), изоловани су из хране, окружења и спорадичних случајева пацијената оболелих од листериозе и други сојеви отпорни на један или више антибиотика, (36; 42). Тренутно, терапија избора за листериозу су антибиотици из класе β -лактама (пеницилин или ампицилин), појединачно или у комбинацији са аминогликозидима (нпр. гентамицин) у случају пацијената са ослабљеним имуним статусом (19). Клинички изолати *L. monocytogenes* генерално су још увек осетљиви на наведене антибиотике (18; 29).

Поред изложености антибиотикима, *L. monocytogenes* је изложена селективном притиску изазваном редовном употребом дезинфицијенаса као што су, на пример, кватернерна амонијумова једињења, а који се користе у објектима за прераду хране и у здравственим установама. У литератури нема довољно информација о развоју унакрсне резистенције након излагања *L. monocytogenes* антибиотикима из групе флуорокинолона какав је ципрофлоксацин и дезинфицијенсима као што је кватернерно амонијумово једињење безалконијум хлорид (БЦ), које се интензивно користи у прехранбеној индустрији (27; 28).

Иако су у храни, већина бактерија резистентних на антибиотике, сапрофити или коменсали из окружења, њихови гени одговорни за резистенцију могу се преносити, мобилним генетским елементима какви су транспозони или плазмиди (33), на друге бактерије преносиве храном, укључујући и *L. monocytogenes* (31). Најчешћи извори гена одговорних за резистенцију у случају *L. monocytogenes* су бактерије из родова *Enterococcus* и *Streptococcus* (2; 35). Међутим, постоје и други извори гена одговорних за резистенцију, обзиром да такви гени често флукутирају између грам позитивних и грам негативних бактерија захваљујући процесу коњугације (6). Овај процес може проузроковати нежељене клиничке последице за домаћина и ширу популацију који долазе у контакт са патогеним бактеријама резистентним на антибиотике. Настанак и ширење отпорности на антибиотике код *L. monocytogenes* може да има значајне клиничке импликације у лечењу листериозе.

Присуство мултирезистентних (*MDR*) сојева *L. monocytogenes* отпорних на већи број антибиотика у објектима за прераду хране и здравственим установама има вишеструке импликације.

Мултирезистентни сојеви са редукованом осетљивошћу на антибиотике који се користе у терапији листериозе могу да доведу до пораста морталитета и морбидитета код пацијената са овим обољењем. Друга и веома важна импликација је у скоро представљеним доказима да експресија *MDR* транспортера индукује урођени имунитет (8; 40).

Отпорност *L. monocytogenes* на одређене антибиотике може се делимично развити као последица присуства гена који кодирају ефлукс пумпе одговорне за мултирезистенцију (*MDR*). Присуство *MDR* пумпи у различитим организмима од бактерија до људи, указује на њихову изузетну важност. Иако

су примарна функција и механизам деловања за већину *MDR* пумпи недовољно разјашњени, познато је да ови протеини активно транспортују токсичне материје изван ћелије. Ефлуks пумпе специфичне за антибиотике често су кодиране на преносивим плазмидима и транспозонима у бактерији. Већина ефлуks пумпи је, међутим, кодирана на бактеријским хромозомима (25). У великом броју бактерија *MDR* пумпе су назначене као вазни чиниоци у развоју мултирезистенције (14; 20; 22; 26).

Преживљавање бактерија у нестабилним условима средине захтева широк спектар брзих адаптивних одговора које иницирају регулаторни протеини. Ови регулатори одговарају на ћелијске сигнале из околине који усклађују транскрипцију, транслацију или неки други вид експресије гена, како би физиолошки одговор био одговарајуће модификован. У већини случајева, адаптивни одговори су посредовани транскрипционим регулаторима. Фамилија *TetR* је фамилија транскрипционих регулатора широко заступљена и добро представљена међу бактеријама (34). Ови регулатори контролишу гене који су одговорни за мултирезистенцију, ензиме у различитим катаболичким процесима, биосинтезу антибиотика, осмотски стрес и патогеност грам-негативних и грам-позитивних бактерија.

Literature review:

L. monocytogenes is an important foodborne pathogen and has been isolated from a variety of food products. Since foodborne listeriosis was first reported in 1981 (38), numerous foodborne outbreaks of *L. monocytogenes* have been documented worldwide (9; 16). This pathogen has great ability to colonize the environment and equipment in food processing plants, often for years (7; 24).

Meat, poultry, dairy, and vegetable products have all been implicated as vehicles of listeriosis (1; 17). Although cases of listeriosis are rare, *L. monocytogenes* remains a leading cause of severe illness and death due to foodborne disease in the United States (37). The pathogen also causes a wide range of secondary conditions such as abortion, meningitis, and septicemia. Populations at special risk include pregnant women, the elderly, patients with cancer and those undergoing chemotherapy or other immunosuppressive treatments (10; 30).

Virulence of *L. monocytogenes* was underlined by the recent outbreak in the USA, linked to cantaloupes that at the time of this writing resulted in 133 cases and 28 deaths spread over 20 states and the outbreak may not have yet reached its peak (4).

L. monocytogenes is usually susceptible to a wide range of antibiotics (18), but since the first isolation of a multiresistant strain in France in 1988 (33), other strains resistant to one or more antibiotics have been recovered from food, environment and from sporadic cases of human listeriosis (36; 42). Currently, the treatment of choice for listeriosis is a β -lactam antibiotic (e.g. penicillin or ampicillin), alone or in combination with an aminoglycoside (e.g. gentamicin) in case of immunocompromised patients (19). and clinical isolates of *L. monocytogenes* generally remain susceptible to these antibiotics (18; 29). In addition to antibiotic-related exposures, *L. monocytogenes* is expected to be frequently subjected to selection pressures associated with the extensive use of disinfectants such as quaternary ammonium compounds in food processing plants and healthcare settings. Limited information is currently available on possible cross-resistance following exposure to antibiotics such as ciprofloxacin and disinfectants such as the quaternary ammonium compound benzalkonium chloride (BC), extensively used in the food processing industry (27; 28).

While many antibiotic-resistant bacteria in foods are currently saprophytic or commensal in habit, their resistance genes can be transferred, through movable genetic elements such as transposons and plasmids (33), to other food-borne bacteria, including *L. monocytogenes* within the gastrointestinal tract (31). The common sources of resistance genes for *L. monocytogenes* appear to be enterococci and streptococci (2; 35). However, resistance genes could also come from other sources since such genes often flux among Gram-positive and Gram-negative bacteria through conjugative mobilization (6). This process may have undesirable clinical implications for the host and for the wider population coming into contact with derived antibiotic resistant pathogens. Emergence and dissemination of antibiotic resistance in *L. monocytogenes* may have significant future clinical implications for the treatment of listeriosis.

Presence of multidrug resistant (MDR) strains of *L. monocytogenes* in the food processing plants or in healthcare settings has various implications. MDR strains with reduced susceptibility to antibiotics used for treatment of listeriosis would cause higher mortality and morbidity on humans with this disease. Second and very important implication is in the recently presented evidence that expression of MDR transporters induces the innate immune response through a novel cytosolic surveillance pathway (8; 40).

The intrinsic resistance of *L. monocytogenes* to certain antimicrobials may be partially due to genes that encode multidrug resistance efflux pumps (MDRs). MDRs are found in a variety of organisms ranging from bacteria to humans, suggesting their universal importance. Although the primary functions and mechanisms of action for most MDRs remain unclear, these proteins are known to actively transport toxic compounds out of the cell. Antibiotic specific efflux pumps are often encoded on transmissible plasmids

and transposons in bacteria. However, most genes for MDRs are encoded on the bacterial chromosome (25). In a number of other bacteria, MDRs have also been implicated as important contributors to multidrug resistance (14; 20; 22; 26).

Survival of bacteria in unstable environment requires a wide range of rapid, adaptive responses which are triggered by regulatory proteins. These regulators respond to specific environmental and cellular signals that modulate transcription, translation, or some other event in gene expression, so that the physiological responses are modified appropriately. In most cases, the adaptive responses are mediated by transcriptional regulators. TetR family, a family of transcriptional regulators that is well represented and widely distributed among bacteria (34) These proteins control genes whose products are involved in multidrug resistance, enzymes implicated in different catabolic pathways, biosynthesis of antibiotics, osmotic stress, and pathogenicity of gram-negative and gram-positive bacteria.

4. Циљеви истраживања

Циљ предложене дисертације је да се утврде генетски механизми антимикробне резистенције у одабраним сојевима *L. monocytogenes* изолованим у епидемијама листериозе из хране и клиничког материјала.

Петпоставка је да излагање *L. monocytogenes* дејству дезинфицијенаса који се најчешће користе у објектима за производњу хране или дејству антибиотика који се користе у хуманој и ветеринарској медицини доводи до селекције мутираних, мултирезистентних сојева. Предпоставља се да би различити генетски механизми могли да буду узрок поменутих мутација са могућим даљим променама које би се огледале у осетљивости на методе конзервисања хране, као и способности адхеренције и преживљавања на површинама сирових производа, у пастеризованом и сировом млеку, као и на површинама од нерђајућег челика.

Zadatci:

1. Идентификација механизма резистенције и могуће унакрсне резистенције након адаптације *L. monocytogenes* на одабране антибиотике и дезинфицијенсе;
2. Карактеризација *MDR* сојева изабраних након излагања различитим концентрацијама антимикробних средстава и идентификација нових *MDR* транспортера под контролом *tetR* репресора;
3. Процена фенотипских промена у осетљивости адаптираних сојева на различите методе конзервисања које се користе у производњи хране (NaCl, pH, температура, a_w , деривати етарских уља) и способности адхеренције / преживљавања на површинама сирових производа, пастеризованом у односу на сирово млеко и површинама од нерђајућег челика.

Objectives:

The present proposal aims to evaluate genetic mechanisms of antimicrobial resistance in selected *L. monocytogenes* strains involved in food outbreaks and clinical isolates.

We hypothesize that exposure of *L. monocytogenes* to disinfectants commonly used in the food processing environment or antibiotics currently used in veterinary and human therapy would select for MDR mutants with reduced susceptibility to a range of drugs. We also hypothesize that different genetic mechanisms would be involved in such mutations with possible change in susceptibility to hurdles in food processing or ability of adherence and survival on fresh produce, pasteurized vs. raw milk and stainless still surface

Tasks:

1. Identification of the mechanisms of resistance and potential cross resistance upon *L. monocytogenes* adaptation to antibiotics and disinfectants;
2. Characterization of MDR strains selected following exposure to drugs and identification of the novel MDR transporter(s) under control of *tetR* repressor;
3. The assessment of phenotypic changes in resistance to hurdles (salt, pH, temperature, a_w , essential oil derivatives) and adherence / survival on fresh produce, pasteurized vs. raw milk and stainless

5. Очекивани резултати

Очекује се да ће бити идентификовани механизми резистенције и унакрсне резистенције *L. monocytogenes* након адаптације на различитим антимикробним супстанцама. Такође се очекује идентификација новог *MDR* транспортера под контролом *tetR* репресора. Практична примена ове дисертације огледала би се у развоју нових стратегија за заштиту и превенцију контаминације хране, као и нови приступ конзервисању хране (технологije препрека) којим би се спречио пренос мултирезистентних сојева *L. monocytogenes*.

Expected results:

We expect to identify possible mechanisms of antimicrobial resistance and cross resistance in *L.*

monocytogenes upon adaptation on different antimicrobial compounds. We also expect to identify new MDR transporter(s) under *tetR* control. Practical application of this thesis would be in the development of the novel strategies for protection and prevention of food contamination as well as a new approach to the hurdle technologies, in order to avoid transfer of the MDR strains of *L. monocytogenes* to food.

6. План рада

Експерименти ће се одвијати следећим редоследом:

1. Умножавање пажљиво одабраних сојева *L. monocytogenes* (различит серотип и извор);
2. Одређивање минималне инхибиторне концентрације (MIC) дезинфицијенса и антибиотика за одабране сојеве *L. monocytogenes* ;
3. Изолација мутаната *L. monocytogenes* са повећаном или смањеном осетљивошћу на одабрана антимикробна средства;
4. Испитивање експресије MDR gena (*mdrL*, *mdrM*, *mdrT*, *lde*) у одабраним мутираним сојевима *L. monocytogenes*.
5. Конструкција колекције мутаната *Tn916* (резистенција на тетрациклине) и mariner-based транспозона.
6. Скрининг и генетска карактеризација;
7. Идентификација додатног транспортног gena под контролом репресора *tetR*;
8. Одређивање броја инсерција транспозона;
9. Одређивање места инсерције транспозона;
10. Секвенционирање;
11. Процена фенотипских промена у резистенцији на различите методе конзервисања које се користе у производњи хране (NaCl, pH, температура, a_w , деривати етарских уља) и способности адхеренције / презивљавања на површини сирових производа, у пастеризованом у односу на сирово млеко и површинама од нерђајућег челика;
12. Статистичка обрада података

6. Dissertation work plan

Experiment will be developed by the following order:

1. Growing of carefully chosen panel of *L. monocytogenes* strains;
2. Determination of MICs of disinfectant and antibiotics for selected panel of strains;
3. Isolation of mutants with increased or decreased susceptibility to selected antimicrobials;
4. Monitoring of MDR genes (*mdrL*, *mdrM*, *mdrT*, *lde*) expression in selected mutants;
5. Constructions of *Tn916* (tetracycline resistance) and mariner-based transposon library;
6. Screening and genetic characterizations;
7. Identification of the additional transporter genes under repression by *tetR*;
8. Determination of the number of transposon insertions;
9. Determination of transposon insertion sites;
10. Sequencing
11. Assessing phenotypic changes in resistance to hurdles (salt, pH, temperature, a_w , essential oils) and adherence / survival on fresh produce, pasteurized vs. raw milk and stainless still surface;
12. Statistical analyses.

7. Методе и материјал истраживања

Сојеви *L. monocytogenes* : У студији ће бити коришћени пажљиво одабрани сојеви који се разликују по извору и серотипу;

Услови раста, тестирање осетљивости и одређивање минималних инхибиторних концентрација: За раст бактерија ће бити коришћен *BHI* агар (Brain heart infusion broth са 1,5% агара); Културе ће бити инкубиране 24 сата на 37°C. Осетљивост на антимикробна средства ће бити испитивана методом разређења на Милер Хинтон агару;

Антимикробна средства: Главне класе антибиотика укључујући и оне који се користе у лечењу листериозе, као и други антибиотици који се обично користе у хуманој и ветеринарској медицини; дезинфицијенс из групе квартерених амонијумових једињења–бензалконијум хлорид (benzalkonium chloride- BC), тетрафенилфосфониум хлорид (Tetraphenylphosphonium chloride -TPP, лек против канцера, обично у употреби као MDR субстрат).

За одређивање MIC за различите конзервансе (NaCl, деривати етарских уља) биће коришћена метода разређења у агару;

Екстракција РНК и реверзна – транскрипција PCR (RT-PCR). Експресија одабраних MDR gena (*mdrL*, *mdrM*, *mdrT*, *lde*) биће процењена коришћењем RT-PCR методе (14). За PCR ће бити коришћен Takara

Ex Taq kit (Takara, Madison, WI) и T1 thermal cycler (Biometra, Goettingen, Germany) као што је описано раду Elhanafi et al. (14).

Конструкција колекције мутаната: Колекција мутаната са транспозоном *Tn916* (резистенција на тетрациклин) биће припремљена коришћењем већ описане методе (23), а колекција мутаната са mariner-based транспозонским системом са pMC38, методом описаном у раду Cao et al. (3).

Southern blots: Број инсерција транспозона за одабране мутанте ће бити утврђен *Southern blot* методом (40);

Одредјивање места инсерције транспозона: Места инсерције транспозона биће одређена арбитрарним *PCR* као што је описано у раду Cao et al. (3);

Секвенционирање: *PCR* производи ће бити секвенционирани (Genewiz, Inc., South Plainfield, NJ), и секвенце анализирани помоћу Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), Националног института за биотехнологију;

Процена фенотипских промена у резистенцији на различите методе конзервирања хране и способности адхеренције/преживљавања на површини сировог поврћа, пастеризованом и сировом млеку или површини од нерђајућег челика: Одабрани мутанти ће бити испитивани при различитим концентрацијама соли (NaCl), дериватима етарских уља, различитим температурама, pH и активности воде.

Способност преживљавања и адхеренције ће бити испитана на површинама сирових производа (диње и целер), у пастеризованом и сировом млеку, као и на површини од нерђајућег челика.

Materials and methods:

Bacterial strains: Study will employ a carefully chosen panel of diverse strains of *L. monocytogenes*. Strains will differ by serotype and source.

Growth conditions, susceptibility testing and MIC determinations: Bacteria will be grown on brain heart infusion (BHI) agar plates at 37°C for 24 h. The colonies will be tested for antimicrobial susceptibility by agar dilution on MHA.

Antimicrobials : Major antibiotic classes included those used for treatment of listeriosis as well as others commonly used in human and veterinary medicine, disinfectant- quaternary ammonium compound benzalkonium chloride (BC) Tetraphenylphosphonium chloride (TPP, an anticancer drug commonly used as MDR substrate).

Determination of *L. monocytogenes* MICs for specific hurdles (salt, essential oil derivatives) will be performed by the agar dilution method.

RNA extraction and reverse-transcription PCR (RT-PCR). Expression of selected MDR genes (*mdrL*, *mdrM*, *mdrT*, *lde*) will be assessed by using RT-PCR analysis as described (14). PCR will be carried out using the Takara Ex Taq kit (Takara, Madison, WI) and a T1 thermal cycler (Biometra, Goettingen, Germany) as described (14).

Construction of Mutant Libraries: Transposon mutant library of *Tn916* (tetracycline resistance) will be constructed as described (23) and a transposon mutant library with a mariner-based transposition system with pMC38, as described by Cao et al. (3).

Southern blots: The number of transposon insertions for selected mutants will be determined by Southern blot (41);

Determination of transposon insertion site: Transposon insertion site will be determined by arbitrary PCR as described (3);

Sequencing: The PCR product will be sequenced (Genewiz, Inc., South Plainfield, NJ), and the sequence analyzed by the nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) of the National Center for Biotechnology;

Assessing phenotypic changes in resistance to hurdles and ability of adherence to the surface of fresh produce: Selected mutants will be tested for MICs on different concentrations of NaCl, essential oil derivatives, at different range of temperature, pH and aw.

Ability of survival and adherence will be tested on the surface of the fresh produce such as cantaloupes or celery, in pasteurized versus unpasteurized milk and stainless still surface;

8. Место, лабораторија и опрема за експериментални рад

Испитивања ће бити изведена на North Carolina State University, The Department of Food, Bioprocessing and Nutrition Sciences под надзором Dr. Sophia Kathariou и на Катедри за хигијену и технологију намирница анималног порекла, Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду.

Department, laboratory and experimental equipment

The experiments will be performed at North Carolina State University, The Department of Food, Bioprocessing and Nutrition Sciences under guidance of Dr. Sophia Kathariou and Department for food hygiene and technology, Faculty of veterinary medicine, University of Belgrade

9. Методе статистичке обраде података и ostali релевантни подаци

Rezultati ће бити статистички обрађени коришћењем програма (SAS Institute, Cary, NC) и по потреби биће консултован Dr. Jason Osborne, статистичар на Колеџу.

Statistical analysis

The experiment findings will be analyzed statistically using SAS (SAS Institute, Cary, NC). The College statistician (Dr. Jason Osborne) will be consulted as needed.

REFERENCES:

1. **Arslan, S., F. Ozdemir.** 2008. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria spp.* in homemade white cheese. *Food Control* **19**:360–363.
2. **Biavasco, F., E. Giovanetti, A. Miele, C. Vignaioli, B. Facinelli, and P.E.Varaldo.** 1996. In vitro conjugative transfer of aviancomycin resistance between enterococci and listeriae of different species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**:50–59.
3. **Cao, M., A. P. Bitar, and H. Marquis.** 2007. A mariner-based transposition system for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ. Microbiol.* **73**(8):2758-61
4. **CDC.** 2011. Multistate outbreak of listeriosis associated with Jensen farms cantaloupe- United States. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **60**(39):1357-1358.
5. **Charpentier, E., G. Gerbaud, C. Jacquet, J. Rocourt, P. Courvalin.** 1995. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. *J. Infect. Dis.* **172**: 277–281.
6. **Charpentier, E., Courvalin, P.** 1999. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrob. Agents Chemoth.* **43**:2103–2108.
7. **Carpentier, B., and O. Cerf.** 2011. Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int. J. Food Microbiol.* **145**(1):1-8
8. **Crimmins, G. T., A. A. Herskovits, K. Rehder, K. E. Sivick, P. Lauer, T. W. Dubensky, Jr., and D. A. Portnoy.** 2008. *Listeria monocytogenes* multidrug resistance transporters activate a cytosolic surveillance pathway of innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**:10191–10196.
9. **Denny, J., J. McLauchlin.** 2008. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe — an opportunity for improved European surveillance. *Eurosurveillance* 13 Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=8082>.
10. **Drevets, D. A., and M. S. Bronze.** 2008. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **53**:151-165.
11. **EFSA (European Food Safety Authority).** 2007. Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness — Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *The EFSA Journal* **599**: 1–42.
12. **EFSA.** 2008a. Draft Opinion on Antimicrobial Resistance in Food. Available online: http://www.efsa.eu.int/EFSA/DocumentSet/biohaz_public_cons_amr_en.pdf.
13. **EFSA.** 2008b. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the Health and Consumer Protection, Directorate General, European Commission on Microbiological Risk Assessment in feeding stuffs for food producing animals. *The EFSA Journal* **720**. 1–84.
14. **Elhanafi, D., V. Dutta, and S. Kathariou.** 2010. Genetic characterization of plasmid associated benzalkonium chloride resistance determinants in a strain of *Listeria monocytogenes* from the 1998-1999 outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:8231-8238.
15. **European Commission.** 1998. Council Regulation (EC) No 2821/98 of 17 December 1998 amending, as regards withdrawal of the authorisation of certain antibiotics, Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. *Official Journal of the European Community L* **351**: 4–8.
16. **Farber, J.M., P.I. Peterkin.** 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**: 476–511.
17. **Gianfranceschi, M.V., A. Gattuso, M.C. D'Ottavio, S. Fokas, and P. Aureli.** 2007. Results of a 12-month long enhanced surveillance of listeriosis in Italy. *Euro Surveill.* **12**(11):E7-8.
18. **Hof, H., T. Nichterlein, M. Kretschmar.** 1997. Management of listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:345–357.
19. **Hof, H.** 2003. History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **35**: 199–202.
20. **Hsieh, P. C., S. A. Siegel, B. Rogers, D. Davis, and K. Lewis.** 1998. Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6602–6606.
21. **Jacoby, G. A.** 1996. Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s. *Annu. Rev. Med.* **47**:169–179.
22. **Kaatz, G. W., S. M. Seo, and C. A. Ruble.** 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1086–1094
23. **Kathariou S, P. Metz, H. Hof, and W. Goebel.** 1987. Tn916-induced mutations in the hemolysin

- determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. **169**(3):1291-7.
24. **Kathariou, S.** 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. J Food Prot. **65**(11):1811-29.
25. **Lee, A., M. Weimin, M. S. Warren, A. Mistry, K. Hoshino, R. Okumura, H. Ishida, and O. Lomovskaya.** 2000. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. J. Bacteriol. **182**:3142–3150
26. **Lewis, K.** 1994. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. Trends Biochem. Sci. **19**:119–123.
27. **McDonnell, G. and A. D. Russell.** 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin. Microbiol. Rev. **12**:147–179.
28. **Merianos, J. J.** 1991. Quaternary ammonium antimicrobial compounds, p. 225–255. In S. S. Block (ed.) Disinfection, sterilization and preservation, 4th ed. Lea & Feigner, Malvern, PA.
29. **Morvan A., C. Moubareck, A. Leclercq, M. Hervé-Bazin, S. Bremont, M. Lecuit, P. Courvalin, and A. LeMonnier.** 2010. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. Antimicrob. Agents Chemother. **54**: 2728-2731.
30. **Painter, J., and L. Slutsker.** 2007. Listeriosis in humans, p. 85–109. In E. T. Ryser and E. H. Marth (ed.), *Listeria*, listeriosis and food safety, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL
31. **Perreten, V., F. Schwarz, L. Cresta, M. Boeglin, G. Dasen, and M. Teuber.** 1997. Antibiotic resistance spread in the food. Nature **389**: 801–802.
32. **Phillips, I., M. Casewell, T. Cox, B. De Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston, and J. Waddell.** 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. J. Antimicrob. Chemother. **23**: 28–52.
33. **Poyart-Salmeron, C., C. Carlier, P. Trieu-Cuot, A.L. Courtieu, and P. Courvalin.** 1990. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. Lancet **335**:1422–1426.
34. **Ramos, J.L., M. Martínez-Bueno, A.J. Molina-Henares, W. Terán, K. Watanabe, X. Zhang, M.T. Gallegos, R. Brennan, and R. Tobes.** 2005. The TetR family of transcriptional repressors. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **69**(2):326–56.
35. **Roberts, M.C., B. Facinelli, E. Giovanetti, and P.E. Varaldo.** 1996. Transferable erythromycin resistance in *Listeria spp.* isolated from food. Appl. Environ. Microbiol. **62**:269–270.
36. **Safdar, A., and D. Armstrong.** 2003. Antimicrobial activities against 84 *Listeria monocytogenes* isolates from patients with systemic listeriosis at a comprehensive cancer center (1955–1997). J. Clin. Microbiol. **41**: 483–485.
37. **Scallan, E., R. M. Hoekstra, F. J. Angulo, R.V. Tauxe, M. A. Widdowson, S. L. Roy, J. L. Jones, and P. M Griffin.** 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. Emerg. Infect. Dis. **17**:7-15.
38. **Schlech, W.F., P.M. Lavigne III, R.A. Bortolussi, A.C. Allen, E.V. Haldane, A. J. Wort, A.W. Hightower, S.E. Johnson, S.H. King, E.S. Nicholls, and C.V. Broome.** 1983. Epidemic listeriosis — evidence for transmission by food. N. Engl. J. Med. **308**:203–206.
39. **White, D.G., S. Zhao, S. Simjee, D. D.Wagner, and P.F. McDermott.** 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. Microbes Infect. **4**: 405–412.
40. **Woodward, J.J., A.T. Iavarone, and D.A. Portnoy.** 2010. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. Science **328** (5986): **1703-1705**.
41. **Yildirim, S., W. Lin, A. D. Hitchins, L.-A. Jaykus, E. Altermann, T. R. Klaenhammer, and S. Kathariou.** 2004. Epidemic clone I-specific genetic markers in strains of *Listeria monocytogenes* serotype 4b from foods. Appl. Environ. Microbiol. **70**:4158–4164.
42. **Zhang, Y., E. Yeha, G. Hallb, J. Cripeb, A. A. Bhagwatc, and J. Menget.** 2007. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. Int. J. Food Microbiol. **113**: 47–53.

VII. ЗАКЉУЧАК СА ОБРАЗЛОЖЕНОМ ОЦЕНОМ О ПОДОБНОСТИ ТЕМЕ И КАНДИДАТА

На основу увида у достављену документацију кандидата, Комисија сматра да дипломирани ветеринар Мира Ракић-Мартинез, испуњава све услове прописане Законом о високом школству, за израду докторске дисертације. Предложена тема је актуелна и научно заснована. Циљеви и задаци ове дисертације су прецизно дефинисани, а методе које би се користиле за њихову реализацију су валидне и правилно одабране.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду, да прихвати израду докторске дисертације, под насловом: Испитивање механизма резистенције и могуће унакрсне резистенције *L.monocytogenes* након адаптације на различита антимикробна средства.

Комисија предлаже да се докторска дисертација ради на Катедри за хигијену и технологију намирница анималног порекла, Факултета ветеринарске медицине и North Carolina State University, The Department of Food, Bioprocessing and Nutrition Sciences. За ментора се предлаже др Вера Катић, редовни професор Факултета ветеринарске медицине у Београду, а за коментора Dr. Sophia Kathariou, Professor, North Carolina State University, The Department of Food, Bioprocessing and Nutrition Sciences.

CONCLUSION WITH EVALUATION OF DOCTORAL CANDIDATE AND THESIS

Based on the submitted documents, Committee deems that graduated veterinarian Mira Rakic- Martinez completed all terms acquired by the Law for the completion of the doctoral dissertation. Proposed subject is relevant and scientifically based. Objectives are precisely defined and proposed materials and methods are relevant and correctly chosen.

Committee recommends to the Teaching and scientific board of Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade University, to accept proposed thesis titled : Identification of the mechanisms of resistance and potential cross resistance upon *L. monocytogenes* adaptation to antimicrobials.

Committee recommends that experiment should be performed at the Department of food hygiene and technology, Faculty of the Veterinary Medicine, Belgrade University and the Department of Food Bioprocessing and Nutrition Sciences, North Carolina State University. Committee recommends dr Vera Katic, Professor at the Faculty of veterinary medicine in Belgrade as a mentor and Dr. Sophia Kathariou, Professor at the Department of Food, Bioprocessing and Nutrition Sciences North Carolina State University, as a komentor for this doctoral dissertation.

ДАТУМ: 09.01.2012.

DATE: 01.09.2012.

ПОТПИСИ
ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

MEMBERS OF THE COMMITTEE:

1. др Вера Катић, редовни професор,
Факултет ветеринарске медицине

2. др Sophia Kathariou, Professor,
Department of Food Science,
North Carolina State University,
Raleigh, N. Carolina

3. др Душан Мишић, доцент
Факултет ветеринарске медицине

НАПОМЕНА: Чланови комисије морају бити јединствени у свом мишљењу

REMARK: Members of the Committee must be unanimous in their opinion

* за кандидате који нису уписани на докторске академске студије

* for candidates not enrolled in doctoral program

