

## PREGLEDNI RAD – REVIEW PAPER

UDK 637.146.1:615.015.8

**REZISTENCIJA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE NA  
ANTIMIKROBNE LEKOVE\******ANTIBIOTIC RESISTANCE OF LACTIC ACID BACTERIA*****Snežana Bulajić, Zora Mijačević, Radoslava Savić-Radovanović\*\***

Saznanja o rezistenciji na antimikrobne lekove bakterija mlečne kiseline su još uvek ograničena, verovatno zbog velikog broja rodova i vrsta koje postoje kod ove grupe, kao i zbog razlika u njihovom spektru rezistencije. Evropska agencija za bezbednost hrane EFSA smatra rezistentnost na antimikrobne lekove, posebno prenosive rezistencije, važnim kriterijumom kod donošenja odluke o kvalifikovanoj proceni bezbednosti -QPS statusu odredjenog soja. Ne postoje prihvaćeni standardi za fenotipsku ili genotipsku evaluaciju rezistencije na antimikrobne lekove kod izolata hrane. Takođe, izbor medija je problematičan, kao i specifikacija minimalne inhibitorne koncentracije MIC vrednosti kao posledica velikih varijacija u vrsti i moguće rezultirajuće varijacije u MIC vrednostima između vrsta i roda. Tekuća istraživanja u ovoj oblasti pokazala su da bi se na kraju mogao dobiti niz različitih MIC vrednosti specifičnih za vrstu ili rod koje bi mogle još više da prodube sadašnju kompleksnost. Još jedan problem koji postoji u vezi sa određivanjima bezbednosti starter sojeva jeste da, kada se jednom identifikuju fenotip rezistencije i asocirana determinanta rezistencije, postaje teško da se pokaže da ta determinanta nije prenosiva, posebno ukoliko se gen rezistencije ne nalazi na plazmidu i ukoliko nema standardnih protokola za prikazivanje genetskog transfera. Usled postojanja takvih problema, sistem o kvalifikovanoj proceni bezbednosti QPS treba da ostavi prostora za interpretaciju rezultata, posebno kada se oni odnose na metodologiju određivanja fenotipa rezistencije, određivanje MIC vrednosti za određeni rod, vrstu, ili soj, na nemogućnost ustanovljavanja genetske baze fenotipa rezistencije, kao i prenosivost gena rezistencije.

*Ključne reci: bakterije mlečne kiseline, rezistencija, antimikrobni lekovi*

\* Rad saopšten na simpozijumu "Bezbednost namirnica animalnog porekla", Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 16 i 17. oktobar 2008. godine

\*\* Dr sci. med. vet. Snežana Bulajić, docent; dr sci. med. vet. Zora Mijačević, redovni profesor, mr sci. med. vet. Radoslava Savić Radovanović, asistent, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

## Uvod / Introduction

Bakterije mlečne kiseline (BMK) pripadaju taksonomski heterogenoj grupi nesporogenih gram pozitivnih mikroorganizama čija je osnovna biološka karakteristika fermentisanje šećera i posledično produkcija mlečne kiseline. Zahvaljujući sposobnosti da rastu u anaerobnoj sredini, a da su aerotolerantni, članovi zajednice BMK zauzimaju veliki broj prirodnih niša (Carr i sar., 2002). Tipični predstavnici su vrste iz rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* i *Pediococcus* (Carr i sar., 2002). Bakterije mlečne kiseline učestvuju u proizvodnji i konzervisanju fermentisanih proizvoda, bilo kao prirodno prisutni kontaminanti, i tada učestvuju u procesima spontane fermentacije, ili kao namerno dodati starteri u kontrolisanim procesima.

Njihova acidogena sposobnost, pored ostalih tehnološki važnih karakteristika, koja se ogleda u snižavanju pH vrednosti matriksa namirnice, vodi ka ostvarivanju poželjnih organoleptičkih i reoloških svojstava. Kisela sredina je nepovoljna za rast patogenih vrsta bakterija, a istovremeno obezbeđuje postojani kvalitet i higijensku ispravnost konačnog proizvoda. Metabolička aktivnost bakterija mlečne kiseline ogleda se u stvaranju mlečne kiseline koja ujedno deluje i kao selektivni faktor i tako ostvaruje dominaciju istih mikroorganizama. Zahvaljujući njihovoj dugogodišnjoj bezbednoj primeni u proizvodnji fermentisanih proizvoda, BMK imaju "Generally Regarded As Safe" (GRAS) status, priznat od strane Američke agencije za hranu i lekove. Bakterije mlečne kiseline predstavljaju i deo prirodne populacije gastrointestinalnog i genitourinarnog sistema vertebrata i smatra se, da u toj sredini, ispoljavaju povoljan efekat na zdravlje domaćina. U kontekstu toga, zaživela je i njihova primena kao probiotika, pri čemu se probiotik definiše kao nepatogeni mikroorganizam, koji u slučaju da se unese u određenom broju pozitivno utiče na fiziološko i zdravstveno stanje domaćina pored osnovnog nutritivnog delovanja.

U današnje vreme mnogi istraživači ističu hipotezu da komenzalne bakterije, pre svega bakterije mlečne kiseline, mogu predstavljati rezervoar gena rezistencije na antimikrobne lekove (Perreten i sar., 1997; Levy i Salyers, 2002). Upravo iz ovog razloga, populacija komenzala je veoma značajna u spoznavanju mehanizama perzistencije i širenja gena rezistencije u svetu mikroorganizama (Levy i Miller, 1989). Takvi mikroorganizmi koji se označavaju kao "rezervoari" mogu se naći u različitim namirnicama, pre svega fermentisanim proizvodima od mleka i mesa koji su u velikom broju opterećeni nepatogenim bakterijama kao rezultat njihovog prirodnog procesa proizvodnje.

Prema ovoj teoriji, lanac hrane se može smatrati jednim od glavnih puteva transmisije rezistentnih bakterija između populacije ljudi i životinja (Witte, 1997). Pre svega, fermentisani proizvodi od mleka i mesa, koji nisu termički tretirani, predstavljaju sredstvo prenosa rezistentnih bakterija i time postoji direktna povezanost između mikroorganizama koji se nalaze u organizmu životinja i gastrointestinalnog sistema ljudi. Projekt pod imenom "Rezervoari antibiotske rezis-

tencije" (Levy i Salyers, 2002) postavljen je još daleke 1998. godine u cilju promovisanja studija o selekciji i diseminaciji nepatogenih bakterija rezistentnih na antibiotike kod ljudi, tokom procesa proizvodnje hrane, kao i u neposrednom okruženju. Iako mnoge bakterije mlečne kiseline, uključene u procese fermentacije namirnica imaju "*Generally Regarded As Safe* (GRAS)" status, potencijalan rizik po zdravlje ljudi usled transfera gena rezistencije od tzv. rezervoar sojeva bakterija mlečne kiseline na bakterije koje predstavljaju stalno prisutnu populaciju mikroorganizama u gastrointestinalnom sistemu ljudi, još nije u potpunosti definisan.

### **Fenomen rezistencije na antimikrobne lekove, prirodna i stečena rezistencija** *Phenomenon of resistance to antibiotics, natural and acquired resistance*

Detaljni izveštaji o enormnoj primeni antimikrobnih lekova u humanoj i veterinarskoj medicini (WHO, 1997), poljoprivredi i akvakulturi na veoma dobar način dokumentuju razvoj rezistencije bakterija na antimikrobne lekove (Levy, 1997). Evolucija rezistencije na antimikrobne lekove u zajednicama mikroorganizama je pojačana horizontalnim transferom gena rezistencije i to preko granica mogućnosti vrsta i rodova mikroorganizama, putem konjugativnih plazmida, transpozona, posedovanjem integrona i insercionih elemenata, kao i litičnih bakteriofaga i profaga (Davies, 1994). Tokom 50 i više godina globalne upotrebe antimikrobnih sredstava, uspostavilo se nekoliko mehanizama rezistencije, uključujući inaktivaciju antimikrobnih lekova enzimima (enzimska inaktivacija) (npr.  $\beta$ -laktamaze, aminoglikozid acetil-, nukleotidil-fosforil-transferaze), ograničeni unos antimikrobnih lekova (npr. penicilin vezujući proteini), aktivni iznos antimikrobnih lekova ili pak modifikacija ciljnog mesta delovanja antimikrobnih lekova (metilacija 23S rRNA, mutacija aminokiselinske sekvence topoizomeraze) i/ili osiguravanje alternativnog metaboličkog puta ("premošćavanje"), pošto je originalni put metabolizma narušen (Levy, 1997). Kod pojedinih patogenih i potencijalno patogenih bakterija, kao što su stafilokoke i enterokoke, razvoj visoko rezistentnih klonova bakterija je pokrenuo krizu rezistencije na antimikrobne lekove (Neu, 1992). U slučaju vankomicin rezistentnih enterokoka, još uvek ne postoji mogućnost uspešne terapije antimikrobnim lekovima (Jett i sar., 1994).

Neophodno je praviti razliku između prirodne ("intrinzič") i stečene (prensive) rezistencije. Rezistencija na dati antimikrobni lek može biti intrinzična u odnosu na bakterijsku vrstu ili rod (prirodna rezistencija), a karakteriše se sposobnošću jednog mikroorganizma da preživi u prisustvu određenog antimikrobnog agensa, usled karakteristika urođene rezistencije. Prirodna rezistencija se ne prenosi horizontalno. Suprotno ovom tipu, stečena rezistencija je karakteristika pojedinih sojeva unutar vrste obično osetljive na primenjeni antimikrobni lek, a može se horizontalnim putem prenositi među bakterijama. Stečena rezistencija na određeni antimikrobni agens nastaje bilo iz mutacije u genomu bakterije ili usled sticanja dodatnih gena koji kodiraju mehanizam rezistencije. Ovakve genet-

ske promene pojačavaju odbrambenu sposobnost bakterija. Rezistencija se vrlo verovatno razvila daleko pre kliničke primene antimikrobnih lekova. Geni rezistencije mogu voditi poreklo od mikroorganizama, prirodnih producenata antimikrobnih materija, koji su snabdeveni dotičnim genima u cilju samozaštite (Davies, 1997). Drugi potencijalni izvor gena rezistencije mogu predstavljati geni čiji produkti imaju ulogu u metabolizmu bakterija. Takvi geni su mogli biti izloženi "pametnim" mutacijama, koje su izmenile spektar supstrata (po mutaciji supstrat predstavlja antimikrobni lek u odnosu na pređašnje supstrate biosinteze ili biodegradacije).

Determinante rezistencije na antimikrobne lekove se prenose vertikalno ili horizontalno u prirodnim mikrobnim zajednicama. Vertikalna diseminacija se odvija klonalnim širenjem određenog rezistentnog soja. Kod horizontalnog transfera gena identifikovana su tri mehanizma (Davies, 1994): prirodna transformacija sa preuzimanjem i ugradnjom ("inkorporacijom") slobodne DNK iz ekstrakcelularnog medijuma; konjugacija -mehanizam DNK transfera zavisan od ćelijskog kontakta koji kao takav postoji kod većine bakterijskih rodova i transdukcija-transfer posredovan bakteriofagima. Veruje se da konjugacija predstavlja glavni način transfera gena (Salyers, 1995). Mnogi geni rezistencije na antimikrobne lekove se nalaze na mobilnim elementima kao što su plazmidi i konjugativni transpozoni.

Stečena rezistencija na antimikrobne lekove, predstavlja karakteristiku pre svega onih mikroorganizama, čija primarna staništa podrazumevaju sredine permanentno izložene opterećenju usled kontinuirane primene antimikrobnih lekova (intestinum ljudi i životinja) (Teuber i sar., 1999). Profili rezistencije na antimikrobne lekove kod bakterija koje predstavljaju komensalne mikroorganizme nekog ekosistema, npr. bakterije mlečne kiseline, indikatori su selektivnog pritiska koji dotični mikroorganizmi podnose u uslovima kontaminacije staništa antimikrobnim sredstvima. Sirovo mleko i meso kontaminiraju se tokom proizvodnje fekalnim materijalom, gde se mogu naći i bakterije mlečne kiseline rezistentne na antimikrobne lekove. Na taj način se geni rezistencije prenose u krajnje proizvode, pre svega sireve proizvedene od sirovog mleka i fermentisane kobasice. Kako molekularna analiza gena rezistencije lokalizovanih na plazmidima i transpozonima pokazuje identične genetske elemente kod ljudi i životinja, čini se mogućim da namirnice animalnog porekla služe kao sredstvo prenošenja rezistentnih bakterija, odnosno determinanti rezistencije na antimikrobne lekove. Naučna javnost, poslednjih godina pokušava odgovoriti na pitanje da li komensalne bakterije iz namirnica mogu preneti gene rezistencije na crevne bakterije ljudi tokom prolaza kroz creva.

#### **Rezistencija bakterija mlečne kiseline na antimikrobne lekove / *Antibiotic resistance of lactic acid bacteria***

Veliki broj bakterija mlečne kiseline prisutan u fermentisanim proizvodima sasvim sigurno pomaže u ostvarivanju različitih mehanizama rezistencija na

Tabela 1. Minimalne inhibitorne koncentracije nekih antimikrobnih lekova ( $\mu\text{g/mL}$ ) za pojedine bakterije mlečne kiseline  
 Table 1. Minimal inhibitory concentrations of some antibiotics ( $\mu\text{g/mL}$ ) for certain lactic acid bacteria

Antimikrobni lek / Antibiotic	Vrste / Types									
	Obligatno ho- mofermentativni laktobacili / Obligatory homofermentative lactobacilli	Heterofermenta- tivni laktobacili* / Heterofermentative lactobacilli**	Lactobacil- lus planta- rum	Enterococ- cus spp.	Pediococ- cus spp.	Leu- conostoc spp.	Lactococ- cus spp.	Streptococ- cus thermo- philus		
Ampicilin / Ampicillin	4	4	4	8	4	4	4	4		
Vankomicin / Vancomycin	4	IR	IR	8	IR	IR	4	4		
Gentamicin / Gentamicin**	8	8	64	512	4	4	8	8		
Kanamycin / Kanamycin**	16	16	64	1024	4	8	8	8		
Streptomycin / Streptomycin**	16	16	64	1024	4	8	16	16		
Neomicin** / Neomycin**	16	16	32	1024	8	8	8	8		
Eritromicin / Erythromycin	4	4	4	4	4	4	4	4		
Klindamicin / Clindamycin	4	4	4	4	4	4	4	4		
Kvinupristin+Dalfoportistin / Quinupristin+Dalfoportistin	4	4	4	4	4	4	4	4		
Tetraciklin / Tetracycline	8	8	32	16	4	4	4	4		
Hloramfenikol / Chloramphenicol	4	4	8	8	4	4	8	8		
Trimetoprim/ Trimetoprim**	8	8	8	8	8	8	ND	nd		
Linezolid / Linezolid	4	4	4	4	4	4	4	4		

Tabela je preuzeta od FEEDAP Panel izveštaja (European Commission, 2002). Sojevi sa MIK vrednošću većom od naznačenih graničnih vrednosti smatraju se rezistentnim. / Table taken over from FEEDAP Panel Report (European Commission, 2002). Strains with MIC values higher than the marked border values are considered resistant.

IR – intrinzično rezistentni; \* uključujući i *Lactobacillus salivarius*; \*\* opisana interferencija antibiotika sa medijumom koji se koristi pri određivanju osetljivosti/rezistencije na antimikrobne lekove / IR – intrinsically resistant; \* including *Lactobacillus salivarius*; \*\* described interference of antibiotic and me-  
 dium used for determination of sensitivity/resistance to antibiotics

antimikrobne lekove putem mutacija. Dodatno, bakterije mlečne kiseline su snabevene mobilnim genetskim elementima, pre svega plazmidima i transpozonima, koji omogućavaju horizontalan prenos i širenje gena rezistencije. Po usvajanju svojstva rezistencije, determinante rezistencije se amplifikuju i mogu se predati drugom domaćinu. Zbog toga je sasvim opravdan zahtev da se starter i probiotski sojevi bakterija mlečne kiseline ispituju na sposobnost prenosive rezistencije na antimikrobne lekove, pored potrebe da se kompletno fiziološki i tehnološki okarakterišu. Od vitalnog značaja jeste jasno definisanje graničnih vrednosti na osnovu kojih se vrši kategorizacija na rezistentne i osetljive sojeve. Posebnu vrednost ima razlikovanje prirodne (nespecifične, neprenosive) i stečene rezistencije, putem postupka koji zahteva poređenje profila rezistencije na antimikrobne lekove velikog broja bakterija mlečne kiseline poreklom iz različitih izvora (Teuber i sar., 1999). Uz tradicionalne kliničke granične vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) od pomoći kliničarima u odabiru efikasnog antimikrobnog leka, predstavljen je i koncept mikrobioloških graničnih vrednosti, i to na osnovu proučavanja distribucije minimalnih inhibitornih koncentracija na dati antimikrobni lek u određenoj populaciji bakterija (Olsson-Liljequist i sar., 1997). Prema datom konceptu, onaj deo populacije koji pokazuje jasno odstupanje od osetljive većine smatra se rezistentnim delom populacije, odnosno delom populacije sa stečenom i potencijalno prenosivom rezistencijom. U tabeli 1. dat je prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija na osnovu kojih se pojedine vrste bakterija mlečne kiseline kategorizuju kao rezistentne. Definisane MIK vrednosti trebalo bi smatrati pragmatičnim odgovorom na postojeći problem razdvajanja sojeva sa stečenom rezistencijom od osetljivih sojeva.

#### **Određivanje profila rezistencije bakterija mlečne kiseline na antimikrobne lekove / *Determining profile of resistance to antibiotics of lactic acid bacteria***

Kako za određivanja profila rezistencije na antimikrobne lekove kod BMK postoje brojne metode, ne postoji konačni konsenzus o graničnim vrednostima za većinu antimikrobnih lekova. Pometnja u ovom domenu prvenstveno proizilazi iz činjenice da se za definisanja rezistencije koriste različite metode (E test: Danielsen i Wind, 2003; agar dilucija: Herrero i sar., 1996; disk difuzioni test: Charteris i sar., 1998; i mikrobujonska kultura: Klein i sar., 2000) i tako se dobijeni rezultati ne mogu direktno upoređivati. Pored toga, pojedini testovi se ne smatraju pouzdanim za određeni antimikrobni lek. Npr. disk difuzioni test se ne smatra pouzdanim za detekciju rezistencije niskog nivoa na vankomicin kod enterokoka (MIK od 8 do 32 µg/mL) (Swenson i sar., 1992). Na rezultate ispitivanja rezistencije bakterija na antimikrobne lekove može da utiče i sastav podloge (Huys i sar., 2002), kao što su varijacije u sadržaju katjona ili koncentraciji kritičnih sastojaka poput timina ili folne kiseline, kao i veličina inokuluma, temperatura i period inkubacije. Pored toga, većina vrsta BMK pokazuje relativno slab rast na uobičajenim podlogama za testiranje, kao što je Mueller-Hinton (Difco) ili Isosensitest (Oxoid),

dok MRS medijum može čak i inaktivirati pojedine antimikrobne lekove (npr. imipenem).

Poseban problem pri utvrđivanju profila rezistencije predstavlja specifikacija MIK vrednosti. Ne postoje standardi po tom pitanju, a Institut za kliničke i laboratorijske standarde ("Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI", bivši NCCLS) ne navodi MIK granične vrednosti sa izuzetkom enterokoka. Svakako da problem predstavlja i velika varijabilnost vrsta i s tim u vezi varijacije u MIK vrednostima između vrsta i rodova bakterija mlečne kiseline (Danielsen i Wind, 2003). Iz ovog razloga Naučni komitet za ishranu životinja ("Scientific Committee on Animal Nutrition-SCAN") pravi razliku između laktobacila i pediokoka u odnosu na MIK vrednosti za različite antimikrobne lekove (European Commission, 2002). Demonstraciju složenosti postojeće problematike, ali i dodatnu konfuziju stvorila je i odluka FEEDAP (Scientific Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed, 2005), po kojoj treba da se izvrši ispravka postojećih MIK vrednosti. Tom prilikom postavljene su i granične vrednosti za različite grupe bakterija mlečne kiseline, vrste, ali i sojeve; npr. za homofermentativne i heterofermentativne laktobacile, enterokoke, *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., sojeve *L. plantarum*, sojeve *L. lactis*. Pored toga, Danielsen i Wind (Danielsen i Wind, 2003) predlažu i do tri različite MIK granične vrednosti i to na osnovu razlike u rezistenciji svega 14 ispitivanih vrsta laktobacila. Stoga, ukoliko se za ostale (>60 vrsta) *Lactobacillus* vrste, ali i druge grupe bakterija mlečne kiseline, za koje do sada nisu ispitane ni postavljene MIK vrednosti, u budućnosti utvrde značajne razlike, ovaj složeni proces evaluacije i utvrđivanja kriterijuma bi se mogao završiti postavljanjem MIK graničnih vrednosti, specifičnih ne samo za dati rod nego i ispitivanu vrstu bakterija mlečne kiseline, a možda i pojedine sojeve, što dodatno usložnjava problematiku.

Fenotipsko određivanje rezistencije se dopunjuje molekularnim metodama gde se sojevi direktno ispituju na prisustvo determinanti rezistencije. Ove metode uključuju amplifikaciju putem PCR tehnike primenom specifičnih prajmera za pojedine ili multiple gene rezistencije (Strommenger i sar., 2003), RT PCR (Volkman i sar., 2004) ili korišćenje DNK matrice koja sadrži veliku kolekciju gena rezistencije (Perreten i sar., 2005). Postojeće genetičke studije na osnovu kojih se potvrđuje prenošenje poznatih determinanti rezistencije su ograničene mnogim eksperimentalnim faktorima, zbog čega su i njihovi rezultati različiti. Osim toga, nisu dostupni pozitivni kontrolni sojevi za izvođenje konjugacije i/ili transpozicije, a ne postoji ni standardni protokol demonstracije transfera gena.

#### **Profili rezistencije bakterija mlečne kiseline na antimikrobne lekove /** *Profiles of resistance to antibiotics of lactic acid bacteria*

Profili rezistencije na antimikrobne lekove kod *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* i *Propionibacterium* vrsta su sasvim različiti, iako se ne zapažaju jasno odvojeni, po vrstu specifični profili rezis-

tencije. S jedne strane, većina vrsta je rezistentna na metronidazol ( $\text{MIK} \geq 256 \mu\text{g/mL}$ ), i trimetoprim ( $\text{MIK} \geq 30 \mu\text{g/mL}$ ) (Charteris i sar., 1998; Katla i sar., 2001). Ovi mikroorganizmi imaju ograničenu sposobnost biosinteze i ne poseduju metabolički put sinteze folne kiseline, pa se smatraju prirodno rezistentnim na ove agense (Katla i sar., 2001). S druge strane, bakterije mlečne kiseline i bifidobakterije su osetljive na piperacilin i piperacilin plus tazobaktam ( $\text{MIK} \leq 16 \mu\text{g/mL}$ ) (Delgado i sar., 2005). *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Leuconostoc* vrste pokazuju rezistenciju visokog nivoa na cefoksitin ( $\text{MIK} \geq 30 \mu\text{g/mL}$ ) (Charteris i sar., 1998; Delgado i sar., 2005). Većina laktobacila, pediokoka i *Leuconostoc* vrsta je rezistentna na visoke koncentracije vankomicina ( $\text{MIK} \geq 256 \mu\text{g/mL}$ ), dok je većina laktokoka veoma osetljiva na isti antimikrobni lek ( $\text{MIK} \leq 2 \mu\text{g/mL}$ ) (Danielsen i Wind, 2003; Delgado i sar., 2005). Rezistencija *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc* spp. na vankomicin objašnjava se postojanjem D-Ala-D-Laktata u peptidoglikanu, umesto D-Ala-D-Ala dipeptida koji predstavlja ciljno mesto delovanja antimikrobnog leka. Time se rezistencija kod ovih vrsta smatra prirodnom i ne može se upoređivati sa stečenom, plazmidima kodiranom rezistencijom, utvrđenom kod enterokoka. Ispitivanjem molekularne osnove rezistencije kod BMK, a na osnovu poređenja identiteta nukleotidne sekvence sa sekvencom gena originalno opisanih kod filogenetski udaljenih bakterijskih grupa, utvrđeno je da sama rezistencija vodi poreklo od drugih mikroorganizama, sa kojih je, na neki način prenešena na bakterije mlečne kiseline i bifidobakterije.

#### **Zaključak / Conclusion**

Bakterije mlečne kiseline, kao deo interaktivne populacije mikroorganizama, podložne su izmeni gena rezistencije kao mehanizmu adaptacije na sredinu opterećenu antimikrobnim lekovima, a u cilju preživljavanja u takvim sredinama. Izvan svake sumnje jeste to da se distribucija bakterija sa prenosivim determinantama rezistencije treba izbeći (WHO, 1997). Mere uključuju korišćenje odgovarajućih, pažljivo selekcionisanih startera, kao i odgovarajućih supstrata za procese fermentacije, uz neophodnu potvrdu da starter i probiotski sojevi ne sadrže gene koji prenose rezistenciju na antimikrobne lekove. Pažljiva i opravdana upotreba antimikrobnih lekova, kako u veterini, poljoprivrednom sektoru i humanoj medicini, uz pasterizaciju ili drugi termički tretman sirovih supstrata (mleka ili mesa) predstavljaju neophodne mere u rešavanju problema rezistencije na antimikrobne lekove. Neophodnim se smatra i zabrana korišćenja antimikrobnih lekova, promotora rasta u uzgoju životinja, pre svega onih koji se klinički primenjuju, kako u veterinarskoj, tako i u humanoj medicini: zabranjeni su antimikrobni lekovi koji dovode do ukrštene rezistencije kod bakterijskih uzročnika, (tilozin, virginiamicin) ili oni koji se koriste samo u humanoj medicini, kao što je bacitracin. Urođena rezistencija na antimikrobne lekove utvrđena je na vankomicin kod *Leuconostoc* vrsta, određenih laktobacila ili pak na nalidiksinsku kiselinu. Razliku između prirodne i stečene rezistencije je teško postaviti budući da je ne-



moгуće pratiti ispitivani soj u preantibiotskoj eri. Ukoliko bakterije mlečne kiseline žive u biotopu koji je opterećen antimikrobnim lekovima (digestivni sistem ljudi i životinja, vime krava), stečena rezistencija na antimikrobne lekove se utvrđuje kod mnogih vrsta koje naseljavaju takve sredine, uključujući *Enterococcus*, *Lactococcus* i *Lactobacillus* vrste.

Ne postoji barijera između patogenih (streptokoke), potencijalno patogenih (enterokoke) i komenzalnih (laktobacili, laktokoke) BMK s obzirom na mogućnost preuzimanja i sticanja determinanti rezistencije na antimikrobne lekove. Utvrđeni su identični geni odgovorni za rezistenciju na tetraciklin - *tet* (M), eritromicin - *ermAM*, hloramfenikol - *cat*, streptomycin - *str*, streptogramin - *sat*, u sve tri grupe mikroorganizama. Ovi podaci potvrđuju gledište da u sredinama, u kojima su korišćene enormne količine antimikrobnih lekova, bakterije mlečne kiseline, kao i drugi mikroorganizmi, učestvuju u sistemima komunikacije, putem kojih i prenose osobine rezistencije preko granica vrsta, pa čak i rodova.

Do sada, multirezistencija, na sreću, nije uobičajena kod bakterija mlečne kiseline. Ipak, u sve većem broju se izoluju sojevi koji pokazuju atipične nivoe rezistencije na pojedine antimikrobne lekove (posebno tetraciklin i eritromicin). Takvi sojevi nose gene rezistencije za koje se veruje, a u mnogim slučajevima je i potvrđeno, da su stečeni horizontalnim prenošenjem. Stoga je sasvim opravdana inicijativa Evropske agencije za bezbednost hrane za neophodnim ispitivanjem prisustva prenosivih determinanti rezistencije onih sojeva bakterija mlečne kiseline koji se primenjuju kao starter ili probiotski sojevi. Takvi zahtevi su definisani usvajanjem sistema kvalifikovane pretpostavke bezbednosti ("Qualified Pre-sumption of Safety" – QPS) (EFSA, 2004).

#### Literatura / References

1. Carr FJ, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: a literature survey. Crit. rev. Microbiol. 2002; 28: 281-370.
2. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. J. Food Prot. 1998; 61: 1636-43.
3. Danielsen M, Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. Int. J. Food Microbiol. 2003; 82: 1-11.
4. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science 1994; 64: 375-82.
5. Davies J. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. In: Chadwick DJ, Goode J (Eds.), Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread, Ciba Foundation Symposium, Vol. 207. Wiley, Chichester, 1997; 15-27.
6. Delgado S, Florez AB, Mayo B. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. Curr. Microbiol. 2005; 50: 202-7.
7. European Commission. Opinion of the Scientific Committee on animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of microorganisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. European Commission, Health and

- Consumer Protection Directorate, Directorate C, Scientific Opinions, Brussels, Belgium. 2002.
8. European Food Safety Authority. EFSA Scientific Colloquium Summary Report. QPS: qualified presumption of safety of microorganisms in food and feed. European Food Safety Authority, Brussels, Belgium, 2004.
  9. Herrero M, Mayo B, Gonzales B, Suarez JE. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 1996; 81: 565-70.
  10. Huys G, D'Haene K, Swings J. Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *Lett. Appl. Microbiol.* 2002; 34: 402-6.
  11. Katla AK, Kruse H, Johnsen G, Herikstad H. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 2001; 67: 147-52.
  12. Klein G, Hallmann C, Casas IA, Abad J, Louwers J, Reuter G. Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *J. Appl. Microbiol.* 2000; 89: 815-24.
  13. Levy SB. Antibiotic resistance an ecological imbalance. In: Chadwick, D.J., Good, J. (Eds.), *Antibiotic Resistance. Origins, Evolution, selection and Spread.* John Wiley & Sons, Chichester. 1997; 1-14.
  14. Levy SB, Miller RV. Horizontal gene transfer in relation to environmental release of genetically engineered microorganisms. *Gene Transfer in the Environment.* McGraw-Hill Publishing Company, New York, 1989; 405-20.
  15. Levy SB, Salyers AA. Reservoirs of antibiotic resistance (ROAR) Network. <http://www.healthsci.tufts.edu/apua/Roar/roarhome.htm>, 2002.
  16. Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science.* 1992; 257: 1064-73.
  17. Ollson-Liljequist B, Larsson P, Walder M, Miorner H. Antimicrobial susceptibility testing in Sweden. III. Methodology for susceptibility testing. *Scand. J. Infect. Dis.* 1997; Suppl. 105: 13-23.
  18. Perreten V, Schwarz F, Cresta L, Boeglin M, Dasen G, Teuber M. Antibiotic resistance spread in food. *Nature* 1997; 389: 801-2.
  19. Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, Ehricht R, Kuhnert P, Frey J. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of Gram-positive bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 2291-302.
  20. Salyers AA. *Antibiotic Resistance Transfer in the Mammalian Intestinal Tract: Implications from Human Health, Food Safety and Biotechnology.* Springer-Verlag, 1995.
  21. Scientific Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed. Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J.* 2005; 223: 1-12.
  22. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 4089-94.
  23. Swenson JM, Ferraro MJ, Sahm DF, Charache P, Tenover FC. New vancomycin disk diffusion breakpoints for enterococci. The National Committee for Clinical Labo-

- ratory Standards Working Group on Enterococci. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 2525-28.
24. Teuber M, Meile L, Schwarz F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie Van Leeuwenhoek 1999; 76: 115-37.
25. Volkman H, Schwartz T, Bischoff P, Kirchen S, Obst U. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). J. Microbiol. Meth. 2004; 56: 277-86.
26. WHO. The Medical Impact of the Use of Antimicrobials in Food Animals. Report of a WHO Meeting, Berlin, Germany, 1997 13-17 October, WHO, Geneva.

## ENGLISH

### ANTIBIOTIC RESISTANCE OF LACTIC ACID BACTERIA

**Snežana Bulajić, Zora Mijačević, Radoslava Savić Radovanović**

Knowledge on the antibiotic resistance of lactic acid bacteria is still limited, possibly because of the large numbers of genera and species encountered in this group, as well as variances in their resistance spectra. The EFSA considers antibiotic resistances, especially transferable resistances, an important decision criterion for determining a strain's QPS status. There are no approved standards for the phenotypic or genotypic evaluation of antibiotic resistances in food isolates. Also, the choice of media is problematic, as well as the specification of MIC breakpoint values as a result of the large species variation and the possible resulting variation in MIC values between species and genera. The current investigations in this field showed that we might end up with a range of different species- or genus-specific breakpoint values that may further increase the current complexity. Another problem associated with safety determinations of starter strains is that once a resistance phenotype and an associated resistance determinant have been identified, it becomes difficult to show that this determinant is not transferable, especially if the resistance gene is not located on a plasmid and no standard protocols for showing genetic transfer are available. Encountering those problems, the QPS system should allow leeway for the interpretations of results, especially when these relate to the methodology for resistance phenotype determinations, determinations of MIC breakpoints for certain genera, species, or strains, the nondeterminability of a genetic basis of a resistance phenotype and the transferability of resistance genes.

Key words: lactic acid bacteria, antibiotic resistance

## РУССКИЙ

### АНТИБИОТИЧЕСКОЕ СОПРОТИВЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

**Снежана Булаич, Зора Миячевич, Радослава Савич Радованович**

Познания о сопротивлении на антибиотики бактерий молочной кислоты всё ещё ограниченные, вероятно из-за большего числа рода и видов, сущих у этой

группы, словно и из-за разниц в их спектре сопротивления. Европейское агенство для безопасности корма ЕАБК считает резистентность на антибиотики, отдельно переносливого сопротивления, важным критерием у принятия решения о квалифицированной оценке безопасности - КОБ статусу определённого штамма. Не существуют принятые стандарты для фенотипического и генотипического определения ценности сопротивления на антибиотики у изолятов корма. Также выбор медиа проблематичный, словно и спецификация минимальной ингибиторной концентрации МИК стоимости как следствие больших вариаций в виде и возможные являющиеся результатом вариации в МИК стоимостях между видами родами. Текущие исследования в этой области поазали, чтобы на конце мог получиться ряд различных МИК стоимостей специфических для вида или раода, которые бы могли ещё больше углубить теперешнюю комплексность. Ещё одна проблема, сущая в связи с определениями безопасности стартер штаммов, когда однажды идентифицируют фенотип сопротивления и ассоцированный детерминант сопротивления, становится тяжело показать, что этот детрминант не переносный, отдельно поскольку ген сопротивления не находится на плазмиде и послкольку не имеет стандартных протоколов для генетического трансфера. Вследствие существования таких проблем, система о квалифицированной оценке безопасности КОБ надо оставить пространства для интерпретации результатов, отдельно, когда они относятся на методологию определения фенотипа сопротивления, определения МИК стоимости для определённого рода, вида, или штамма, на невозможность устанавливания генетической базы фенотипа сопротивления, словно и переносность гена сопротивления.

Ключевые слова: бактерии молочной кислоты, антибиотическая резистентность