

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKЕ MEDICINE

Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog  
porekla



**Tijana Ledina, DVM**

**REZISTENCIJA NA TETRACIKLIN BAKTERIJA  
MLEČNE KISELINE IZOLOVANIH IZ  
TRADICIONALNIH SIREVA SRBIJE**

- Doktorska disertacija -

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE  
Department for Food Hygiene and Technology



**Tijana Ledina, DVM**

**TETRACYCLINE RESISTANCE IN LACTIC ACID  
BACTERIA ISOLATED FROM TRADITIONAL  
SERBIAN CHEESES**

- Doctoral Dissertation -

Belgrade, 2018.

## **MENTOR**

Dr Snežana Bulajić, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

## **ČLANOVI KOMISIJE**

Dr Vera Katić, redovni profesor u penziji

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Dejan Krnjaić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Irena Zdovc, vanredni profesor

Veterinarski fakultet Univerziteta u Ljubljani

Dr Jelena Miočinović, vanredni profesor

Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu

## **DATUM ODBRANE**

---

## ZAHVALNICA

*Iako se na koricama ovog doktorata nalazi samo jedan autor, ovaj doktorat je rezultat predanog rada većeg broja ljudi.*

*Želela bih da zahvalim mojoj mentorki, jer mi je prva pružila šansu, jer svoje znanje nesebično na svakom koraku deli sa mnom, motiviše me da budem bolja i veruje u mene i onda kada sama ne verujem.*

*Profesorkama Zori Mijačević i Veri Katić, jer me svojom mudrošću i strpljenjem uče šta znači biti pravi profesor.*

*Profesoru Milanu Baltiću, jer mi je nesebično pomogao dragocenim savetima, tretirajući me kao ravnopravnog člana svog tima.*

*Profesorkama Ireni Zdovc i Jeleni Miočinović i profesoru Dejanu Krnjaiću na razumevanju, kolegijalnosti, ažurnosti i dobronamernim savetima.*

*Kolektivu katedre, jer su me, kao pravi tim, sve vreme bodrili i podržavali.*

*Aleksandru Cojkiću, divnim ljudima i kolegama sa Zlatara i iz Sjenice, koji su mi obezbedili uzorke i time mi pomogli da prebrodim prvu i najveću prepreku.*

*Sjajnim kolektivima sa Instituta za mlekarstvo i probiotike na Biotehničkom fakultetu u Ljubljani i Katedri za mikrobiologiju i parazitologiju Veterinarskog fakulteta u Ljubljani. Svojom otvorenošću, ljubaznošću i nesebičnom spremnošću da pomognete, učinili ste da Slovenija bude moja druga kuća i da se radujem svakoj novoj saradnji sa vama.*

*Mojim prijateljima zbog beskrajnog strpljenja i podrške. Zahvalna sam što vas imam.*

*Mojoj porodici i Petru. Vi ste ti koji dajete smisao svemu, zbog vas se trudim da uvek budem bolja i da vam služim na ponos. Svaki uspeh u životu i sve ono što je dobro i vredno, posvećujem vama.*

*Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije deo su istraživanja u okviru projekta „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti” (Ev. br. 46010) i projekta “Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu” (Ev. Br. III 46009). Ove projekte finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

# REZISTENCIJA NA TETRACIKLIN BAKTERIJA MLEČNE KISELINE IZOLOVANIH IZ TRADICIONALNIH SIREVA SRBIJE

## Kratak sadržaj

Lanac hrane predstavlja jedan od mogućih puteva transmisije bakterija rezistentnih na antibiotike između populacija životinja i ljudi. Komensalne bakterije, poreklom od životinja, predstavljaju deo mikrobiote hrane životinjskog porekla, i često se prepoznaju kao „rezervoari“ gena za rezistenciju na antibiotike. Rezistencija na tetraciklin kod komensalnih bakterija je dobro dokumentovana i s obzirom da je prenosive prirode, koristi se kao model za praćenje ekologije rezistencije na antibiotike. Homoljski, zlatarski i sjenički sir su na nacionalnom nivou zaštićeni oznakom geografskog porekla. Proizvode se na tradicionalan način, od sirovog mleka, te bakterije mlečne kiseline, poreklom iz sirovine i/ili procesnog okruženja čine značajan deo mikrobiote tradicionalnih sireva Srbije. U naučnoj literaturi postoje brojni podaci o tome da bakterije mlečne kiseline mogu biti nosioci gena za rezistenciju na antibiotike.

Ciljevi ove doktorske disertacije bili su: karakterizacija biodiverziteta tradicionalnih sireva Srbije, utvrđivanje fenotipa i prevalencije rezistencije na antibiotike i genetske baze rezistencije na tetraciklin kod izolata bakterija mlečne kiseline poreklom iz tradicionalnih sireva, kao i mogućnosti prenosa *tet* gena u uslovima *in vitro*.

Ukupno 48 uzoraka tradicionalnih sireva (13 uzoraka homoljskog sira, 20 zlatarskog i 15 uzoraka sjeničkog sira), zasejano je na MRS-S agar radi utvrđivanja broja BMK i na MRS-S agar sa dodatkom tetraciklina u dvostrukorastućim koncentracijama (1-256 µg/ml), kako bi se utvrdila zastupljenost populacije BMK rezistentne na tetraciklin. Prosečan broj BMK u uzorcima homoljskog sira iznosio je  $7,65 \pm 1,09$  log CFU/g, u uzorcima zlatarskog sira  $7,74 \pm 0,6$  log CFU/g i u uzorcima sjeničkog sira  $7,47 \pm 0,71$  log CFU/g. Pri koncentraciji tetraciklina od 64 µg/ml primećeno je veće smanjenje broja BMK. U uzorcima homoljskog sira broj BMK je iznosio  $3,98 \pm 2,28$  log

CFU/g, u uzorcima zlatarskog sira  $3,35 \pm 2,02$  log CFU/g i u uzorcima sjeničkog sira  $3,93 \pm 2,24$  log CFU/g. Na osnovu bojenja po Gram-u i reakcije katalaze izabrano je 223 primoizolata koji su vodili poreklo sa MRS-S agara i MRS-S agara u koje je dodat tetraciklin. Primenom metode rep-PCR sa (GTG)<sub>5</sub> prajmerom, 162 (72,65%) izolata BMK pokazalo je različite rep-PCR „fingerprint“ tipove. MALDI TOF masena spektrometrija se pokazala kao pouzdana metoda u identifikaciji BMK poreklom iz tradicionalnih sireva. Identifikovano je 155 (95,68%) izolata, a mikrobiotu BMK tradicionalnih sireva su činele sledeće vrste: *Lactobacillus plantarum* (23,87%), *Lactobacillus paracasei* (18,71%), *Lactobacillus brevis* (8,39%), *Lactobacillus kefir* (3,22%), *Lactobacillus curvatus* (1,93%), *Lactobacillus parakefiri* (1,29%), *Lactobacillus paraplantarum* (0,65%), *Lactobacillus coryniformis* (0,65%), *Lactobacillus diolivorans* (0,65%), *Leuconostoc mesenteroides* (11,61%), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (1,29%), *Enterococcus faecalis* (10,98%), *Enterococcus durans* (3,22%), *Lactococcus lactis* (9,03%), *Lactococcus garvieae* (3,22%) i *Pediococcus pentosaceus* (1,29%). Za ispitivanje osetljivosti na antibiotike kod izolata BMK korišćena je mikrodiluciona metoda u mikrotitracionim pločama. Najzastupljeniji fenotip rezistencije kod izolata BMK bila je rezistencijana aminoglikozidne antibiotike. Rezistencija na kanamicin je utvrđena kod 50 (37,59%) izolata, rezistencija na streptomycin kod 21 (21,88%) izolata. Rezistencija na tetraciklin je predstavljala karakteristiku 21 (13,55%) izolata BMK. Prevalencija ostalih fenotipa rezistencije bila je: klindamicin (11,28%), hloramfenikol (7,74%), eritromicin (5,81%) i ampicilin (0,65%). Primenom PCR reakcije, *tet(M)* gen je utvrđen kod 4 (2,58%) izolata BMK: dva izolata *Enterococcus faecalis*, jednog izolata *Lactococcus lactis* i jednog izolata *Lactobacillus paracasei*. Kod jednog izolata *Enterococcus faecalis* dokazano je prisustvo *tet(M)* i *tet(L)* gena. Primenom modifikovane metode konjugacije „*filter mating*“ na agaru utvrđen je prenos *tet(M)* gena sa izolata *Enterococcus faecalis* 202 na *Enterococcus faecalis* JH2-2, sa niskom frekvencijom prenosa.

Rezultati istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije ukazuju da tradicionalni sirevi Srbije, s obzirom na utvrđenu prevalenciju rezistencije na

tetraciklin, kao i prevalenciju *tet* gena kod izolata BMK, predstavljaju bezbedne proizvode. Rezultati ove doktorske disertacije daju doprinos proceni bezbednosti tradicionalnih sireva Srbije, koja je neophodna kako bi ovi proizvodi mogli da se plasiraju na svetsko tržište i time postanu prepoznatljivi i van granica naše zemlje.

**Ključne reči:** tradicionalni sirevi Srbije, bakterije mlečne kiseline, rezistencija na tetraciklin

**Naučna oblast:** Veterinarska medicina

**Uža naučna oblast:** Higijena i tehnologija mleka

**UDK broj:** 637.28'142.2:582.33:577.54



# TETRACYCLINE RESISTANCE IN LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM TRADITIONAL SERBIAN CHEESES

## Summary

Food chain may represent a possible route for the transmission of antibiotic resistant bacteria between human and animal populations. Commensal bacteria originating from food-producing animals can contaminate food and by that means become a part of the complex food microbiota. Commensal bacteria can also serve as reservoirs for the antibiotic resistance genes. Tetracycline resistance in commensal bacteria is well documented and is coded with transmissible genes. Therefore, it is recognized as a model for the monitoring of antibiotic resistance ecology. Homolj, Zlatar and Sjenica cheese have protected geographical indication on the national level. As Homolj, Zlatar and Sjenica cheese are raw milk cheeses produced in the traditional manner, LAB originating from the raw milk and the environment constitute an important part of Serbian traditional cheeses' microbiota. There are many data in the scientific literature that LAB can carry transmissible antibiotic resistance genes.

The aims of this doctoral dissertation were to: characterize biodiversity of traditional Serbian cheeses; determine phenotype and prevalence of antibiotic resistance; define genetic basis of tetracycline resistance in the LAB isolates and to investigate possibility for *in vitro* transmission of the *tet* genes.

Total of 48 samples traditional Serbian cheeses (13 samples of Homolj cheese, 20 samples of Zlatar cheese and 15 samples of Sjenica cheese) were analyzed. All samples were plated on MRS-S agar plates in order to determine LAB count and on MRS-S agar plates with added tetracycline in doubling concentrations (1-256 µg/ml), in order to determine tetracycline resistant LAB subpopulation count. Average count of LAB in Homolj cheese was  $7,65 \pm 1,09$  log CFU/g, in Zlatar cheese  $7,74 \pm 0,6$  log CFU/g and in Sjenica cheese  $7,47 \pm 0,71$  log CFU/g. Addition of tetracycline in concentration of 64 µg/ml has considerably reduced LAB count, which was in Homolj cheese  $3,98 \pm 2,28$  log CFU/g, in Zlatar cheese  $3,35 \pm 2,02$  log CFU/g and in Sjenica cheese  $3,93 \pm 2,24$  log CFU/g.

Two hundred twenty three Gram positive, catalase negative isolates were chosen for further analyzing. LAB isolates were genotyped using rep-PCR fingerprinting method with (GTG)<sub>5</sub> primer where 162 (72,65%) isolates showed unique fingerprints.

Since 155 (95,68%) LAB isolates were successfully identified by MALDI TOF mass spectrometry, it proved as a reliable method for the LAB identification. Microbiota of the traditional Serbian cheeses was identified as following species: *Lactobacillus plantarum* (23,87%), *Lactobacillus paracasei* (18,71%), *Lactobacillus brevis* (8,39%), *Lactobacillus kefir* (3,22%), *Lactobacillus curvatus* (1,93%), *Lactobacillus parakefiri* (1,29%), *Lactobacillus paraplantarum* (0,65%), *Lactobacillus coryniformis* (0,65%), *Lactobacillus diolivorans* (0,65%), *Leuconostoc mesenteroides* (11,61%), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (1,29%), *Enterococcus faecalis* (10,98%), *Enterococcus durans* (3,22%), *Lactococcus lactis* (9,03%), *Lactococcus garvieae* (3,22%) and *Pediococcus pentosaceus* (1,29%). Microdilution method in microtiter plates was used for the antibiotic susceptibility testing. The most prevalent antibiotic resistance in LAB isolates was the resistance to aminoglycoside antibiotics, since 50 (37,59%) LAB isolates showed resistance to kanamycin 21 (21,88%) LAB isolates showed resistance to streptomycin. Resistance to tetracycline was detected in 21 (13,55%) LAB isolates. Prevalence of the resistance to other antibiotics was as following: clindamycin (11,28%), gentamycin (8,39%) chloramphenicol (7,74%), erythromycin (5,81%) and ampicillin (0,65%).

Genetic basis of tetracycline resistance was examined by PCR method. The presence of *tet*(M) gene was detected in 4 (2,58%) LAB isolates: 2 *Enterococcus faecalis* isolates, 1 *Lactococcus lactis* isolate and 1 *Lactobacillus paracasei* isolate. In one *Enterococcus faecalis* isolate the simultaneous presence of *tet*(M) and *tet*(L) gene was detected. Transfer of *tet*(M) gene from *Enterococcus faecalis* 202 to *Enterococcus faecalis* JH2-2 was determined using modified conjugation method "filter mating" in agar, with low transfer rate.

Results from this doctoral dissertation have shown that traditional Serbian cheeses are safe for the consumption regarding the prevalence of tetracycline resistance in LAB and the presence of *tet* genes. The results can contribute to safety assessment of these products in order to place Serbian traditional cheeses on the international market and by that means, make them more recognizable in the World.

**Key words:** Serbian traditional cheeses, lactic acid bacteria, tetracycline resistance

**Major Field of Study:** Veterinary Medicine

**Special Field of Study:** Milk Hygiene and Technology

**UDC number:** 637.28'142.2:582.33:577.54

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	5
2.1. Ekologija rezistencije na antibiotike i značaj lanca hrane u širenju rezistencije na antibiotike.....	5
2.2. Uloga komensalnih bakterija poreklom iz hrane u širenju rezistencije na antibiotike.....	12
2.3. Tradicionalni sirevi Srbije.....	15
2.4. Specifičnost biodiverziteta u sirevima od sirovog mleka.....	19
2.5. Rezistencija na antibiotike kod bakterija mlečne kiseline.....	23
2.6. Tetraciklin rezistom.....	29
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA.....	32
4. MATERIJAL I METODE.....	34
4.1. Materijal .....	34
4.2. Metode .....	34
4.2.1. Zastupljenost bakterija mlečne kiseline i subpopulacije bakterija mlečne kiseline rezistentne na tetraciklin .....	34
4.2.1.1. Izolacija i određivanje broja bakterija mlečne kiseline iz tradicionalnih sireva.....	34
4.2.2. Genotipizacija izolata bakterija mlečne kiseline i odabir reprezentativnih izolata za dalja ispitivanja .....	35
4.2.2.1. Ekstrakcija ukupne DNK iz izolata bakterija mlečne kiseline.....	35
4.2.2.2. Umnožavanje gena sa (GTG) <sub>5</sub> prajmerom za rep-PCR.....	36
4.2.3. Identifikacija izolata bakterija mlečne kiseline.....	37
4.2.3.1. Identifikacija vrsta bakterija mlečne kiseline primenom MALDI TOF masene spektrometrije .....	37
4.2.4. Utvrđivanje profila fenotipske rezistencije na odabrane antibiotike kod izolata bakterija mlečne kiseline .....	38
4.2.4.1. Ispitivanje osetljivosti na odabrane antibiotike kod izolata bakterija mlečne kiseline .....	38
4.2.5. Ispitivanje prisustva odabranih gena za rezistenciju na tetraciklin kod izolata bakterija mlečne kiseline .....	42
4.2.5.1. Umnožavanje gena za rezistenciju na tetraciklin <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(C)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> i <i>tet(W)</i> .....	42
4.2.6. Ispitivanje mogućnostiprenosa gena za rezistenciju na tetraciklin na odabrane recipijente u uslovima <i>in vitro</i> .....	44

4.2.6.1. Ispitivanje mogućnosti prenosa gena za rezistencije na tetraciklin sa izolata bakterija mlečne kiseline na odabrane recipijente primenom metode "filter mating" na agaru .....	44
4.3. Statistička analiza podataka .....	45
5. REZULTATI .....	46
5.1. Zastupljenost bakterija mlečne kiseline i subpopulacije bakterija mlečne kiseline rezistentne na tetraciklin.....	46
5.2. Genotipizacija izolata bakterija mlečne kiseline i odabir reprezentativnih izolata za dalja ispitivanja .....	51
5.3. Identifikacija izolata bakterija mlečne kiseline.....	53
5.4. Ispitivanje osetljivosti na odabrane antibiotike kod izolata bakterija mlečne kiseline ....	58
5.5. Ispitivanje prisustva odabranih gena za rezistenciju na tetraciklin kod izolata bakterija mlečne kiseline.....	73
5.6. Ispitivanje mogućnosti prenosa gena za rezistenciju na tetraciklin na odabrane recipijente u uslovima <i>in vitro</i> .....	74
6. DISKUSIJA.....	77
7. ZAKLJUČCI .....	96
8. LITERATURA .....	98
9. PRILOG .....	118

## **SPISAK SKRAĆENICA**

BHI – *engl.* Brain Heart Infusion

BMK – bakterije mlečne kiseline

CFU – *engl.* Colony-forming unit

CHCA – *engl.*  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid

EDTA – *engl.* Ethylenediaminetetraacetic acid

EFSA – *engl.* European Food Safety Authority

EUCAST – *engl.* European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FEEDAP – *engl.* Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed

GRAS – *engl.* Generally Recognized As Safe

ISO – *engl.* International Organization for Standardization

LAB – *engl.* Lactic Acid Bacteria

LSM – *engl.* Lactic Acid Bacteria susceptibility testing medium

MALDI TOF – *engl.* Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight

MIC – *engl.* Minimum inhibitory concentration

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MRS – *engl.* de Man, Rogosa, Sharpe

MRS-S – *engl.* de Man, Rogosa, Sharpe + sorbic acid

PCR – *engl.* Polymerase chain reaction

PMF – *engl.* Peptide mass fingerprint

QPS – *engl.* Qualified Presumption of Safety

rep-PCR – *engl.* Repetitive element palindromic polymerase chain reaction

TAE – *engl.* Tris-acetate-EDTA

## 1. UVOD

Problem rezistencije na antibiotike star je koliko i sama upotreba antibiotika. Samo nekoliko godina po uvođenju antibiotika u medicinsku praksu, tačnije 50-ih godina prošlog veka, zabeležena je po prvi put i rezistencija na njih (Levy, 1997). Rezistencija na antibiotike predstavlja prirodni fenomen i vrlo verovatno se razvila daleko pre kliničke primene antibiotika u tzv. „preantibiotskoj“ eri. Geni za rezistenciju mogu voditi poreklo od bakterija, prirodnih producenata antimikrobnih materija, koje su snabdevene takvim genima u cilju samozaštite (Davies, 1997). Drugi potencijalni izvor gena za rezistenciju mogu predstavljati geni čiji produkti imaju ulogu u metabolizmu bakterija. Takvi geni su, tokom evolucije, mogli biti izloženi „pametnim“ mutacijama, koje su izmenile spektar supstrata; po mutaciji, supstrat predstavlja antibiotik u odnosu na pređašnje metaboličke supstrate. Ipak, delovanjem čoveka stvoren je ogroman selektivni pritisak, koji, ne samo da je favorizovao opstanak rezistentnih bakterija, već je i podstakao razmenu gena rezistencije na antibiotike unutar i između populacija bakterija (Allen i sar., 2010). Pored direktne selekcije odgovarajućih gena za rezistenciju, prekomerna upotreba jedne grupe antibiotika omogućava ujedno i koselekciju, ali i rekombinaciju, fiksaciju i povećanje prevalencije gena za rezistenciju i na druge antibiotike u populacijama bakterija različitih ekosistema.

Evolucija rezistencije na antibiotike u mikrobnim zajednicama je pojačana mehanizmima lateralnog transfera gena za rezistenciju, putem konjugativnih plazmida, transpozona, integrona i insercionih elemenata, kao i bakteriofaga i profaga (Davies, 1994). Mehanizmi lateralnog transfera gena ne poznaju granice vrsta i rodova bakterija. Usvajajući ekološku dimenziju rezistencije na antibiotike, jasno je da mikrobnii ekosistemi ne opstaju u izolaciji, već se beleži opsežna razmena gena između njih (Aminov i Mackie, 2007).

Decenije primene antibiotika u veterinarskoj praksi kao promotora rasta, i/ili u profilaktičke, metafilaktičke i terapijske svrhe, ali i zloupotrebe antibiotika, doveli su i do selekcije rezistentnih bakterija u organizmu životinja koje se koriste za dobijanje hrane (Teuber, 2001; Wegener, 2003). Iako je zabrana korišćenja antibiotika u Evropskoj uniji kao promotora rasta i primena regulativa za njihovo razumno korišćenje u veterinarskoj medicini dovela do postepenog smanjenja rezistencije (Wegener, 2003), još uvek se beleži značajna prevalencija rezistentnih bakterija poreklom od životinja (Allen, 2014).

U današnje vreme, opravdano je razmišljanje da komensalne bakterije, usled njihove raširenosti u različitim ekosistemima i brojnosti, predstavljaju značajan rezervoar gena za rezistenciju na antibiotike (Marshall i sar., 2009). Time populacija komensala postaje veoma značajna u spoznavanju mehanizama perzistencije i širenja gena rezistencije u mikrobnom svetu (Levy i Miller, 1989). Takvi „rezervoar“ organizmi se mogu naći i u različitoj hrani, pre svega u fermentisanim proizvodima od sirovog mleka i mesa, koji u velikom broju sadrže nepatogene bakterije, kao posledicu mnogostrukih izvora kontaminacije tokom procesa proizvodnje. Kod fermentisanih proizvoda od sirovog mleka i mesa izostaje termička obrada i time populacija komensala poreklom od životinja i/ili procesnog okruženja, opstaje i u velikom broju se nalazi i u gotovim proizvodima. Na ovaj način, lanac hrane predstavlja jedan od mogućih puteva transmisije rezistentnih bakterija poreklom od životinja na ljude (Witte, 2000).

Iako rezistentne komensalne bakterije, same po sebi, ne predstavljaju rizik po zdravlje ljudi, daleko je veća mogućnost da se lateralni transfer gena za rezistenciju odvija sa mnogobrojnih i ubikvitarnih komensala na patogene bakterije, nego da se razmena gena odvija unutar populacije manje brojnih patogenih bakterija (Andremont i sar., 2003).

Rezistencija na tetraciklin je veoma dobro dokumentovana sa više od 40 opisanih gena koji se uglavnom nalaze na mobilnim genetskim elementima, poput plazmida i



transpozona (Thaker i sar., 2010; Roberts i Schwarz, 2016). Potvrđeno je da se determinante rezistencije na tetraciklin uspešno razmenjuju između različitih populacija bakterija, uključujući razmenu i između filogenetski nesrodnih bakterija. Uzevši u obzir činjenice da su tetraciklini grupa antibiotika koja se najčešće koristi u humanoj i veterinarskoj medicini, prenosivu prirodu rezistencije na tetracikline, kao i da je rezistencija na tetraciklin jedan od najčešćih profila rezistencije među populacijom komensalnih bakterija, ovaj oblik rezistencije predstavlja savršen model za monitoring molekularne ekologije gena za rezistenciju na antibiotike.

Srbija ima dugu tradiciju proizvodnje i konzumiranja belih sireva u salamuri. O popularnosti belih sireva u salamuri govori i podatak da čak 60% od ukupne potrošnje sireva u Srbiji predstavljaju ovi sirevi (Donnelly, 2016). U najpoznatije predstavnike belih sireva u salamuri, koji su u Srbiji zaštićeni oznakom geografskog porekla, spadaju zlatarski, sjenički i homoljski sir. Ovi sirevi se proizvode od sirovog mleka na tradicionalan način u malim seoskim domaćinstvima. Tradicionalni sirevi sadrže jedinstvenu mikrobiotu, u kojoj se kako po brojnosti, tako i po diverzitetu, ističu predstavnici bakterija mlečne kiseline (BMK). Izuzetan diverzitet BMK posledica je upotrebe sirovog mleka, domaćeg sirila i salamure, ali i odsustva dodavanja komercijalnih starter kultura (Golić i sar., 2013). Proces proizvodnje kod ovih sireva nije standardizovan, usled čega varijacije u sastavu mleka, temperaturi podsiravanja, dužini koagulacije, obradi gruša i periodu zrenja ovih sireva, dodatno doprinose diverzitetu populacije BMK (Veljovic i sar., 2007). Profili rezistencije na antibiotike kod bakterija koje predstavljaju dominantnu populaciju nekog ekosistema, kao što su bakterije mlečne kiseline kod tradicionalnih sireva, indikatori su selektivnog pritiska koji dotični mikrobiom podnosi u uslovima kontaminacije niše antibioticima. Na ovaj način, utvrđivanje profila fenotipske rezistencije kod bakterija mlečne kiseline može poslužiti kao svojevrsni barometar, odnosno daje mogućnost predviđanja razvoja određenog tipa rezistencije i kod patogenih bakterija. U današnje vreme u naučnoj literaturi postoji veliki broj podataka o tome da BMK imaju ulogu posrednika u razmeni

gena rezistencije na antibiotike između mikrobioma ljudi i životinja (Teuber i sar., 1999; Teuber, 2001; Allen, 2014).

U Republici Srbiji ne postoji kontrola upotrebe antibiotika u veterinarskoj praksi, kao ni nacionalni program monitoringa rezistencije, pa tako prevalencija rezistencije na antibiotike kod bakterija poreklom od životinja, ali i hrane životinjskog porekla, ostaju nepoznanica. Ispitivanje prevalencije fenotipske rezistencije, kao i utvrđivanje genetske baze rezistencije na tetraciklin kod rezistentne subpopulacije BMK poreklom iz tradicionalnih sireva Srbije, te mogućnosti prenosa gena rezistencije sa BMK na druge bakterije, predstavlja dobar način da se dobiju vredni podaci, koji bi, jednim delom, omogućili objektivnu procenu rizika u odnosu na potrošnju sireva od sirovog mleka.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Ekologija rezistencije na antibiotike i značaj lanca hrane u širenju rezistencije na antibiotike

Rezistencija na antibiotike predstavlja jedan od najvećih problema sa kojim se čovečanstvo suočava u 21. veku. Kako bi se taj problem racionalno sagledao i efikasno rešavao, neophodno je razumevanje evolucije bakterija rezistentnih na antibiotike i sagledavanje glavnih puteva diseminacije gena rezistencije kroz životnu sredinu, odnosno različite ekosisteme (Wang i sar., 2006).

Rezistencija na antibiotike predstavlja veoma složen ekološki fenomen, koji je nastao daleko pre nego što su antibiotici počeli da se koriste u medicini. U prilog ovoj tvrdnji ide i činjenica da je rezistencija na antibiotike utvrđena i kod bakterija poreklom iz „preantibiotske“ ere (Martínez, 2012). Pored toga, geni za rezistenciju na antibiotike izolovani su iz mikrobni zajednica kod kojih antropogeni uticaj izostaje ili je veoma mali (Allen i sar., 2010). Rezistencija na antibiotike, kao karakteristika mnogih prirodnih mikrobni zajednica, ima brojne funkcije:

- 1) antibiotici imaju ulogu u „*quorum sensing*“-u među bakterijama (Henke i Bassler, 2004);
- 2) bakterije koji sintetišu antibiotike, poseduju i gene za rezistenciju na iste antibiotike, kao vid odbrambenog mehanizma (Hopwood, 2007);
- 3) određene klase „*efflux*“ pumpi koje služe za uklanjanje antibiotika iz bakterijske ćelije, neselektivni su mehanizmi i kao takvi ne uklanjaju samo antibiotike već i druge supstance, koje za bakterijsku ćeliju mogu da budu toksične (Poole, 2005).

Sasvim sigurno aktivnost čoveka nije imala uticaj na nastanak rezistencije na antibiotike, koja je verovatno stara koliko i same bakterije. Međutim, van svake sumnje,

antropogeni faktor jeste uslovio selekciju prenosive rezistencije na antibiotike i kruženje rezistentnih bakterija kroz različite ekosisteme (Stokes i sar., 2011).

U veterinarskoj praksi u današnje vreme, antibiotici se koriste iz različitih razloga: pre svega u terapijske svrhe, ali i za prevenciju i kontrolu bakterijskih oboljenja kod životinja (Marshall i Levy, 2011) . Ipak, do 2006. godine kada je ovakva praksa zabranjena u zemljama Evropske unije, najveći udeo u potrošnji antibiotika u veterinarskoj praksi odnosio se na upotrebu antibiotika kao promotora rasta (Cogliani i sar., 2011).

Zabrinutost evropskih stručnjaka za posledice upotrebe antibiotika kao promotora rasta, prvi put je iznesena u javnost 1950-ih godina, nedugo posle početka njihove primene u ove svrhe. U Velikoj Britaniji je 1969. godine od strane britanske vlade osnovan "Swann"-ov komitet, kao odgovor na otkriće prenosive rezistencije na oksitetraciklin kod *Salmonella enterica* serovar Typhimurium izolovanih iz životinja. Ovo otkriće je u mnogim evropskim državama u periodu 1972-1974. dovelo do zabrane upotrebe penicilina, streptomicina i tetraciklina kao promotora rasta.

Naučne studije tokom kasnih 70-ih i početkom 80-ih godina prošlog veka (Cogliani i sar., 2011) uspostavljaju vezu između primene promotora rasta u uzgoju farmских životinja i pojave, širenja i prenosa gena rezistencije sa bakterija poreklom od životinja na patogene bakterije kod ljudi, naglašavajući tri važna principa:

1. Niske, subterapeutske doze antibiotika selekcionišu rezistenciju na te iste antibiotike;
2. Rezistencija na antibiotike, koji se primenjuju u humanoj medicini, određena je istim mehanizmima kao i rezistencija na antibiotike koji se primenjuju u veterinarskoj medicini;
3. Geni za rezistenciju na antibiotike se šire putem lanca hrane, a postoji i mogućnost njihovog prenosa na mikrobiotu gastrointestinalnog trakta ljudi.

Švedska je prva država koja je 1986. godine u potpunosti zabranila upotrebu antibiotika kao promotora rasta. Vredna pažnje jeste činjenica da su sami švedski

farmeri zahtevali zabranu, budući da je izveštaj iz 1984. godine pokazao da je poverenje potrošača u bezbednost mesa značajno smanjeno nakon obelodanjivanja podatka da se na godišnjem nivou u Švedskoj troši 30 tona antibiotika u uzgoju životinja.

Zanimljiv slučaj povezanosti upotrebe antibiotika kao promotora rasta i rezistencije na antibiotike predstavlja i primer vankomicin-rezistentnih enterokoka, koje su ranih 1990-ih godina prvi put otkrivene kod pacijenata u bolničkim sredinama u Evropi. U potrazi za rezervoarima ovog oblika rezistencije, došlo se do otkrića da su rezervoar gena za rezistenciju na vankomicin predstavljali meso životinja i stajnjak poreklom sa farmi gde je avoparcin korišćen kao promotor rasta. Avoparcin nikada nije korišćen u svrhu lečenja ljudi, već se isključivo koristio u uzgoju životinja kao promotor rasta, ali geni koji kodiraju rezistenciju na avoparcin su isti oni koji kodiraju i rezistenciju na vankomicin, poslednji antibiotik izbora za neke komplikovane bakterijske infekcije ljudi. Upotreba avoparcina je tako, zbog nepoznavanja ekologije i genetske baze rezistencije na antibiotike, dovela do ozbiljnog problema u humanoj medicini, koji je poništio sve pozitivne efekte koje je upotreba avoparcina postigla u svrhu promovisanja rasta životinja. Saznanja o štetnim efektima upotrebe antibiotika kao promotora rasta, dovela su do toga da je 2006. godine u zemljama Evropske unije zabranjena upotreba antibiotika u te svrhe kod životinja koje se uzgajaju za hranu (Cogliani i sar., 2011). Glavni cilj zabrane jeste da se smanji rezistencija na antibiotike kod bakterija poreklom od farmских životinja. Smanjenje „*pool*”-a gena za rezistenciju kod farmских životinja je deo većeg, globalnog plana – sačuvati terapijsku efikasnost antibiotika za buduće naraštaje.

Međutim, i pored zabrane primene antimikrobnih preparata u svrhu stimulacije rasta životinja na području EU, mnoge druge zemlje širom sveta nemaju tako restriktivnu politiku. Zabrana primene promotora rasta u uzgoju životinja ne postoji u Japanu, Kanadi, Hong Kongu, Kini, Australiji, Brazilu, Ukrajini, dok za Rusiju nema podataka (Maron i sar., 2013). Pored toga, podaci o korišćenju antibiotika na području Holandije ukazuju da zabranom primene promotora rasta 2006. godine, terapijska primena antibiotika raste do nivoa koji ukupnu potrošnju antibiotika drži na stalnom

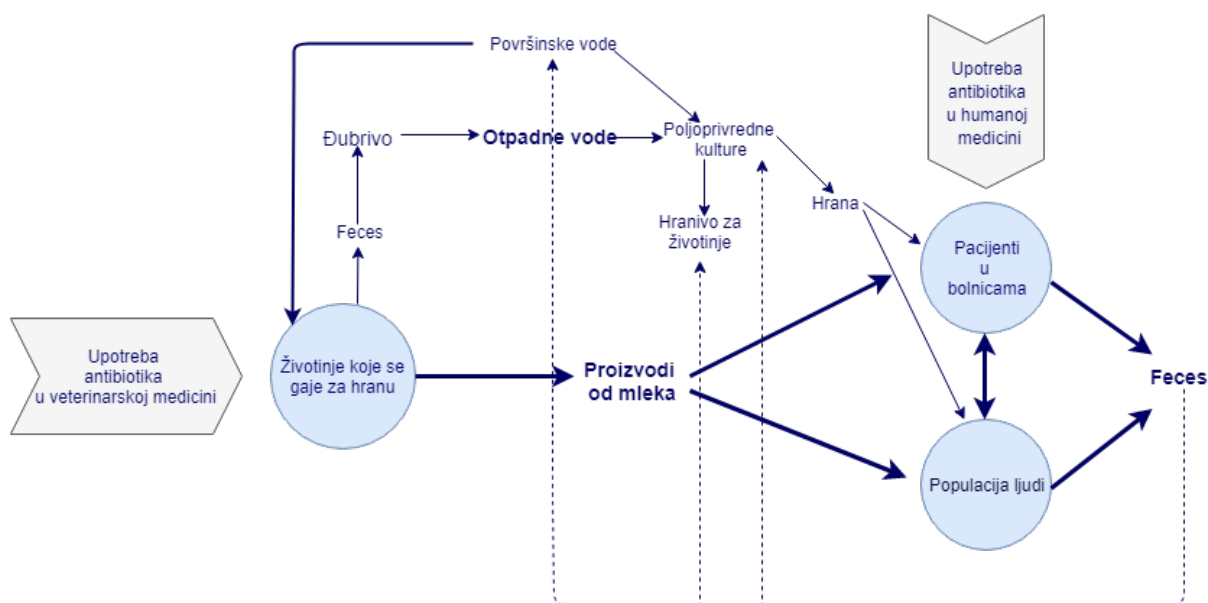
nivou, što naglašava potrebu da se jasno definiše što predstavlja terapijsku, a što neterapeutsku primenu antibiotika. Nemački zakon navodi da su antibiotici dozvoljeni da se koriste u tretmanu obolelih životinja i pritom jasno naglašava da se antibiotici ne mogu koristiti u tretmanu oboljenja koja nastaju kao rezultat „uslova gajenja životinja“ (Global Agricultural Information Network, 2011).

Međutim, postojala su i druga razmišljanja, koja nisu odobravala zabranu primene antibiotika kao promotora rasta. Naučni komitet o ishrani životinja (Scientific Committee on Animal Nutrition, 1996, 1998) u to vreme smatra da ne postoji dovoljna količina dokaza kako bi se opravdala zabrana primene promotora rasta. Zajednički izveštaj Nacionalnog instituta za istraživanje i Instituta za medicinu (Institute of Medicine National Research Council, 1999) ističe da „predstavljanjem nepotpunih činjenica, snagom autoritativnog mišljenja, pojedine projekcije o mogućem, mada ne i neophodno verovatnom biološkom događaju, začas istkaju sumornu sliku budućnosti.“ Phillips i sar. (2004) ističu da nepotpuna spoznaja o farmakokinetici i farmakodinamici promotora rasta, kao i nepostojanje odgovarajućeg surogat markera za određivanje koncentracije promotora na ciljnom mestu delovanja, a time i spekulativno nagađanje o aktuelnoj koncentraciji antibiotika promotora kojoj je tokom vremena izložena intestinalna mikrobiota ljudi, onemogućava iznošenje objektivnog mišljenja o tome da primena antibiotika u uzgoju životinja uvek rezultira u razvoju rezistencije kod bakterija.

Način primene antibiotika u veterinarskoj praksi često podrazumeva upotrebu manjih doza antibiotika tokom dužeg vremenskog perioda, što dovodi do selektivnog pritiska u populacijama bakterija, pri čemu preživljavaju samo one koje su rezistentne na primenjeni antibiotik (Marshall i Levy, 2011). Na razvoj rezistencije ne utiče samo količina i dužina primene antibiotika, već i broj jedinki kod kojih se antibiotik primenjuje. U veterinarskoj praksi se neretko istovremeno tretira veliki broj životinja što dodatno favorizuje opstanak rezistentnih mikroorganizama. Uzevši sve navedeno u obzir, može se reći da svaka pojedinačna životinja primenom antibiotika na ovaj način, ima potencijal da postane „fabrika“ za umnožavanje rezistentnih bakterija, a ujedno i

rezervoar za njihovo rasejavanje kroz različite ekosisteme (Marshall i Levy, 2011). Rezistentne bakterije se nadalje mogu širiti kroz različite sredine i prenositi na ljude direktnim kontaktom sa životinjama, ali i indirektno, putem vode, vazduha ili konzumacijom hrane životinjskog porekla (Marshall i Levy, 2011; Rossi i sar., 2014).

Putevi kontaminacije i kruženje rezistencije na antibiotike u različitim sredinama prikazani su na Slici 2.1.1.



**Slika 2.1.1.** Putevi kontaminacije i širenja rezistencije u različitim sredinama (Witte, 2000).

Rezultati naučnih istraživanja ukazuju na to da bakterije koje potiču iz hrane, od životinja i iz vodotokova, predstavljaju izvore gena za rezistenciju na antibiotike, ali još uvek nije poznato koji izvor, u ekološkoj dimenziji, ima najveći uticaj na širenje rezistencije (Marshall i sar., 2009). Iako je utvrđeno da životinje koje se gaje za dobijanje hrane učestvuju u diseminaciji gena za rezistenciju (Singer i sar., 2003), kao i da do razmene gena dolazi između populacija ljudi i životinja, nije poznato gde se nalazi začetak ovog problema. Iz tog razloga, neophodna je kontinuirano ispitivanje mikrobiote, kako kod ljudi, tako i kod životinja, da bi se razumeo celokupni ekološki fenomen rezistencije na antibiotike (Allen, 2014). Mnoga opsežna istraživanja su

pružila neoborive dokaze da je hrana životinjskog porekla opterećena rezistentnim bakterijama, odnosno genima za rezistenciju na antibiotike. Ipak, za nauku predstavlja pravi izazov da se dokaže da li, i u kojoj meri, konzumiranje hrane životinjskog porekla predstavlja rizik za ljude u pogledu širenja rezistencije na antibiotike, jer su putevi transmisije bakterija i transfera gena za rezistenciju na putu od farme do konzumenta izuzetno složeni. Razvoj i napredak novih molekularnih metoda je obećavajući u pogledu razrešavanja ovog izuzetno kompleksnog pitanja bezbednosti hrane. Takođe, stalno nadopunjavanje znanja iz ove oblasti je neophodan faktor da se konačno odgovori koja je stvarna uloga lanca hrane u fenomenu rezistencije na antibiotike (Marshall i Levy, 2011).

Lanac hrane zauzima veoma važno mesto u prenosu rezistentnih bakterija između populacija ljudi i životinja pri čemu do prenosa gena sa rezistentnih na osetljive bakterije može doći kako tokom procesa proizvodnje, tako i tokom tranzita kroz gastrointestinalni trakt ljudi (Rossi i sar., 2014). Fermentisani proizvodi od mleka u koje spadaju i sirevi, a u čijem matriksu se postiže velika gustina bakterijskih ćelija tokom zrenja, predstavljaju najvažnije namirnice u pogledu razmene gena za rezistenciju između populacija komensalnih i patogenih bakterija (Nawaz i sar., 2011). Sirevi dobijeni od sirovog mleka imaju naročiti značaj, jer predstavljaju optimalan vehikulum uz pomoć koga rezistentne bakterije poreklom od životinja dospevaju do digestivnog trakta ljudi (Mathur i Singh, 2005). Značaj sireva dobijenih od sirovog mleka u širenju rezistencije, ogleda se u sledećim činjenicama:

1. broj komensalnih bakterija u ovakvim proizvodima je izuzetno velik, jer usled nedostatka termičkog tretmana nema redukcije broja bakterija, kako onih koje vode poreklo od same životinje, tako i bakterija koji u proizvod dospevaju iz procesnog okruženja;
2. raznovrsnost mikrobiote proizvoda dobijenih od sirovog mesa i mleka je izuzetno velika i specifična za svaki pojedinačni proizvod, pa u gastrointestinalni trakt konzumenata dospeva veliki broj genetski raznovrsnih bakterija.



Dospevanjem rezistentnih bakterija u gastrointestinalni trakt ljudi, ostvaruju se optimalni uslovi za genetsku razmenu, između ostalih i gena za rezistenciju na antibiotike. U uslovima kada postoji velika gustina bakterija omogućen je blizak kontakt pojedinačnih ćelija što predstavlja i osnovni preduslov da do razmene gena dođe (Mathur i Singh, 2005; Marshall i sar., 2009; Devirgiliis i sar., 2011).

Phillips i sar. (2004) daju kritični pregled objavljenih podataka o uzročno-posledičnoj vezi primene antibiotika kod životinja koje služe za proizvodnju hrane i razvoja rezistencije kod ljudi. Autori ističu da većina dokaza o potencijalu transfera rezistencije sa populacije životinja na ljude proizlazi iz razmatranja epidemiologije zoonoza, u najvećem broju slučajeva salmoneloze i kampilobakterioze. Epidemiologija ovih alimentarnih infekcija je veoma složena budući da postoje mnogi drugi mogući izvori kontaminacije, a ne samo životinje, kao i mnogi drugi putevi transmisije, osim lanca hrane. Isti autori zaključuju da, i pored toga što hazard kao takav nesumnjivo postoji, hipoteza da je lanac hrane glavni put transmisije rezistencije sa životinja na ljude, mada po intuiciji, veoma privlačna, ne može da opstane kao tačna i od univerzalnog značaja. Autori su mišljenja da je problem rezistencije na antibiotike kroz lanac hrane pitanje ne toliko, ukoliko uopšte, primene antibiotika kod životinja, koliko pitanje higijene hrane, odnosno sprečavanja kontaminacije hrane. Pored toga, grupa istih autora (Phillips i sar., 2004) ističe da nije neophodno niti dovoljno za jednu epidemiološki uspešnu salmonelu da nosi gene rezistencije na antibiotike. U Danskoj, među humanim izolatima, prevalencija *Salmonella* Enteritidis osetljive na antibiotike je za 2,5 puta veća u odnosu na *Salmonella* Typhimurium, koja je često multiplo rezistentna na ampicilin/amoksicilin, tetracikline, sulfonamide i aminoglikozide (Bager i sar., 2002). U Americi, prevalencija multiplo rezistentne *Salmonella* Typhimurium, nije veća u odnosu na *Salmonella* Enteritidis, obično osetljivu na antibiotike (NARMS 2000 Annual Report, 2000). Pogrešno je i razmišljanje da na antibiotike rezistentne salmonele koje se prenose hranom, imaju razarajući klinički efekat, što je veoma redak slučaj u razvijenim zemljama. U najvećem broju slučajeva alimentarnih infekcija, delovanje salmonela je ograničeno na intestinalni trakt ljudi, radi se o tzv. „self-limiting“

infekcijama, a primena antibiotika je kontraindikovana iz razloga što ne čini nikakvo dobro pacijentu.

## **2.2. Uloga komensalnih bakterija poreklom iz hrane u širenju rezistencije na antibiotike**

Ljudi su u stalnom kontaktu i interakciji sa mikroorganizmima od kojih je većina bezopasna, ili čak i korisna. Procenjeno je da u gornjem sloju zemljišta živi  $26 \times 10^{28}$  mikroorganizama, oko  $12 \times 10^{28}$  u vodotokovima, a da je 6 milijardi ljudi na svetu kolonizovano sa  $3,9 \times 10^{23}$  bakterija. Ipak, od ogromnog broja bakterija koje nas okružuju ili kolonizuju, samo mali deo njih predstavljaju patogene bakterije. S druge strane, kako komensalne bakterije ne izazivaju oboljenja i time nemaju klinički značaj, njihova uloga u ekologiji rezistencije na antibiotike, godinama je bila ignorisana (Marshall i sar., 2009).

Komensalne bakterije nose veliki broj gena za rezistenciju na antibiotike, pa su tako iz gotovo svih ekosistema izolovani komensali rezistentni na antibiotike prve i druge generacije. Geni za rezistenciju na novije antibiotike – antibiotike treće i četvrte generacije, sve češće se detektuju kod komensalnih bakterija različitog porekla, uključujući i one poreklom od ljudi, ali i životinja koje služe za proizvodnju hrane (Marshall i sar., 2009).

U lancu hrane, najvažniju ulogu u razmeni gena za rezistenciju na antibiotike imaju komensalne bakterije, naročito s obzirom na njihov biodiverzitet i brojnost (Marshall i sar., 2009). U prilog toj tvrdnji ide i činjenica da je u brojnim istraživanjima dokazan veliki „pool“ gena za rezistenciju na antibiotike među komensalnim bakterijama u hrani spremnoj za konzumiranje, gde spadaju i mnoge namirnice životinjskog porekla (Comunian i sar., 2010; Li i Wang, 2010; Li i sar., 2011). U pojedinim namirnicama, dokazano je i do  $10^8$  kopija gena za rezistenciju na antibiotike/g proizvoda (Luo i sar., 2005), sa veoma velikim diverzitetom komensalnih bakterija koje su identifikovane kao nosioci ovih gena (Teuber i sar., 2003; Çitak i sar., 2004; Wang, 2009; Stanton i sar.,

2011). Ipak, kako bi se procenio značaj rezistencije na antibiotike kod komensalnih mikroorganizama, neophodno je poznavati prirodu i profile rezistencije kod bakterija. Rezistencija na antibiotike kod bakterija može biti prirodna (urođena), ili stečena. Prirodna rezistencija na antibiotike je karakteristika roda ili vrste bakterija i predstavlja sposobnost bakterija da tolerišu prisustvo neke antimikrobne supstance zahvaljujući urođenim osobinama, kao što su struktura i funkcionalne karakteristike vrste ili roda. Sa druge strane, stečena rezistencija predstavlja mogućnost da samo pojedini sojevi u okviru inače osetljive vrste ili roda bakterija prežive u prisustvu antibiotika. Bakterije mogu da steknu rezistenciju na antibiotike putem mutacija u genomu, ili putem lateralnog transfera gena. Urođena rezistencija i rezistencija stečena mutacijama ne mogu da se prenose u populacijama bakterija i kao takve, nemaju značaja (Mathur i Singh, 2005).

Širenje rezistencije na antibiotike je striktno vezano za mehanizme lateralnog transfera gena, koji predstavlja veoma važan faktor za evoluciju bakterija i glavni je mehanizam razmene genetskog materijala između jednoćelijskih organizama (Aleksun i Levy, 2007). Da bi došlo do lateralnog transfera gena između bakterija, neophodno je da bakterije u genomu poseduju mobilne genetske elemente - plazmide, integrone i transpozone. Ovi visoko organizovani prenosni genetski elementi često na sebi nose gene za rezistenciju na antibiotike i najzaslužniji su za intra- i interspecijsku razmenu genetskog materijala (Aleksun i Levy, 2007; Van Reenen i Dicks, 2011). Postoji više mehanizama lateralnog transfera gena među bakterijama, ali je najčešći mehanizam, konjugacija posredovana konjugativnim transpozonomima, pre svega zato što je to jedini vid lateralnog transfera gena koji može da se odigrava i između različitih vrsta i rodova bakterija (Gevers, 2003; Wozniak i Waldor, 2010).

Ipak, saznanja o stvarnim razmerama uticaja komensalnih bakterija iz hrane u širenju rezistencije na antibiotike su ograničena, pre svega, zato što su programi monitoringa kod bakterija izolovanih iz hrane usmereni u najvećoj meri na patogene bakterije (Wang i sar., 2012). U prilog toj tvrdnji ide i činjenica da se u mnogim zemljama u današnje vreme primenjuju programi monitoringa rezistencije na

antibiotike u lancu hrane samo kod onih bakterijskih vrsta koje predstavljaju patogene, ili oportunistički patogene bakterije: *E. coli*, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp. i *Enterococcus* spp. (Wang i sar., 2012). Ipak, patogene bakterije čine mali, a patogene bakterije rezistentne na antibiotike gotovo zanemarljiv deo ukupne mikrobiote hrane. Takođe, sirovine od kojih se dobija hrana životinjskog porekla se podvrgavaju različitim postupcima prerade, koji imaju za cilj uništavanje patogenih bakterija, a pri čemu komensali uspevaju da opstanu (Wang i sar., 2012).

Uzevši u obzir navedene činjenice, ali i brojnost i raznovrsnost komensalnih bakterija u gastrointestinalnom traktu ljudi, daleko je veća verovatnoća da se lateralni transfer gena za rezistenciju dogodi u populacijama komensalnih bakterija, ili sa komensalnih na patogene bakterije, nego da do razmene gena dođe neposredno između populacija patogenih bakterija, bez posredstva komensala (Andremont i sar, 2003). Na osnovu ovoga se pretpostavlja da uloga patogenih bakterija iz hrane u diseminaciji genetskih determinanti rezistencije na antibiotike ima minimalan značaj (Wang i sar., 2012).

Ispitivanje rezistencije na antibiotike kod komensalnih bakterija može da doprinese razvoju boljih strategija procene rizika i efektivnih mera za suzbijanje rezistencije na antibiotike u lancu hrane. S obzirom da komensalne bakterije dominiraju nad patogenim, kako u brojnosti, tako i u genetskoj raznovrsnosti, one predstavljaju bolji parametar za praćenje pojave i širenja nekog oblika rezistencije (Wang, 2009). Značaj komensalnih bakterija iz hrane u širenju rezistencije na antibiotike, prepoznat je i od strane Codex-a Alimentarius-a, pa se najnovije preporuke Codex-a za ispitivanje osetljivosti na antibiotike ne odnose samo na patogene bakterije, već se govori o mnogo širem terminu – „bakterije izolovane iz hrane“ (Codex Alimentarius Commission, 2011).

### 2.3. Tradicionalni sirevi Srbije

Tradicionalni proizvodi se definišu kao proizvodi koji su dobijeni na tačno određeni način u skladu sa gastronomskim nasleđem. Umeće proizvodnje se prenosi sa generacije na generaciju, a sam tehnološki postupak podrazumeva korišćenje malo, ili nimalo postupaka za preradu i obradu sirovine. Tradicionalni proizvodi imaju jedinstvene senzorne karakteristike, na koje, osim načina proizvodnje, utiče i određeni geografski lokalitet, region ili država (Guererro i sar., 2009).

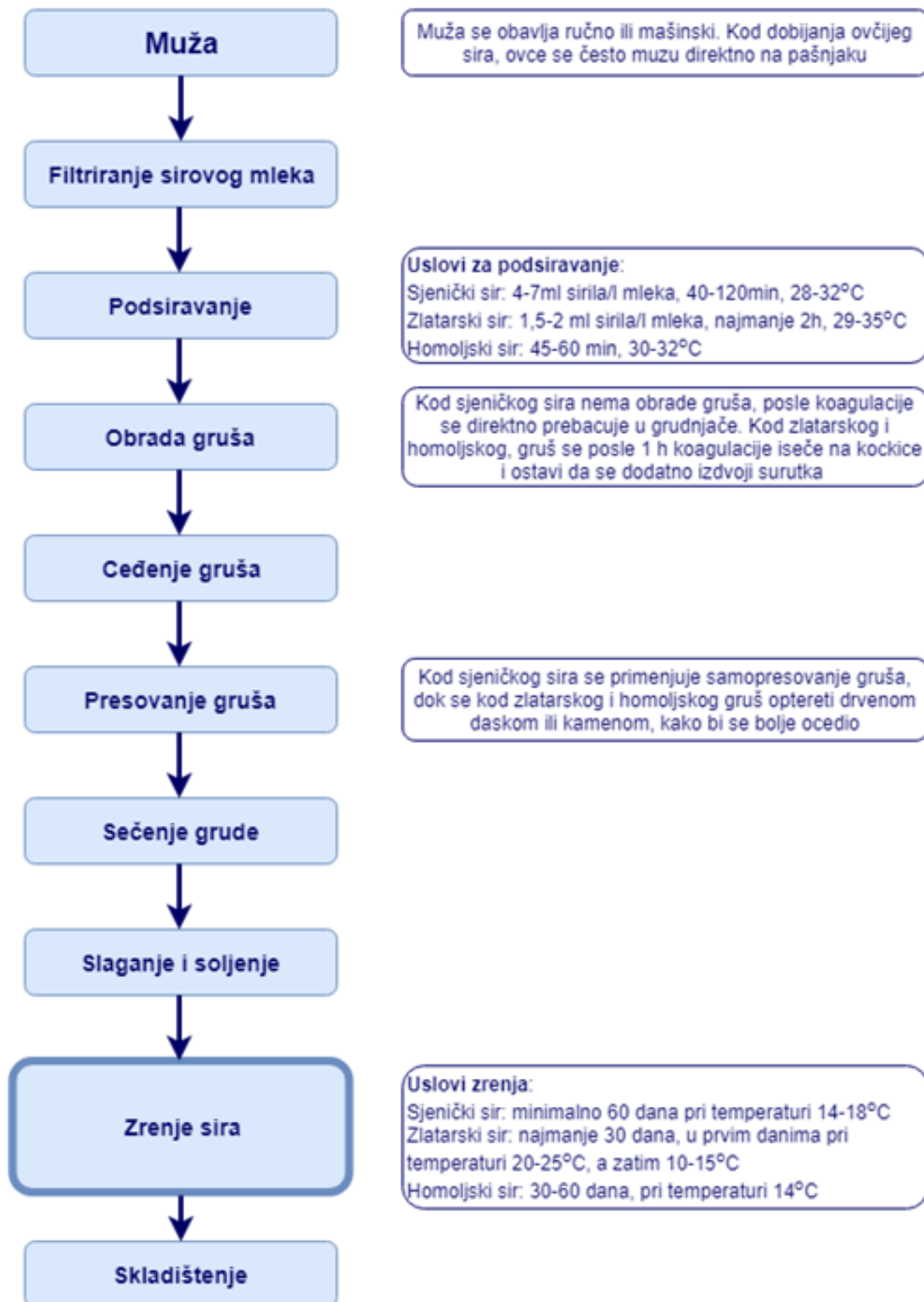
U poslednje vreme pridaje se posebna pažnja istorijskom i socijalnom značaju proizvodnje tradicionalnih sireva, kao i njihovom ekonomskom značaju na tržištu. Proizvodnja tradicionalnih sireva predstavlja veoma važan sociološki i antropološki fenomen, jer se može posmatrati i kao svojevrsni zanat koji je, evoluirajući iz ruralne kulture, postao sastavni deo tradicije nekog geografskog područja (Beuvier i sar., 2004). Zahvaljujući dugogodišnjoj tradiciji, sirevi proizvedeni na tradicionalan način predstavljaju neraskidivi deo života, istorije i kulturološkog identiteta jednog naroda. I pored mnogostrukog značaja proizvodnje tradicionalnih sireva, uvođenje striktnih regulativa o bezbednosti hrane u Evropi, rezultiralo je manjom fleksibilnošću u proizvodnji hrane i dovelo u pitanje opstanak mnogih tradicionalnih sireva i njihove specifične mikrobiote. Modernizacija poljoprivredne proizvodnje, pritisak globalnog tržišta i odumiranje ruralnih regija takođe su ostavili posledice na proizvodnju tradicionalnih sireva (Garabal, 2007). Prema rečima Heather Paxson, američkog antropologa, jedan od problema koji utiču na smanjenje tradicionalne proizvodnje sireva je to što savremeni ljudi žive u svetu Pasterovih principa, gde se kontaminacija smatra nepoželjnom i stoga se mora ili eliminisati, ili svesti na prihvatljiv minimum. Za razliku od njih, izvesan broj ljudi, tzv. "post-Pasterijanci", propagira mišljenje da nisu svi mikroorganizmi loši, a da pitanje sireva dobijenih od sirovog mleka, nije samo pitanje bezbednosti hrane, već i pitanje ljudskih sloboda i prava na izbor autentičnih i posebnih proizvoda, kakvi su tradicionalni sirevi (Paxson, 2008). S obzirom da potražnja za tradicionalnim proizvodima u svetu iz godine u godinu sve više raste, može se zaključiti da je među potrošačima sve više pristalica "post-Pasterovog" pogleda na

mikrobiopolitiku, koji žele sireve visokog gastronomskog kvaliteta i fokusiraju se na pozitivne efekte po zdravlje ljudi koje bogata mikrobiota tradicionalnih sireva može da pruži.

Tradicionalni sirevi Srbije u potpunosti odgovaraju definiciji tradicionalnih proizvoda: proizvode se od sirovog mleka na ograničenom geografskom području, uglavnom u planinskim krajevima Srbije, imaju jedinstvene senzorne osobine, a za njihovo dobijanje upotrebljavaju se tradicionalne tehnike proizvodnje. Pojam jedinstveni i/ili tradicionalan način proizvodnje, koji je takođe jedan od presudnih kriterijuma u priznavanju zaštite porekla, podrazumeva: proizvodnju sira uglavnom od sirovog mleka, korišćenje prirodnih i/ili autohtonih mikrobnih kultura, prirodne uslove zrenja, jedinstven oblik i/ili posebne dodatke u siru, uglavnom ručnu izradu, te druge specifičnosti po kojima se taj sir razlikuje od sireva proizvedenih u drugim geografskim regijama. U neke od najpoznatijih predstavnika tradicionalnih sireva Srbije spadaju sjenički, zlatarski i homoljski sir, koji su prema važećem Pravilniku o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura, svrstani u meke ili polutvrde, punomasne sireve sa zrenjem, dobijene od sirovog mleka (Službeni glasnik RS 33/10, 2010), mada je njihov uobičajeni naziv beli sirevi u salamuri. Sva tri tipa sira su na nacionalnom nivou prepoznata kao jedinstveni entiteti, odnosno deo gastronomskog nasleđa Srbije, pa su zaštićeni oznakom geografskog porekla. Prema važećem Zakonu o geografskim oznakama porekla (Službeni glasnik RS, 18/2010, 2010), geografska oznaka koju nose sjenički, zlatarski i homoljski sir, identifikuje proizvod poreklom sa teritorije određene zemlje, regiona ili lokaliteta, a čiji se kvalitet, reputacija ili druge specifične karakteristike mogu pripisati njegovom geografskom poreklu, a proizvodnja i/ili prerada i /ili priprema se odvija na definisanom geografskom području.

Tehnologija proizvodnje ovih sireva je veoma jednostavna i slična je za sva tri tipa sira. Za dobijanje zlatarskog sira, koristi se sirovo kravlje mleko, sjeničkog ovčije ili mešavina kravljeg i ovčijeg mleka, dok homoljski sir ima tri varijeteta: kravlji, ovčiji i koziji (Zavod za intelektualnu svojinu, <http://www.zis.gov.rs/prava-is/oznake-geografskog-porekla/spisak-ogp.33.html>). Odmah posle muže, mleko se cedi kroz gazu

kako bi se odstranile grube nečistoće. Zatim se u mleko koje je još uvek toplo dodaje sirilo (temperatura mleka u ovom trenutku obično iznosi oko 30°C, ali može u manjoj meri da varira u zavisnosti od tipa sira) i mleko se ostavlja da koaguliše. Kada se koagulacija završi, sveže formirani gruš se prebacuje u posebne krpe, „grudnjače“ da bi surutka mogla da se ocedi. Kako bi se postiglo što bolje ceđenje, krpe se vezuju u čvor i u slučaju sjeničkog sira, kače da vise sa drvenih prečki. Tokom sledeće faze proizvodnje, gruš se oblikuje i presuje tako što se na njega postavlja kamen ili posebna drvena daska. Kada se gruš u potpunosti ocedi, dobija se gruda koja se seče na četvrtaste ili trouglaste kriške različite debljine, u zavisnosti od tipa sira. Kod zlatarskog i sjeničkog sira, kriške se sole metodom suvog soljenja tako što se na dno kačice pospe so, a zatim se svaki red kriški sira posebno posoli i na kraju prelije surutkom. Kod homoljskog sira za soljenje se koristi i slani presolac koji sadrži 15-18% kuhinjske soli. Kada se kriške poređaju u kačicu, odozgo se pritisnu drvenom daskom i kamenom i ostave da zriju najmanje 30 dana. Proces proizvodnje i uslovi zrenja za zlatarski, sjenički i homoljski sir, prikazani su na Slici 2.3.1.



Slika 2.3.1. Proces proizvodnje zlatarskog, sjeničkog i homoljskog sira



#### 2.4. Specifičnost biodiverziteta u sirevima od sirovog mleka

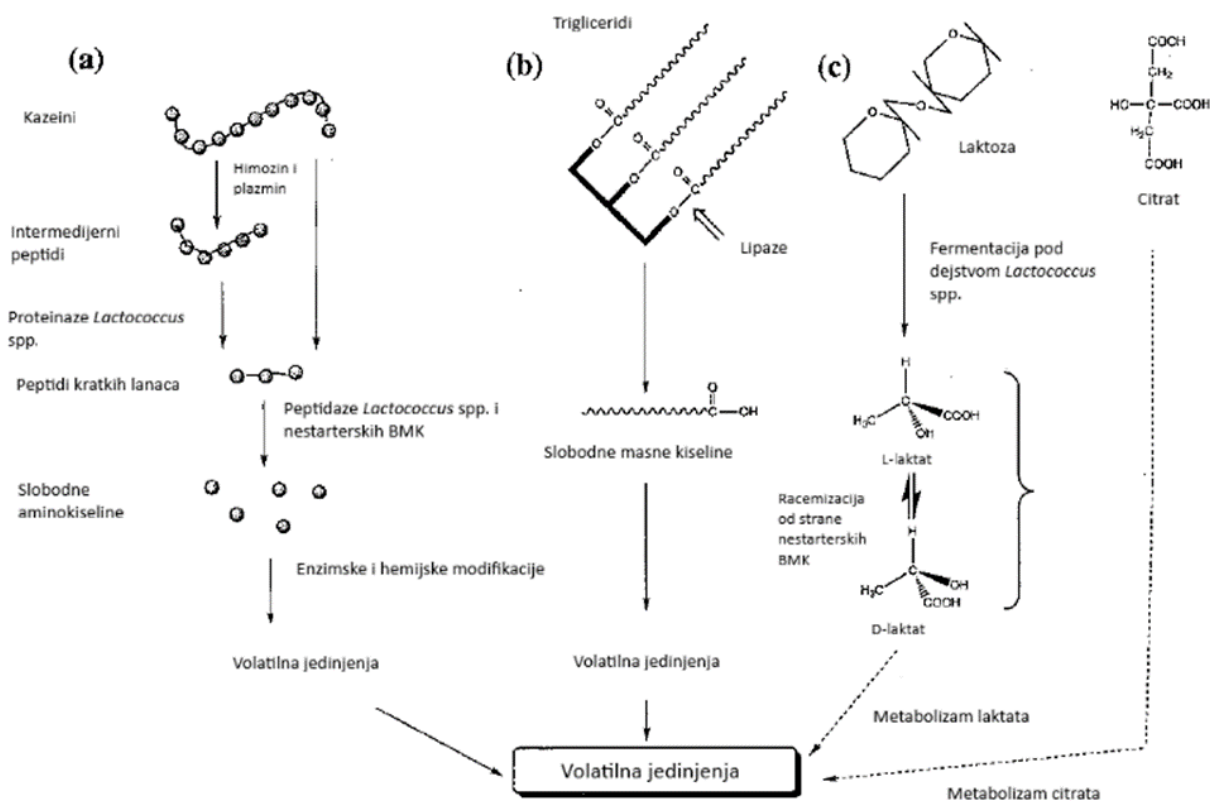
Specifičnost zemljišta, mikroklimatskih uslova definisane geografije, sastava paše, sastava sirovog mleka, kao i jedinstven proces dobijanja tradicionalnih sireva, uslovio je ne samo bogatstvo bakterija unutar jednog sira, već i značajne razlike u diverzitetu mikrobioma između sireva istog varijeteta, proizvedenih u različitim domaćinstvima (Bachmann i sar, 2011). Veća raznovrsnost isparljivih, aromogenih komponenti (kiselina, aldehida, alkohola, estara i sumpornih jedinjenja), čije je prisustvo posledica aktivnosti autohtonih bakterija, pre svega bakterija mlečne kiseline, uslovljava da sirevi dobijeni od sirovog mleka u uslovima tradicionalne proizvodnje imaju autentične senzorne osobine i izraženiju aromu od sireva dobijenih od pasterizovanog mleka u industrijskim uslovima proizvodnje (Beuvier i sar., 2004).

Raznovrsnost bakterija u tradicionalnim sirevima posledica je upotrebe sirovog mleka za proizvodnju sira, izostanka upotrebe komercijalnih startera, kao i korišćenja sirila i salamure koji su dobijeni u domaćoj radinosti (Devirgiliis i sar., 2013). Osnovu biodiverziteta u tradicionalnim sirevima čini sirovo mleko od koga se dobijaju. U sirovom mleku je utvrđeno preko 100 rodova i 400 vrsta bakterija, sa veoma bogatim diverzitetom ne samo vrsta, već i sojeva i biotipova. Ukoliko proces proizvodnje sira podrazumeva termičku obradu mleka, veliki deo mikrobiote sirovog mleka biva uništen, ali s obzirom da kod tradicionalnih sireva termički tretman najčešće izostaje, značajan broj bakterija iz sirovog mleka uspeva da preživi tokom procesa proizvodnje i perioda zrenja sira i da opstane i u gotovom proizvodu (Montel i sar., 2014). Ipak, mleko nije jedini izvor bakterija u sirevima od sirovog mleka; ishrana životinja od kojih se dobija mleko, naročito paša, silaža i seno čine važne indirektno izvore bakterija (Verdier-Metz i sar., 2012). Procesno okruženje takođe predstavlja veoma značajan faktor koji uslovljava biodiverzitet; površina sira može da se kolonizuje bakterijama iz vazduha, vode, salamure, a poseban značaj ima drveno posuđe (Goerges i sar., 2008; Montel i sar., 2014).

Na mikrobiotu zrelog sira ne utiče samo njen primarni sastav, već i promene u mikrobnim populacijama koje se dešavaju tokom procesa proizvodnje i zrenja sireva. Mikrobna dinamika u sirevima od sirovog mleka zavisi od kompleksnih i nedovoljno jasnih interakcija između biotičkih faktora (sastava mikrobiote i mikrobnih interakcija) i abiotičkih faktora (fizičko-hemijskih osobina – pH i  $a_w$  vrednosti, redoks potencijala, koncentracije NaCl i CO<sub>2</sub>, anaerobioze, nedisosovanih kiselina, aminokiselina i masnih kiselina). Ova složena mreža interakcija u matriksu sira značajno utiče na dinamičke promene koje se dešavaju tokom procesa proizvodnje i zrenja sireva (Irlinger i Mounier, 2009; Callon i sar., 2011).

Tradicionalni sirevi se, s obzirom na regionalno poreklo i veoma različite tradicionalne tehnologije, mogu smatrati zasebnim ekološkim entitetom (Lopes i sar., 1999). Pored toga, mobilizacija genetskog materijala, usled transfera plazmida ili hromozomalnih gena među srodnim vrstama (Matic i sar., 1996) ili između filogenetski udaljenih grupa (Amabile-Cuevas i Chicurel, 1992), čini bazu za stvaranje novih rekombinanata koji preživljavaju i opstaju u zajednici ukoliko su uslovi sredine (matriksa hrane) takvi da favorizuju njihovu selekciju. U specifičnom slučaju bakterija koje predstavljaju populaciju tradicionalnih sireva, a koji sumaz vezani za specifično geografsko područje, postoji i geografski efekat usled toga što različita genetska predispozicija sojeva uslovljava da samo pojedini sojevi bakterija opstaju u matriksu sireva. Ove različitosti se dalje povećavaju time što tradicionalnu tehnologiju prate različiti neletalni stresovi (acidifikacija, snižavanje  $a_w$  vrednosti, povećana koncentracija soli). Na ovaj način članovi autohtone mikrobiote tradicionalnih proizvoda bivaju izloženi lokalnoj genetskoj i fenotipskoj diferencijaciji, kreirajući time lokalno specifičnu mikrobnu zajednicu. Time metabolički profili izolata objedinjuju ne samo faktore sredine već i karakteristike genoma, a članovi takve lokalne zajednice imaju fenotipski profil karakterističan za geografsko područje sa koga su izolovani.

Dominantnu populaciju mikroorganizama u sirevima od sirovog mleka čine bakterije mlečne kiseline, koje ne samo da su brojčano najzastupljenije, već imaju i najvažniju ulogu tokom zrenja (Slika 2.4.1).



**Slika 2.4.1.** Promene u matriksu sira tokom zrenja koje se događaju pod uticajem BMK (McSweeney, 2004)

Pojedine vrste BMK imaju ulogu startera i njihov značaj je najveći tokom procesa kišeljavanja mleka kao i na početku zrenja kada svojom metaboličkom aktivnošću učestvuju u procesima metabolizma rezidualne laktoze. Po završetku fermentacije laktoze, starterske BMK odumiru i njihov broj se smanjuje za dve ili više logaritamskih jedinica (Wouters i sar., 2002). Tokom zrenja stvaraju se povoljni uslovi za rast i razmnožavanje nestarterskih BMK (Beuvoir i sar., 2004), koje imaju ulogu u proteolizi i razlaganju produkata nastalih tokom proteolize (Settanni i Moschetti, 2010). Iako su uslovi u matriksu sira tokom faza zrenja veoma nepovoljni (nizak pH i  $a_w$ , visoka koncentracija soli), nestarterske BMK tolerišu takve uslove i tokom procesa zrenja postižu visok broj CFU/g (*engl.* colony forming unit - CFU) u gotovom proizvodu, čak 4-5 puta više u odnosu na početni broj (Wouters i sar., 2002). Jedinствене senzorne

osobine tradicionalnih sireva, najvećim delom su posledica prisustva izuzetnog biodiverziteta visoko specifičnih sojeva nestarterskih BMK (Wouters i sar., 2002).

Autentičnost sireva dobijenih u tradicionalnoj proizvodnji, može se videti i na primeru tradicionalnih sireva Srbije, koji se značajno razlikuju u pogledu sastava mikrobiote. Specifičnost ovog načina proizvodnje, možda se najbolje ogleda u činjenici da se tradicionalni sirevi Srbije ne razlikuju samo između tipova, već često sirevi sa istog geografskog lokaliteta, ali iz različitih domaćinstava, imaju potpuno različit mikrobiološki sastav. U tradicionalnim sirevima Srbije, četiri roda bakterija mlečne kiseline su najzastupljenija: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* i *Leuconostoc*, ali se razlike ogledaju u njihovom međusobnom odnosu. U istraživanjima mikrobiote sireva sa Stare planine, sjeničkog i somborskog sira, utvrđeno je da su najzastupljeniji predstavnici roda *Lactococcus*, a zatim predstavnici rodova *Lactobacillus* i *Enterococcus* (Mijačević i Bulajić, 2008; Begovic i sar., 2011; Bulajić i sar., 2015). Za razliku od njih, laktobacili su činili dominantan rod u istraživanjima koja su obuhvatala zlatarski i pirotski sir (Veljovic i sar., 2007; Terzic-Vidojevic i sar., 2009a, 2009b), dok su u siru sa Golije dominantnu populaciju BMK činile bakterije iz roda *Leuconostoc* (Terzić-Vidojević i sar., 2014). Najčešće identifikovane vrste BMK u tradicionalnim sirevima Srbije su: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* i *Enterococcus durans*, ali su u pojedinim sirevima sporadično identifikovane i neke ređe vrste poput *Lactobacillus sucicola*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus* i *Leuconostoc garlicum* (Terzic-Vidojevic i sar., 2009a, 2009b; Begovic i sar. 2011; Golić i sar., 2013).

Ipak i pored velikog zalaganja naučne zajednice, definitivna korelacija između pojedinačnih tipova sireva i prisustva pojedinih vrsta ili sojeva BMK nije utvrđena (Begovic i sar., 2011). Potpuna karakterizacija mikrobiote BMK čini jedan od veoma važnih faktora, pre svega u pogledu zaštite geografskog porekla ovih sireva na međunarodnom nivou i očuvanja gastronomskog nasleđa Srbije, ali i kao jedan od neophodnih koraka za procenu bezbednosti ovih proizvoda.

## 2.5. Rezistencija na antibiotike kod bakterija mlečne kiseline

Bakterije mlečne kiseline predstavljaju značajnu populaciju komensalnih bakterija fermentisanih proizvoda od mleka, pa tako i sireva, kako kiselokoagulišućih, tako i slatkokoagulišućih. BMK imaju veliki značaj za dobijanje proizvoda prepoznatljivog kvaliteta i odgovarajućih senzornih osobina (Montel i sar., 2014). Sa druge strane, mogućnost BMK da opstanu u gotovom proizvodu i dospeju u gastrointestinalni trakt konzumenta u visokom broju, pod uslovom da nose gene za rezistenciju na antibiotike, dovodi u pitanje njihovu ulogu u širenju rezistencije (Devirgiliis i sar., 2011).

Duga i bezbedna upotreba bakterija mlečne kiseline u procesima fermentacije hrane, obezbedila im je da steknu „Generally Recognized as Safe - GRAS“ status u Sjedinjenim Američkim Državama. Na osnovu pristupa „kvalifikovane pretpostavke bezbednosti“ (*engl.* Qualified Presumption of Safety - QPS) od strane Panela o biološkim hazardima (BIOHAZ) Evropske agencije za bezbednost hrane (*engl.* – European Food Safety Agency, EFSA), BMK su deo tzv. „QPS“ liste onih mikroorganizama (bakterija, virusa, plesni i kvasaca), koji su usled jasno uspostavljenog identiteta, saznanja iz naučne literature i prakse, procene bezbednosti (prisustvo faktora virulencije, gena za rezistenciju na antibiotike, i/ili potencijalne toksičnosti), prepoznati kao bezbedni za primenu u proizvodnji hrane. Kao jedan od osnovnih preduslova za dobijanje QPS statusa, pored određivanja profila fenotipa rezistencije na antibiotike, neophodno je utvrditi genetsku bazu rezistencije i u uslovima *in vitro* isključiti mogućnost prenosa gena rezistencije. Ipak, i pored duge tradicije bezbedne upotrebe u hrani, sve više se razmatra uloga BMK kao rezervoara gena za rezistenciju na antibiotike (Devirgiliis i sar., 2013).

Bakterije mlečne kiseline rezistentne na antibiotike ne predstavljaju nužno problem bezbednosti hrane, jer, s obzirom da su u pitanju komensalne bakterije, koje ne izazivaju oboljenja, rezistencija kod njih nema klinički značaj (Gueimonde i sar., 2013). Većina vrsta BMK u okviru rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*,

*Pediococcus* i *Leuconostoc* rezistentna je na metronidazol, jer nemaju enzim hidrogenazu, koja je ciljni molekul za delovanje ovog antibiotika (Danielsen i Wind, 2003; Delgado i sar., 2005). Navedeni rodovi BMK su prirodno rezistentni na sulfonamide i trimetoprim. Kod njih ne postoji metabolički put sinteze folne kiseline, koji inhibišu ove antimikrobne supstance (Katla i sar., 2001). *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. i *Leuconostoc* spp. su rezistentni i na visoke doze cefoksitina (Delgado i sar., 2005). Jedna od najbolje proučenih rezistencija kod BMK je urođena rezistencija na vankomicin kod rodova *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc*. Vankomicin deluje tako što se vezuje za D-alanin/D-alanin završetak pentapeptida, kao prekursora peptidoglikana ćelijske membrane i sprečava dalju polimerizaciju koja je neophodna za sintezu funkcionalnog peptidoglikana. S obzirom da je kod ovih rodova BMK D-alanin zamenjen D-laktatom ili D-serinom u muramilpentapeptidu, vankomicin nema mogućnost da vezivanja i time izostaje inhibicija sinteze peptidoglikana (Delcour i sar., 1999). Za razliku od laktobacila, pediokoka i leukonostoka, najveći broj pripadnika roda *Lactococcus* je osetljiv na ovaj antibiotik (Danielsen i Wind, 2003; Delgado i sar., 2005).

Osetljivost i rezistencija BMK na antibiotike prikazana je u Tabeli 2.5. Kao jedan od osnovnih preduslova za dobijanje QPS statusa, pored određivanja profila fenotipa rezistencije na antibiotike, neophodno je utvrditi genetsku bazu rezistencije i u uslovima „*in vitro*“ isključiti mogućnost prenosa gena rezistencije.

**Tabela 2.5.1.** Osetljivost i rezistencija BMK na antibiotike

Rod	Rezistencija	Osetljivost	Izvor iz literature
<i>Lactobacillus</i> spp.	β-laktamski antibiotici: oksacilin Cefalosporini Aminoglikozidni antibiotici Fluorohinoloni - enoksacin, pefloksacin, norfloksacin, nalidiksinska kiselina Sulfometoksazol Trimetoprim Metronidazol	β laktamski antibiotici Makrolidni antibiotici - eritromicin Hloramfenikol Linkozamidi - klindamicin Tetraciklini	(Charteris i sar., 1998; Danielsen i Wind, 2003; Coppola i sar., 2005)
<i>Lactococcus</i> spp.	Cefalosporini - cefoksitin Fluorohinoloni- nalidiksinska kiselina Aminoglikozidni antibiotici - kanamicin i gentamicin Trimetoprim Metronidazol Fuzidinska kiselina Polimiksin B	Makrolidni antibiotici - eritromicin β-laktamski antibiotici Glikopeptidni antibiotici - vankomicin, teikoplanin Rifampicin Spektinomycin Hloramfenikol Linkozamidi - linkomicin Novobiocin Bacitracin	(Temmerman i sar.2003,; Flórez i sar., 2005)
<i>Pediococcus</i> spp.	Glikopeptidni antibiotici - vankomicin i teikoplanin Aminoglikozidni antibiotici - streptomycin, kanamicin Tetraciklini Fluorohinoloni - ciprofloksacin Sulfametoksazol	β-laktamski antibiotici - penicilin G β-laktamski antibiotici - imipenem Aminoglikozidni antibiotici - gentamicin, netilmicin Makrolidni antibiotici - eritromicin Linkozamidi - klindamicin Rifampicin Daptomicin Ramoplanin	(Temmerman i sar.2003,; Danielsen i sar., 2007)
<i>Leuconostoc</i> spp.	Glikopeptidni antibiotici Cefalosporini - cefoksitin Aminoglikozidni antibiotici - gentamicin, streptomycin, kanamicin Fluorohinoloni - nalidiksinska kiselina Metronidazol Nitrofurantoin Sulfadiazin Trimetoprim	Rifampicin Hloramfenikol Makrolidni antibiotici - eritromicin Linkozamidi - klindamicin Tetraciklini	(Katla i sar., 2001; Flórez i sar., 2005)

Kada je u pitanju stečena rezistencija na antibiotike kod laktobacila i laktokoka izolovanih iz hrane, najčešće su dokumentovane rezistencija na tetraciklin i eritromicin (Devirgiliis i sar., 2013). Geni koji kodiraju rezistenciju na tetraciklin i eritromicin mogu da budu i genetski povezani, pa je istovremeno prisustvo gena *tet(M)* i *erm(B)* utvrđeno kod pripadnika vrste *Lactobacillus paracasei* (Huys i sar., 2008; Comunian i sar., 2010), *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus salivarius* (Nawaz i sar., 2011). Kod *Lactobacillus paracasei* zabeleženo je i istovremeno prisustvo gena *tet(W)* i *erm(B)* (Huys i sar., 2008; Comunian i sar., 2010). Geni za rezistenciju na tetraciklin i eritromicin koji su opisani kod laktobacila su i *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(O)* i *erm(C)* i *msr(C)* (Rao Thumu i Halami, 2012). Kod vrsta *Lactobacillus casei* (Ouoba i sar., 2008) i *Lactobacillus debrueckii* subsp. *bulgaricus* (Zhou i sar., 2012) detektovani su i geni za rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike *aph(3')*-III, *aadA* i *aadE*.

Kod laktokoka, utvrđeno je prisustvo *tet(M)* gena, ali sa daleko manjom prevalencijom nego kod laktobacila (Devirgiliis i sar., 2013), ali i genetski povezanih, istovremeno prisutnih *tet(S)* i *erm(B)* gena lokalizovanih na plazmidu (Devirgiliis i sar., 2010). Kod ovog roda takođe je identifikovan i gen *dfrA* na transpozonu *Tn4003* koji kodira rezistenciju na trimetoprim (Ge i sar., 2007).

Kada su u pitanju rodovi *Leuconostoc* i *Pediococcus*, podaci o utvrđenim genima za rezistenciju na antibiotike praktično i ne postoje, a ispitivanja se uglavnom odnose na utvrđivanje fenotipa rezistencije.

Za razliku od ostalih BMK, enterokoke nisu stekle GRAS status, jer se vrste *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* prepoznaju kao oportunistički patogeni. Sa druge strane, enterokoke imaju nezamenljivu ulogu u proizvodnji sireva prepoznatljivih i specifičnih senzornih osobina, naročito sa područja južne Evrope (Ogier i Serror, 2008).

Enterokoke obično poseduju prirodnu rezistenciju na niske koncentracije aminoglikozidnih i  $\beta$ -laktamskih antibiotika, kao i hinolona (Kaçmaz i Aksoy, 2005). Kod enterokoka izolovanih iz hrane rezistencija na klinički važne antibiotike, poput



ampicilina, penicilina, gentamicina i vankomicina je retka pojava (Franz i sar., 2001; De Fátima i sar., 2003; Peters i sar. 2003; Čanžek-Majhenič i sar., 2005). Rezistencija na vankomicin kod enterokoka može biti urođena u slučaju da su enterokoke nosioci *vanC* gena, ili stečena u slučaju kada enterokoke poseduju *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* i *vanG* gene (Leclercq i sar., 1989).

Kod enterokoka rezistencija na antibiotike posledica je efikasnih mehanizama za razmenu gena putem plazmida i transpozona koji su utvrđeni kod ove grupe bakterija, što je najbolje dokumentovano u slučaju rezistencije na tetraciklin (Ogier i Serror, 2008). Prenosivu prirodu rezistencija na ovaj antibiotik potvrđuje i činjenica da su *tet(M)*, *tet(L)* i *tet(S)* geni utvrđeni kod enterokoka izolovanih iz hrane, identični onima koji su prethodno izolovani iz kliničkih izolata enterokoka (Ogier i Serror, 2008). U istraživanju Huys i sar. (2004) izolati enterokoka poreklom iz hrane rezistentni na tetraciklin, istovremeno su pokazali prisustvo rezistencije i na eritromicin i/ili hloramfenikol, što je u vezi sa činjenicom da su pojedini *tet* geni povezani sa transpozonomima koji pored nose gene za rezistenciju i na druge antibiotike (Chopra i Roberts, 2001).

Poslednjih godina, intenzivno se radi na ispitivanju prevalencije fenotipa i karakterizaciji genetske baze rezistencije na antibiotike kod BMK poreklom iz sireva od sirovog mleka. Geni za rezistenciju na antibiotike utvrđeni kod BMK poreklom iz sireva od sirovog mleka, prikazani su u Tabeli 2.5.2.

**Tabela 2.5.2.** Geni za rezistenciju na antibiotike kod BMK

Vrsta proizvoda	Rod ili vrsta kod koje je identifikovan gen	Gen	Izvor iz literature
Egipatski sir od sirovog mleka	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>tet</i> (M) <i>tet</i> (L) <i>erm</i> (B) <i>aph</i> (3')	Hammad i sar., 2015
Poljski sir od sirovog mleka	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>tet</i> (M)	(Zycka-Krzesinska i sar., 2015)
Španski sir od sirovog mleka	<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>tet</i> (M)	(Fernández i sar., 2010)
Španski sir od sirovog mleka	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>tet</i> (S)	(Fernández i sar., 2011)
Francuski sirevi od sirovog mleka	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>aph</i> 3' IIIa <i>erm</i> (B) <i>tet</i> (M) <i>cat</i> (A) <i>tet</i> (L) <i>aph</i> 2''- <i>aac</i> 6'	(Jamet i sar., 2012)
Mančego sir iz Španije	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus avium</i>	<i>vanA</i>	(Nieto-Arribas i sar., 2011)
Panerone sir od sirovog mleka	<i>Enterococcus italicus</i>	<i>tet</i> (S)	(Maietti i sar., 2007)
Sola sir od sirovog mleka	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>tet</i> (M) <i>erm</i> (B) <i>tet</i> (W)	(Huys i sar., 2008)
Panerone sir od sirovog mleka	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>tet</i> (W) <i>erm</i> (B)	(Comunian i sar., 2010)

Iako problem rezistencije na antibiotike sve više dobija pažnju javnosti, a proizvodi od sirovog mleka, s obzirom na raznovrsnost i brojnost komensalnih bakterija, potencijalno mogu da imaju značaj u širenju i perzistenciji rezistencije na antibiotike, ispitivanja rezistencije na antibiotike kod BMK poreklom iz sireva od sirovog mleka, još uvek su malobrojna. Najveći broj ispitivanja, ali i identifikovanih gena rezistencije odnosio se na izolate enterokoka koje su, zbog toga što mogu da budu i oportunistički patogeni, od naročitog interesa za pitanje bezbednosti hrane.

## 2.6. Tetraciklin rezistom

Termin „rezistom“ prvi put je predložio Wright (2007), u značenju skup svih gena za rezistenciju na antibiotike i njihovih prekursora, kako kod patogenih, tako i kod komensalnih bakterija. Wright (2007) svrstava gene za rezistenciju u četiri grupe: 1) geni za rezistenciju na antibiotike kod patogenih bakterija, kojih ima najmanje, ali u kliničkom smislu predstavljaju najveći problem; 2) geni za rezistenciju na antibiotike kod producenata antibiotika; služe kao mehanizam zaštite od sopstvenih antibiotika; 2) kripto-geni, koji imaju nizak nivo ekspresije ili nisu u ekspresiji i 4) prekursori geni koji ne kodiraju rezistenciju na antibiotike, ali proteini kodirani ovim genima imaju bazalnu anti-antibiotsku aktivnost i pod dejstvom selektivnog pritiska mogu da evoluiraju u potpuno funkcionalne gene odgovorne za rezistenciju na antibiotike.

Tetraciklini predstavljaju jednu od najranije otkrivenih klasa antibiotika. Produkti su različitih streptomiceta izolovanih iz zemljišta (Levy, 2002). Predstavljaju antibiotike širokog spektra, sa dejstvom na veliki broj gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, rikecija, ali i na pojedine protozoe (Roberts i Schwarz, 2016). Pored svoje terapijske upotrebe, tetraciklini su se dugi niz godina koristili u uzgoju životinja kao promotori rasta (Chopra i Roberts, 2001). Mehanizam delovanja tetraciklina podrazumeva vezivanje za 30s subjedinicu bakterijskog ribozoma i sprečavanje translacije proteina (Thaker i sar., 2010).

Tetraciklini su se intenzivno koristili u poljoprivredi. Podaci iz SAD ukazuju da je upotreba tetraciklina kod farmskih životinja dramatično porasla u periodu 1950-1970, a do 2001. godine njihova upotreba u poljoprivredi se uvećala osam puta, tako da je premašila potrošnju u humanoj medicini i svrstala ih u drugu najčešće korišćenu grupu antibiotika (Mellon i sar, 2001; Food and Drug Administration, 2014). U Republici Srbiji tetraciklini predstavljaju često korišćene antibiotike u veterinarskoj medicini sa godišnjom potrošnjom od preko 15 tona (Agencija za lekove i medicinska sredstva, 2014; 2015; 2016).

Ubrzo nakon početka upotrebe tetraciklina dokumentovana je i pojava rezistencije na ovu grupu antibiotika. Rezistencija na tetraciklin predstavlja jednu od najčešćih rezistencija na antibiotike u mikrobnim zajednicama (Thaker i sar., 2010). Ipak, iako je upotreba tetraciklina najodgovornija za širenje rezistencije na tetraciklin, ona ne predstavlja inicijalni okidač koji je do nje i doveo. Razloge ovome treba tražiti u ekologiji aktinomiceta, koje prirodno produkuju tetracikline. Prema podacima Baltza (2007), od hiljadu aktinomiceta koje se nalaze u zemljištu, jedna je producent tetraciklina. Kako u prosečnom uzorku zemljišta postoji u proseku  $10^6$ - $10^8$ /g bakterija, a 5-6% čine aktinobakterije, može se zaključiti da je životna sredina opterećena velikom količinom prirodno prisutnih tetraciklina. Kada se tome pridoda upotreba tetraciklina u poljoprivredi, opterećenost životne sredine tetraciklinima je ogromna. Pod tako jakim selektivnim pritiskom, nije začuđujuće da je tetraciklin rezistom toliko zastupljen i predstavljen kroz veoma veliki broj gena (Thaker i sar., 2010).

Do danas je kod 126 različitih rodova bakterija otkriveno 46 gena za rezistenciju na tetraciklin. Tri su osnovna mehanizma rezistencije na tetraciklin: „*efflux*“ pumpe, ribozomalni zaštitni proteini i enzimaska inaktivacija. Najveći broj *tet* gena, njih 30, pripada genima koji kodiraju „*efflux*“ pumpe, 12 pripada genima koji kodiraju ribozomalne zaštitne proteine, a tri gena kodira enzimsku inaktivaciju. Za *tet(U)* gen još uvek nije otkriven mehanizam rezistencije (Roberts i Schwarz, 2016).

Kod bakterija mlečne kiseline, do sada je utvrđeno 10 *tet* gena ( Tabela 2.6.1.)

**Tabela 2.6.1.** Geni za rezistenciju na tetraciklin kod bakterija mlečne kiseline (Roberts i Schwarz, 2016)

<b>Gen</b>	<b>Nosioci tet gena među BMK</b>	<b>Mehanizam delovanja</b>
<i>tet(K)</i>	<i>Enterococcus, Lactobacillus</i>	"Efflux" pumpa
<i>tet(L)</i>	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Pediococcus</i>	
<i>tet(Z)</i>	<i>Lactobacillus</i>	
<i>tet(M)</i>	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus</i>	Ribozomalni zaštitni proteini
<i>tet(O)</i>	<i>Enterococcus, Lactobacillus</i>	
<i>tet(S)</i>	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus</i>	
<i>tet(T)</i>	<i>Lactococcus</i>	
<i>tet(W)</i>	<i>Enterococcus</i>	
<i>tet(36)</i>	<i>Lactobacillus</i>	
<i>tet(W/32/O/W/O)</i>	<i>Lactobacillus</i>	Mozaični gen
<i>tet(U)</i>	<i>Enterococcus</i>	Nepoznat mehanizam rezistencije

Najčešće utvrđen gen za rezistenciju na tetraciklin, kako kod gram pozitivnih, tako i kod gram negativnih bakterija je *tet(M)* gen. Utvrđen je kod 75 rodova bakterija, a predstavlja najčešće prisutan gen za rezistenciju i kod bakterija mlečne kiseline. Razlog za široku rasprostranjenost *tet(M)* gena leži u činjenici da je lokalizovan na mobilnim genetskim elementima, tačnije na konjugativnim transpozonomima iz familije Tn916-Tn1545 (Clewell i sar., 1995). Transpozoni iz ove familije predstavljeni su kao manji genetski elementi, kada nose isključivo gen za rezistenciju na tetraciklin, ali i veći genetski elementi kada, osim rezistencije na tetraciklin, često nose i gene za rezistenciju na druge antibiotike: 1) *erm(B)* gen koji kodira rezistenciju na makrolidne antibiotike, linkozamide i streptogramine; 2) *mef(A)* i *msr(D)* gene koji kodiraju rezistenciju na makrolidne antibiotike; 3) *aphA-3* gen koji kodira rezistenciju na kanamicin; 4) *cat* gen koji kodira rezistenciju na hloramfenikol (Roberts, 2005). Pored toga, geni *tet(K)* i *tet(L)* koji se utvrđuju kod BMK, pored lokalizacije na hromozomu mogu biti lokalizovani i na malim prenosivim plazmidima, pa i kod njih postoji mogućnost prenosa na druge bakterije (Roberts i Schwarz, 2016).

### 3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

U Republici Srbiji ne postoji monitoring rezistencije bakterija na antibiotike kroz lanac hrane. S druge strane, naučna zajednica je postigla konsenzus oko toga da hrana životinjskog porekla, pre svega fermentisani proizvodi od sirovog mleka i mesa, predstavljaju značaj izvor komensalne mikrobiote opterećene genima za rezistenciju na antibiotike. Bilo je potrebno dobiti podatke o tome u kom opsegu bakterije mlečne kiseline izolovane iz tradicionalnih sireva Srbije učestvuju u širenju rezistencije na antibiotike. Istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije imala su tri specifična cilja:

1. Utvrđivanje biodiverziteta autohtonih sireva Srbije u odnosu na populaciju bakterija mlečne kiseline, sa svrhom potpunije karakterizacije specifične mikrobiote tradicionalnih sireva Srbije;
2. Utvrđivanje profila i prevalencije fenotipa rezistencije na antibiotike kod izolata bakterija mlečne kiseline, kao deo procene bezbednosti autohtonih sojeva bakterija mlečne kiseline i tradicionalnih sireva iz kojih oni vode poreklo;
3. Utvrđivanje prisustva gena rezistencije na tetraciklin kod izolata bakterija mlečne kiseline radi uvida u genetsku bazu rezistencije i procena mogućnosti prenosa gena rezistencije u uslovima *in vitro* u svrhu preliminarne procene rizika od širenja *tet* gena kroz lanac hrane.

Na osnovu uvida u podatke iz literature i preliminarnih ispitivanja, a shodno ciljevima u okviru disertacije, postavljeni su sledeći zadaci:

1. Utvrditi zastupljenost bakterija mlečne kiseline i subpopulacije bakterija mlečne kiseline rezistentne na tetraciklin u uzorcima tradicionalnih sireva Srbije;
2. Izvršiti genotipizaciju izolata bakterija mlečne kiseline i odabrati reprezentativne izolate za dalja ispitivanja;

3. Identifikovati izolate bakterija mlečne kiseline;
4. Ispitati osetljivost na antibiotike kod izolata bakterija mlečne kiseline;
5. Ispitati prisustvo gena za rezistenciju na tetraciklin kod izolata bakterija mlečne kiseline;
6. Ispitati mogućnost prenosa gena za rezistenciju na tetraciklin na odabrane recipijente u uslovima *in vitro*.

## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1. Materijal**

Materijal za ovo istraživanje predstavljalo je 48 uzoraka tradicionalnih sireva Srbije proizvedenih od sirovog mleka. Uzorkovanje sireva je izvršeno na područjima, koja prema postojećim elaboratima za oznake geografskog porekla registrovanim u Zavodu za intelektualnu svojinu (Zavod za intelektualnu svojinu, <http://www.zis.gov.rs/prava-is/oznake-geografskog-porekla/spisak-ogp.33.html>), predstavljaju definisana geografska područja unutar kojih se, na osnovu dugogodišnjeg iskustva i umeća lokalnog stanovništva, na tradicionalan način odvija proizvodnja ispitivanih sireva. Homoljski sir (n=13) je uzorkovan na području opštine Žagubica, zlatarski sir (n=20) na području opštine Nova Varoš i sjenički sir (n=15) na području opštine Sjenica. Svi uzorci sira su uzeti aseptično, obeleženi i transportovani u ručnom frižideru do laboratorije Katedre za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla Fakulteta veterinarske medicine, gde su analizirani u roku 24-48 časova.

### **4.2. Metode**

#### **4.2.1. Zastupljenost bakterija mlečne kiseline i subpopulacije bakterija mlečne kiseline rezistentne na tetraciklin**

##### **4.2.1.1. Izolacija i određivanje broja bakterija mlečne kiseline u uzorcima tradicionalnih sireva**

Aseptično je odmereno 10 g uzorka sira i homogenizovano u 90 ml 2% Na- citrata (HiMedia, India). Početna razblaženja uzoraka sireva su preneti u termostat na predinkubaciju (30 °C/15-30 min). Nakon predinkubacije, decimalna razblaženja su pripremana u sterilnoj puferisanoj peptonskoj vodi (HiMedia, India). Odgovarajuća decimalna razblaženja (prvo zasejano razblaženje  $10^{-2}$ ), u količini od 1 ml, prelivana su sa 15-20 ml otopljenog i na 45 °C ohlađenog de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) agara



(Merck, Germany) sa dodatkom 0,14% sorbinske kiseline (MRS-S). U cilju utvrđivanja zastupljenosti subpopulacije BMK rezistentne na tetraciklin, odgovarajuća decimalna razblaženja su prelivana sa MRS-S agarom sa dodatkom tetraciklina (tetracycline-hydrochloride, HiMedia, India) u dvostruko rastućim koncentracijama (1-256 µg/ml). Sve zasejane ploče su inkubirane u anaerobnim uslovima, primenom GenBox pakovanja (GenBox anaer, BioMérieux, France), 72 časa pri temperaturi 30 °C. Po završenoj inkubaciji, u cilju utvrđivanja zastupljenosti BMK i subpopulacije bakterija mlečne kiseline rezistentne na tetraciklin, na pločama odabranim za brojanje (30-300 kolonija), izbrojane su kolonije i broj prikazan kao log CFU/ml. Metodom slučajnog odabira odabrano je po tri kolonije sa MRS-S agar ploča (sa tetraciklinom i bez tetraciklina) (n=395). Dalji odabir izolata napravljen je na osnovu rezultata bojenja po Gram-u i katalaza testa. Odabrano je ukupno 223 gram pozitivnih, katalaza negativnih izolata BMK.

#### **4.2.2. Genotipizacija izolata bakterija mlečne kiseline i odabir reprezentativnih izolata za dalja ispitivanja**

##### **4.2.2.1. Ekstrakcija ukupne DNK iz izolata bakterija mlečne kiseline**

Pre izolacije DNK, izolati bakterija mlečne kiseline su zasejani u MRS bujon (Merck, Germany) i inkubirani u aerobnim uslovima u trajanju od 16 časova pri temperaturi 30 °C. Po 1 ml bujonske kulture je zatim centrifugovano pri 12 000 rpm/2 min. Čelijski sediment je resuspendovan u 600 µl rastvora lizozima (1 mg/ml) i mutanolizina (25 U/ml) (Sigma-Aldrich, Germany) u 0,5M etilen-diamin-tetrasirćetnoj kiseline (Ethylenediaminetetraacetic acid – EDTA, Sigma-Aldrich, Germany) (pH=8), u cilju postizanja kompletne lize ćelijskih zidova bakterija. Ukupna DNK je zatim izolovana uz pomoć komercijalnog kita (Wizard Genomic DNA Purification Kit), prema uputstvu proizvođača (Promega, WI, USA).

#### 4.2.2.2. Umnožavanje gena sa (GTG)<sub>5</sub> prajmerom za rep-PCR

Metoda lančane reakcije polimeraze sa repetitivnim ekstragenim palindromskim sekvencama (*engl.* repetitive element palindromic polymerase chain reaction - rep-PCR) sa (GTG)<sub>5</sub> oligonukleotidnim prajmerom (5'-GTG GTGGTGGTGGT-3'), ima ulogu "screening"-a izolata i primenjena je sa svrhom odabira reprezentativnih izolata BMK za dalja ispitivanja. Kako (GTG)<sub>5</sub>-PCR metod pokazuje moć diskriminacije na nivou ispod vrste, pretpostavka je da izolati koji pokazuju isti obrazac, u smislu odsustva ili prisustva traka, predstavljaju isti "fingerprint" tip i time, kao visoko srodni, pripadaju istoj vrsti bakterija. Na ovaj način, rep-PCR metod, ilustruje homogenost, ili, u suprotnom slučaju, heterogenost sojeva unutar vrsta bakterija.

Rep-PCR metoda rađena je prema Versalovic i sar. (1994). Reakciona smeša (20 µl) za rep-PCR sadržala je 2 µM prajmera (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA), 1xPCR obojenog pufera, 3 mM x MgCl<sub>2</sub>, dNTP u koncentraciji 1 mM i 1 U Taq polimeraze (Kappa Biosystems, MA, USA). Program za amplifikaciju sastojao se od inicijalne denaturacije pri temperaturi 95 °C/3 min i 35 ciklusa amplifikacije: denaturacija 95 °C/1 min, vezivanje prajmera 40 °C/1 min i elongacija 72 °C/ 2 min; kao i od završne elongacije pri temperaturi 72 °C/5 min. Reakcija je sprovedena u PCR uređajima (Mastercycler gradient 5331, Eppendorf AG, Hamburg, Germany; Surecycler G8800, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Dobijeni rep-PCR produkti su razdvojeni primenom horizontalne elektroforeze na 1,8% agaroznom gelu (Sigma-Aldrich, Germany) u TAE (*engl.* Tris-Acetate-EDTA) puferu (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) u trajanju od tri časa, obojeni bojom Midori Green Advance (Nippon Genetics, Germany) i posmatrani pod UV transiluminatorom (Uvitec, Cambridge, UK). Dobijeni obrasci su upoređivani u odnosu na pokretljivost standarda poznate molekulske mase (1 kbp DNA Ladder, Nippon Genetics, Germany). Generisani „fingerprint“-ovi su analizirani u programu BioNumerics™ Version 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), a zatim je izvršena kalkulacija genetske sličnosti izolata na osnovu Dice-ovog koeficijenta korelacije.

### 4.2.3. Identifikacija izolata bakterija mlečne kiseline

#### 4.2.3.1. Identifikacija vrsta bakterija mlečne kiseline primenom MALDI TOF masene spektrometrije

Izolati BMK odabrani primenom rep-PCR analize (n=162), identifikovani su do nivoa vrste uz pomoć MALDI TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) masene spektrometrije. Ispitivani izolati BMK zasejavani su na neselektivne podloge, a zatim inkubirani u anaerobnim uslovima (GenBox anaer, BioMérieux, France) u vremenu od 24 časa pri temperaturi od 30 °C. Primenjena je metoda direktnog transfera; po završenoj inkubaciji mala količina pojedinačnih kolonija je u vidu tankog filma direktno naneta na čeličnu pločicu sa 96 mesta, koja se nalazi u sastavu aparata (Microflex LT system; Bruker Daltonics, Germany). Pločica sa nanetim filmom je ostavljena oko 1 min da se osuši na sobnoj temperaturi, a zatim je na pločicu nanesen 1 µl matriksa, rastvora CHCA ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid; Bruker Daltonics, Germany). Izolati BMK pripremljeni na ovaj način su zatim podvrgnuti MALDI TOF masenoj spektrometriji. Spektrometar je bio podešen za identifikaciju bakterija na način preporučen od strane proizvođača (frekvencija lasera 20 Hz u pozitivnom linearnom modu, uz detekciju molekulskih masa u rasponu 2-20 kDa i ubrzanjem od 20 kV). Kalibracija masenog spektrometra izvršena je uz pomoć standarda za bakterijsku identifikaciju (ekstrakt soja *E. coli* DH5 $\alpha$  sa dodatkom proteina RNKaze A i mioglobina; Bruker Bacterial Test Standard – BTS; Bruker Daltonics, Germany). Snimljeni spektri su pretraživani u odnosu na bazu podataka proteinskih sekvenci kako bi se utvrdilo poklapanje izmerenih masa peptida sa teorijskim masama. Broj poklopljenih pikova, odnosno broj eksperimentalno dobijenih masa peptida koji odgovaraju teorijskim masama u bazi podataka predstavljen je koeficijentom pouzdanosti identifikacije. Prema uputstvu proizvođača, koeficijent pouzdanosti  $\geq 2,0$  predstavlja identifikaciju do nivoa vrste, dok koeficijent pouzdanosti  $\geq 1,7$ , a  $< 2$ , predstavlja identifikaciju do nivoa roda.

#### **4.2.4. Utvrđivanje profila i prevalencije fenotipa rezistencije na antibiotike kod izolata bakterija mlečne kiseline**

##### **4.2.4.1. Ispitivanje osetljivosti na antibiotike kod izolata bakterija mlečne kiseline**

Za ispitivanje osetljivosti na antibiotike kod identifikovanih izolata bakterija mlečne kiseline korišćena je mikrodiluciona metoda u mikrotitracionim pločama sa 96 polja. Kod izolata BMK, sa izuzetkom enterokoka (n=133) primenjen je ISO standard 10932:2010 – „Milk and milk products - Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB)“ (International Organization for Standardization, 2010). Osetljivost izolata BMK je ispitivana u odnosu na set antibiotika predložen od strane Panela o aditivima i proizvodima ili supstancama primenljivih u stočnoj hrani (*engl.* Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed – FEEDAP) Evropske agencije za bezbednost hrane (European Food Safety Authority, 2012): gentamicin (gentamicin sulphate; Fluka™, Honeywell, Germany), kanamicin (kanamycin sulphate; Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany), streptomycin (streptomycin sesquisulphate hydrate; Sigma-Aldrich, Germany), tetraciklin (tetracycline hydrochloride; HiMedia, India), eritromicin (erythromycin dihydrate; Sigma-Aldrich, Germany), klindamicin (clindamicin hydrochloride, Sigma-Aldrich, Germany), hloramfenikol (chloramphenicol; Sigma-Aldrich, Germany) i ampicilin (ampicillin trihydrate; Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany). Raspored koncentracija antibiotika u mikrotitracionoj ploči prikazan je u Tabeli 4.2.4.1.1.

**Tabela 4.2.4.1.1.** Raspored antibiotika u mikrotitracionoj ploči za ispitivanje osetljivosti na antibiotike izolata BMK

<b>Antibiotik</b>	<b>1<sup>a</sup></b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12<sup>b</sup></b>
Gentamicin	P	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	N
Kanamycin	P	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	N
Streptomycin	P	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	N
Tetraciklin	P	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	N
Eritromicin	P	0,016	0,032	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	N
Klindamicin	P	0,032	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	N
Hloramfenikol	P	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	N
Ampicilin	P	0,032	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	N

P – pozitivna kontrola, N – negativna kontrola

1<sup>a</sup>– Pozitivna kontrola je sadržavala rastvarač za antibiotik u količini 50 µl i bujon sa bakterijskom suspenzijom ispitivanog izolata

12<sup>b</sup> – U bunarčićima sa negativnom kontrolom nalazio se samo bujon

Pre izvođenja ispitivanja osetljivosti na antibiotike, izolati BMK su zasejani na čvrste podloge pri uslovima inkubacije koji su preporučeni u ISO (*engl.* International Organization for Standardization) standardu (International Organization for Standardization, 2010). Izrasle kolonije su pokupljene sa agar ploča i rastvarane u epruветama sa fiziološkim rastvorom do postizanja gustine ćelija od približno 1 McFarland (odgovara gustini ćelija od oko  $3 \times 10^8$  CFU/ml). Suspenzija bakterijskih ćelija je zatim 500 puta rastvorena u odgovarajućem bujonu dvostruke koncentracije. Za laktobacile korišćen je LSM bujon (*engl.* Lactic Acid Bacteria susceptibility testing medium – LSM), koji se sastojao od 90% ISO Sensitest bujona (Oxoid, UK) i 10% MRS bujona (Merck, Germany), a za sve ostale BMK korišćen je ISO Sensitest bujon (Oxoid, UK). U svako polje u mikrotitracionoj ploči je zatim naneseo 50 µl bujona sa suspenzijom bakterijskih ćelija. Mikrotitracione ploče su inkubirane u anaerobnim uslovima pri temperaturi preporučenoj u standardu (International Organization for Standardization, 2010). Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) (*engl.* Minimum Inhibitory Concentration - MIC) su očitavane posle 48h kao prvo razblaženje u nizu u kome nije bilo vidljivog rasta, a rezultati su tumačeni na osnovu preporuke EFSA vodiča (European Food Safety Authority, 2012). Kao referentni soj korišćen je *Lactococcus*

*lactis* ATCC 19435. Granične MIK vrednosti za bakterije mlečne kiseline, osim enterokoka, prikazane su u Tabeli 4.2.4.1.2.

**Tabela 4.2.4.1.2.** Granične MIK vrednosti za bakterije mlečne kiseline (European Food Safety Authority, 2012)

	Ampicilin	Eritromicin	Gentamicin	Hloramfenikol	Kanamicin	Klindamicin	Streptomycin	Tetraciklin
<i>Lactobacillus</i> spp. obligatno homofermentativni	1	1	16	4	16	1	16	4
<i>Lactobacillus</i> spp. obligatno heterofermentativni	2	1	16	4	32	1	64	8
<i>Lactobacillus</i> spp. fakultativno heterofermentativni	2	1	16	8	64	2	64	32
<i>Lb. plantarum/pentosus</i> <sup>a</sup>	2	1	16	4	16	1	/	8
<i>Lb. casei/paracasei</i>	2	1	32	8	64	1	32	4
<i>Pediococcus</i> spp.	2	2	32	4	64	2	64	4
<i>Leuconostoc</i> spp.	4	1	16	4	64	1	64	8
<i>Lactococcus lactis</i>	4	1	32	4	64	1	64	4
<i>Lactococcus garvieae</i> <sup>b</sup>	1	0,5	4	2	16	0,2 5	8	2

<sup>a</sup>Rezistencija na streptomycin kod vrste *Lactobacillus plantarum*, prema vodiču EFSA, se ne ispituje

<sup>b</sup>S obzirom da u vodiču EFSA nisu predložene granične MIK vrednosti za vrstu *Lactococcus garvieae*, rezultati su interpretirani na osnovu graničnih MIK vrednosti predloženih za kategoriju "i druge gram-pozitivne bakterije"

Kod izolata *Enterococcus* spp. (n=22) ispitivana je osetljivost na set antibiotika predloženih od strane Referentne laboratorije Evropske Unije za rezistenciju na antimikrobne lekove prema vodiču „Protocol for antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli*, enterococci and staphylococci“, na osnovu koga su i interpretirani rezultati za vrstu *Enterococcus faecalis* (Danish Technical University, National Food Institute, 2017), primenom komercijalnih mikrotitracionih ploča impregniranih sa antibioticima (Sensititre Trek, Thermo Fisher Scientific, USA). Pored osetljivosti na gentamicin, tetraciklin, eritromicin, hloramfenikol i ampicilin, kod izolata enterokoka

dodatno je ispitana osetljivost na: vankomicin, teikoplanin, kvinpristin/dalfopristin, daptomicin, ciprofloksacin, tigeciklin i linezolid. Kao referentni soj korišćen je *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Pri interpretaciji rezultata za *Enterococcus faecalis* primenjene su granične MIK vrednosti date u vodiču Referentne laboratorije (Danish Technical University, National Food Institute, 2017), dok su za interpretaciju rezultata kod drugih vrsta enterokoka korišćene granične MIK vrednosti iz literature (Hayes i sar., 2003), EFSA (European Food Safety Authority, 2012) i EUCAST (*engl.* European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) vodiča (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2018).

Granične vrednosti MIK na osnovu kojih su interpretirani rezultati za antibiotike koji su ispitivani u slučaju izolata *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus durans* date su u Tabeli 4.2.4.1.3.

**Tabela 4.2.4.1.3.** Granične vrednosti MIK za vrste *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus durans*

	Ampicilin	Ciprofloksacin	Daptomicin	Eritromicin	Hloramfenikol	Gentamicin	Kvinpristin/ dalfopristin	Linezolid	Teikoplanin	Tetraciklin	Tigeciklin	Vankomicin
<i>E. faecalis</i>	4	4	4	4	32	32	i.r.	4	2	4	0.25	4
<i>E. durans</i>	2 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	8 <sup>b</sup>	2 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>	1 <sup>c</sup>	8 <sup>b</sup>	n.d.	2 <sup>a</sup>

n.d. – nije definisano

i.r. – intrinzično rezistentan

a – vrednosti MIK preuzete iz EFSA vodiča za ispitivanje rezistencije na antibiotike kod BMK u hrani (European Food Safety Authority, 2012)

b – vrednosti MIK preuzete prema Hayes i sar. (2003)

c – vrednosti preuzete iz vodiča EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2018)

#### 4.2.5. Ispitivanje prisustva gena za rezistenciju na tetraciklin kod izolata bakterija mlečne kiseline

##### 4.2.5.1. Umnožavanje gena za rezistenciju na tetraciklin *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* i *tet(W)*

Primenom lančane reakcije polimeraze izolati BMK su ispitani na prisustvo gena za rezistenciju na tetraciklin: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* i *tet(W)*. Reakciona smeša (20 µl) sastojala se od 0,5 µM prajmera (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ispitivanih gena (Tabela 4.2.5.1.1), 1 x PCR obojenog pufera, 1,5 mM x MgCl<sub>2</sub>, dNTP u koncentracijama 200 µM i 1 U TaqDNA polimeraze (Kappa Biosystems, MA, USA). Program za amplifikaciju sastojao se od: inicijalne denaturacije 95 °C/1 min, i 30 ciklusa amplifikacije: denaturacija 95 °C/30s, vezivanja prajmera pri specifičnim T<sub>an</sub> (T<sub>an</sub> - temperatura vezivanja prajmera) (Tabela 4.2.5.1.1)/30s, elongacija 72 °C /30s i finalne elongacije 72 °C /5 min. Reakcija je sprovedena u PCR uređajima (Mastercycler gradient 5331, Eppendorf AG, Hamburg, Germany; Surecycler G8800, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Sekvence prajmera, temperature vezivanja prajmera, veličina amplifikovanih produkata i pozitivne kontrole prikazani su u Tabeli 4.2.5.1.1.



**Tabela 4.2.5.1.1.** Sekvence prajmera, temperature vezivanja prajmera, veličine produkata i pozitivne kontrole za ispitivanje prisustva *tet* gena

Gen	Sekvenca prajmera	T <sub>an</sub> (°C)	Veličina produkta (bp)	Pozitivna kontrola	Izvor iz literature
<i>tet(A)</i>	F: GTAATTCTGAGCACTGT R: CCTGGACAACATTGCTT	55	670	<i>Escherichia coli</i> DSM 3876	(Hansen i sar., 1996)
<i>tet(B)</i>	F: CAGTGCTGTTGTTGTCATTAA R: GCTTGGAAATACTGAGTGTA.	52	500	<i>E. coli</i> IM 648	(Roe i sar., 1995)
<i>tet(C)</i>	F: AACAATGCGCTCATCGT R: GGAGGCAGACAAGGTAT	58	1138	Plazmid pbR322	(Frech i Schwarz, 2000)
<i>tet(K)</i>	F: TTATGGTGGTTGTAGCTAGAAA R: AAAGGGTTAGAACTCTTGAAA	55	348	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> DSM 4911	(Zycka-Krzesinska i sar., 2015)
<i>tet(L)</i>	F: GTMGTTGCGCGCTATATTCC R: GTGAAMGRWAGCCCACCTAA	55	696	<i>Enterococcus mundtii</i> IM 613	(Zycka-Krzesinska i sar., 2015)
<i>tet(M)</i>	F: GTTAAATAGTGTCTTGGAG R: CTAAGATATGGCTCTAACAA	50	750	<i>Enterococcus faecium</i> IM 338	(Nawaz i sar., 2011)
<i>tet(O)</i>	F: AACTTAGGCATTCTGGCTCAC R: TCCCCTGTTCCATATCGTCA	52	515	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM 677	(Nawaz i sar., 2011)
<i>tet(W)</i>	F: GAGAGCCTGCTATATGCCAGC R: GGGCGTATCCACAATGTTAAC	64	168	<i>Bifidobacterium lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 18314	(Aminov i Mackie, 2007)

Produkti reakcije PCR su podvrgnuti horizontalnoj elektroforezi u 1% agaroznom gelu (Sigma-Aldrich, Germany), obojeni bojom Midori Green Advanced (Nippon Genetics, Germany) i posmatrani pod UV svetlom u transiluminatoru (Uvitec, Cambridge, UK). Pokretljivost produkata PCR amplifikacije upoređivana je sa pokretljivošću produkta amplifikacije pozitivne kontrole i sa standardom poznate molekulske mase (1 kbp DNA Ladder, Nippon Genetics, Germany).

#### **4.2.6. Ispitivanje mogućnosti prenosa gena za rezistenciju na tetraciklin na odabrane recipijente u uslovima *in vitro***

##### **4.2.6.1. Ispitivanje mogućnosti prenosa gena za rezistencije na tetraciklin sa izolata bakterija mlečne kiseline na odabrane recipijente primenom metode "*filter mating*" na agaru**

Ispitivanje mogućnosti prenosa gena za rezistenciju na tetraciklin rađeno je modifikovanom metodom konjugacije „*filter mating*“ na agaru prema Geversu i sar. (2003). Kao potencijalni donori odabrani su izolati *Enterococcus faecalis* i *Lactococcus lactis*, sa fenotipom rezistencije na tetraciklin i kod kojih je potom utvrđeno prisustvo *tet(M)* gena. Kao potencijalni recipijenti odabrani su referentni soj *Enterococcus faecalis* JH2-2 (LMG 19456) (bez plazmida, rezistentan na rifampicin i fuzidinsku kiselinu) i izolat *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* je deo kolekcije bakterija Katedre za higijenu i tehnologiju namirnica, Fakulteta veterinarske medicine, enterotoksogen, izolovan iz sira od sirovog mleka, rezistentan na rifampicin.

Donori i recipijenti su prvobitno bili umnoženi u BHI (*engl.* Brain Heart Infusion - BHI) bujonu (HiMedia, India) i inkubirani 18-20h pri optimalnoj temperaturi rasta (37 °C za *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus*; 32 °C za *Lactococcus lactis*). Bujonske kulture su zatim presejane u BHI bujon u odnosu 1:5 i inkubirane do sredine eksponencijalne faze rasta (4-6h). Bujonske kulture donora i recipijenata su zatim pomešane u odnosu 10:1 i 1:1 i propuštene kroz membranske filtere promera 0,45 µm (Merck Millipore, Germany), posle čega su filteri isprani sa puferisanim slanim rastvorom (Oxoid, UK), kako bi se bakterijske ćelije bolje vezale za filter. Filteri sa bakterijskim ćelijama su zatim aseptično preneti na površinu neselektivne podloge, BHI agara (HiMedia, India) i inkubirani preko noći pri temperaturama optimalnim za rast recipijenta. Po završenoj inkubaciji, filteri su isprani sa 10ml puferisanog slanog rastvora, a zatim su decimalna razblaženja ispiraka zasejana na selektivni agar za donore (BHI agar sa dodatkom tetraciklina u koncentraciji od 10 µg/ml), recipijente (BHI agar sa dodatkom rifampicina u koncentraciji od 50 µg/ml) i dvostruko selektivni agar za transkonjugante (BHI agar sa dodatkom tetraciklina u koncentraciji od 10

$\mu\text{g/ml}$  i rifampicina u koncentraciji od  $50 \mu\text{g/ml}$ ). Po  $0,1 \text{ ml}$  bujonskih kultura donora i recipijenata je takođe zasejan na dvostruko selektivni agar, kako bi se utvrdilo da li je eventualno došlo do spontanijh mutacija, zbog kojih su donori i recipijenti stekli rezistenciju na oba antibiotika. Ploče zasejane na prethodno opisani način (donori, recipijenti i transkonjuganti) su zatim inkubirane 48 časova pri optimalnoj temperaturi za donore i recipijente. Nakon inkubacije, određen je broj kolonija na selektivnim i dvostruko selektivnim podlogama ( $\log \text{CFU/ml}$ ). Frekvencija prenosa je izračunata kao broj transkonjuganata po recipijentu.

Potencijalni transkonjuganti su ispitani na osetljivost prema tetraciklinu i na prisustvo *tet(M)* gena. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *Enterococcus faecium* IM338.

#### **4.3. Statistička analiza podataka**

U statističkoj analizi dobijenih rezultata korišćeni su deskriptivni statistički parametri: aritmetička sredina, standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrednost. Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno ili grafički. Statistička analiza dobijenih rezultata urađena je u statističkim paketima PrismaPad 7.00 i Microsoft Excell-u.

## 5. REZULTATI

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije će biti prikazani zasebno, shodno postavljenim zadacima, a u okviru poglavlja:

- Zastupljenost bakterija mlečne kiseline i subpopulacije bakterija mlečne kiseline rezistentne na tetraciklin
- Genotipizacija izolata bakterija mlečne kiseline i odabir reprezentativnih izolata za dalja ispitivanja
- Identifikacija izolata bakterija mlečne kiseline
- Ispitivanje osetljivosti na antibiotike kod izolata bakterija mlečne kiseline
- Ispitivanje prisustva gena za rezistenciju na tetraciklin kod izolata bakterija mlečne kiseline
- Ispitivanje mogućnosti prenosa gena za rezistenciju na tetraciklin na odabrane recipijente u uslovima *in vitro*

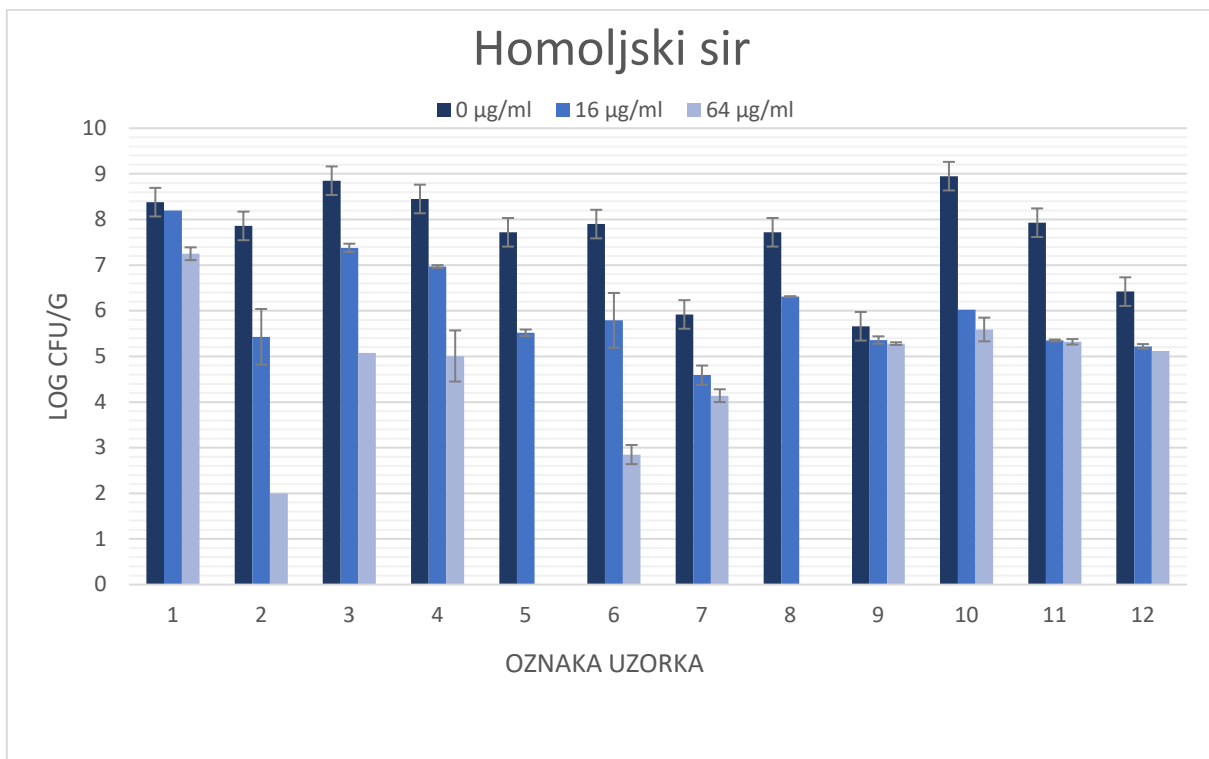
### 5.1. Zastupljenost bakterija mlečne kiseline i subpopulacije bakterija mlečne kiseline rezistentne na tetraciklin

Za određivanje zastupljenosti BMK u tradicionalnim sirevima Srbije korišćen je MRS-S agar. Preliminarni „*screening*“ subpopulacije BMK rezistentne na tetraciklin, omogućen je zasejavanjem uzoraka tradicionalnih sireva na MRS-S agar (“*pour plate*”) sa dodatkom tetraciklina u dvostrukorastućim koncentracijama 1-256 µg/ml. Granične vrednosti tetraciklina, u ovom slučaju, definišu se kao one koncentracije antibiotika, koje dodate MRS-S agaru čine ovaj agar selektivnim, dovodeći do redukcije broja osetljive populacije BMK, a podržavajući rast subpopulacije BMK rezistentne na tetraciklin. Nakon završene inkubacije, određivanjem broja kolonija na pločama MRS-S agara bez tetraciklina i sa dodatkom tetraciklina u dvostrukorastućim koncentracijama

(1-256 µg/ml), utvrđeno je da koncentracija tetraciklina od 16 µg/ml kod većine uzoraka tradicionalnih sireva dovodi do umerene redukcije broja BMK, dok koncentracija tetraciklina od 64 µg/ml u većoj meri redukuje broj BMK. Na osnovu toga, pretpostavka je bila da se MIK vrednosti za populaciju BMK poreklom iz tradicionalnih sireva Srbije, nalaze u intervalu 16-64 µg tetraciklina/ml, te su rezultati zastupljenosti subpopulacije BMK rezistentne na tetraciklin, prikazani u odnosu na koncentracije tetraciklina od 16 i 64 µg/ml. Promena broja BMK za svaki pojedinačan uzorak sira, u odnosu na sve ispitivane koncentracije tetraciklina (1-256 µg/ml), prikazana je na grafikonima u okviru Priloga.

Na Grafikonima 5.1.1-5.1.3 prikazan je broj BMK (log CFU/g) na MRS-S agaru bez dodatka tetraciklina, na pločama sa dodatkom 16 µg/ml i 64 µg/ml tetraciklina u uzorcima homoljskog, zlatarskog i sjeničkog sira.

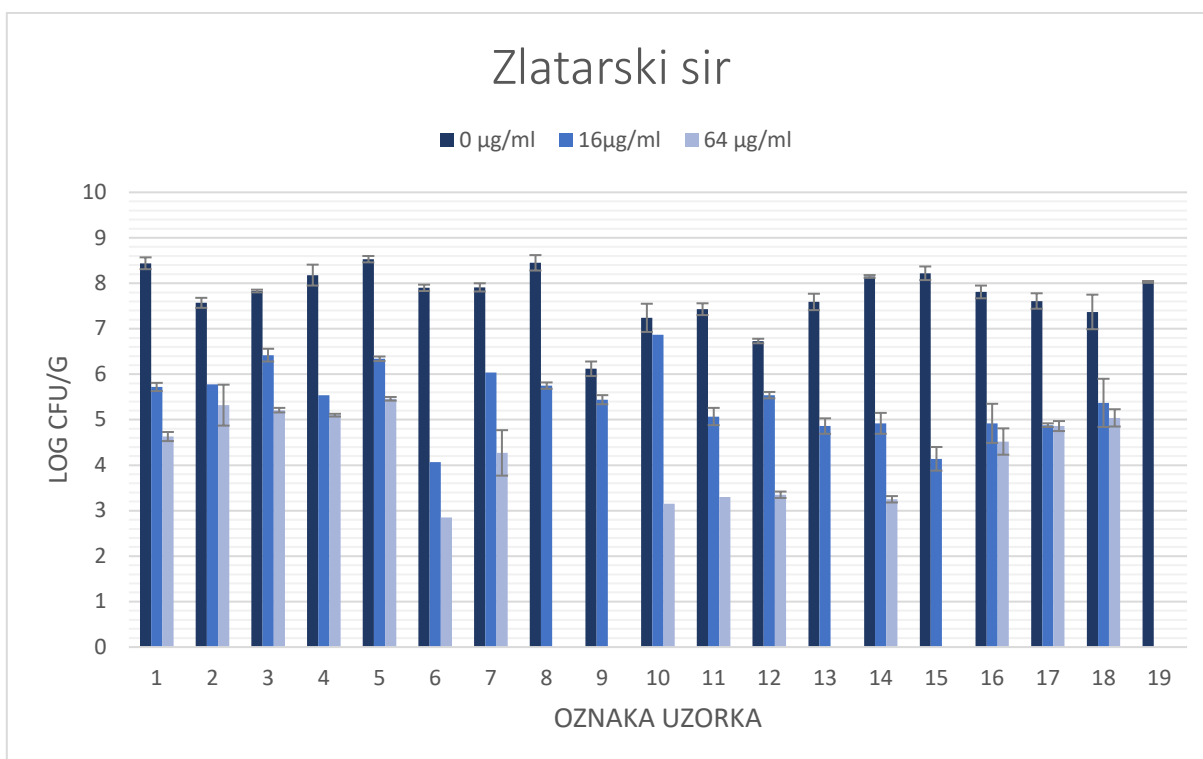
Prosečna vrednost broja BMK u homoljskom siru iznosila je  $7,65 \pm 1,09$  log CFU/g i kretala se u rasponu 5,66-8,95 log CFU/g (Grafikon 5.1.1). Kada je u podlogu dodat tetraciklin u koncentracijama 1, 2, 4 i 8 µg/ml nije došlo do većeg smanjenja broja BMK, osim u dva uzorka u kojima je već pri koncentraciji tetraciklina od 1 µg/ml došlo do pada broja BMK za više od 2 log CFU/g. Umereno smanjenje broja BMK (log CFU/g) primećeno je pri koncentraciji tetraciklina od 16 µg/ml. Koncentracija tetraciklina od 16 µg/ml je kod najvećeg broja uzoraka homoljskog sira izvršila redukciju broja BMK za 1,2-2,5 log CFU/g, sa izuzetkom dva uzorka kod kojih je redukcija bila manja od 1 log CFU/g, odnosno jednog uzorka kod koga je redukcija broja iznosila 2,95 log CFU/g. Vrednosti redukcije broja BMK su više varirale kada je u podlogu dodat tetraciklin u koncentraciji 64 µg/ml; u najvećem broju uzoraka homoljskog sira redukcija broja je iznosila 1-3,5 log CFU/g. Kod dva uzorka homoljskog sira, došlo je do kompletne inhibicije rasta, a kod dva uzorka redukcija broja je iznosila više od 5 log CFU/g. Pri koncentraciji tetraciklina od 64 µg/ml, prosečan broj BMK u uzorcima homoljskog sira iznosio je  $3,98 \pm 2,28$  log CFU/g. Izostanak rasta na pločama sa najvišim koncentracijama antibiotika (128 µg/ml i 256 µg/ml) primećen je kod četiri uzorka homoljskog sira (Prilog, Grafikon 3, 5, 6 i 8).



**Grafikon 5.1.1** – Broj BMK (log CFU/g) u homoljskom siru na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom 16 µg/ml i 64 µg/ml tetraciklina

Prosečna vrednost broja BMK u uzorcima zlatarskog sira iznosila je  $7,74 \pm 0,6$  log CFU/g, sa rasponom vrednosti 6,12-8,53 log CFU/g (Grafikon 5.1.2). Koncentracije tetraciklina u podlozi od 1, 2, 4 i 8 µg/ml nisu imale primetan uticaj na broj BMK. Redukcija broja BMK, kod najvećeg broja uzoraka, iznosila je oko 1 log CFU/g, osim u slučaju jednog uzorka sira kod koga je pad od 2,66 log CFU/g primećen već pri dodavanju 2 µg/ml tetraciklina u podlogu (Prilog, Grafikon 29). Veće smanjenje broja BMK zabeleženo je pri dodavanju 16 µg/ml tetraciklina u podlogu; redukcija broja BMK u većini uzoraka zlatarskog sira iznosila je 1,8-3 log CFU/g. Dodavanje tetraciklina u agar u koncentraciji od 16 µg/ml kod jednog uzorka zlatarskog sira je dovelo do potpune inhibicije rasta BMK. Visoke koncentracije tetraciklina (64 µg/ml) su dovele do većeg smanjenja broja BMK kod uzoraka zlatarskog sira. Smanjenje broja BMK, u ovom slučaju, iznosilo je 2,25-5,06 log CFU/g. Pri koncentraciji tetraciklina od 64 µg/ml, prosečan broj BMK u uzorcima zlatarskog sira iznosio je  $3,35 \pm 2,02$  log CFU/g. U slučaju

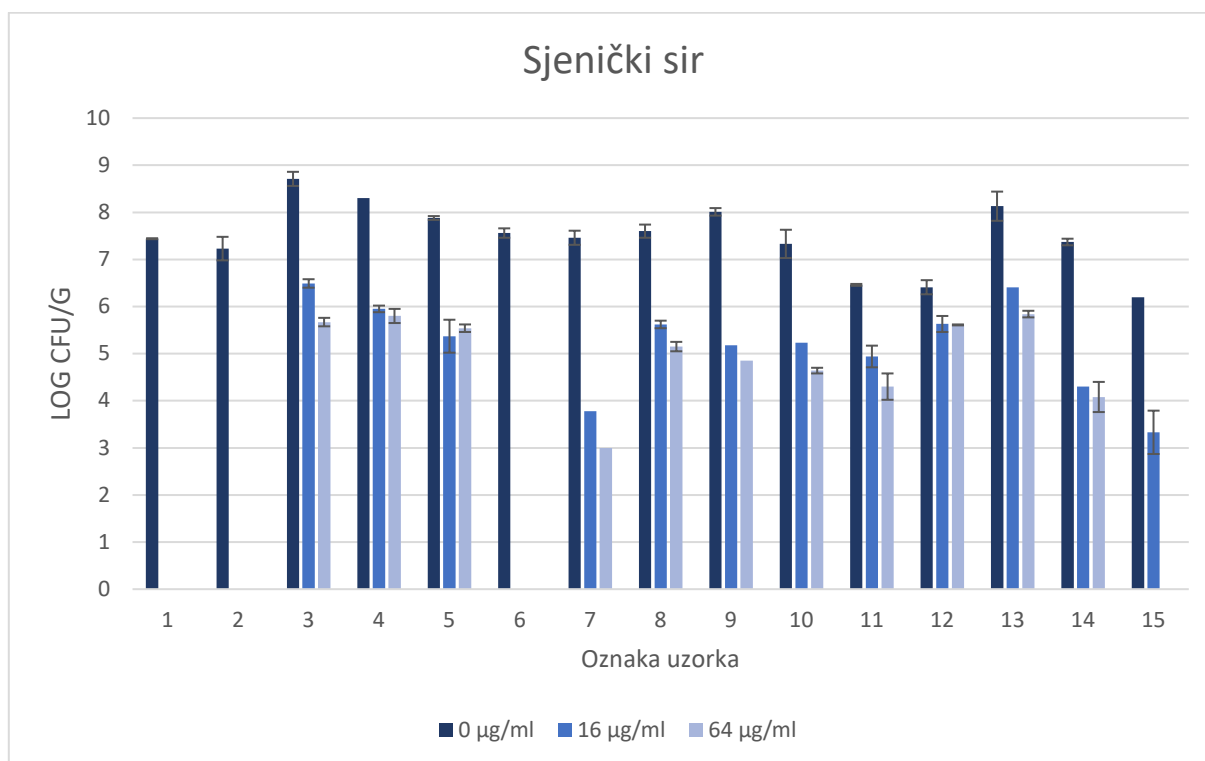
dodavanja 128 µg/ml tetraciklina u podlogu, kod 6 uzoraka zlatarskog sira na podlogama nije bilo vidljivog rasta (Prilog, Grafikoni 19, 20, 21, 25, 27 i 31). Izostanak rasta na pločama sa 256 µg/ml tetraciklina utvrđen je kod 8 uzoraka zlatarskog sira (Prilog, Grafikoni 19, 20, 21, 23, 24, 25, 27 i 31).



**Grafikon 5.1.2**– Broj BMK (log CFU/g) u zlatarskom siru na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom 16 µg/ml i 64µg/ml tetraciklina

U uzorcima sjeničkog sira prosečan broj BMK iznosio je  $7,47 \pm 0,71$  log CFU/g, sa intervalom 6,20-8,71 log CFU/g (Grafikon 5.1.3). Koncentracije tetraciklina u podlozi od 1, 2, 4 i 8 µg/ml, u najvećem broju uzoraka, dovele su do smanjenja broja BMK za oko 1 log CFU/g. U jednom uzorku sjeničkog sira koncentracija već od 1 µg/ml tetraciklina, dovela je do smanjenja broja BMK za više od 1,5 log CFU/g (Prilog, Grafikon 36). Kod jednog uzorka sjeničkog sira, primećena je potpuna inhibicija rasta BMK pri dodavanju tetraciklina u podlogu u koncentraciji od 8 µg/ml. Koncentracija tetraciklina od 16 µg/ml je kod najvećeg broja uzoraka sjeničkog sira dovela do smanjenja broja BMK za 2-3 log CFU/g, a u tri uzorka primećena je potpuna inhibicija rasta. Pri

koncentraciji tetraciklina od 64  $\mu\text{g/ml}$ , zapažaju se varijacije u smanjenju broja BMK (0,8-4,5 log CFU/g). Tetraciklin u koncentraciji od 64  $\mu\text{g/ml}$  u četiri uzorka sjeničkog sira doveo je do potpune inhibicije rasta BMK. Pri koncentraciji tetraciklina od 64  $\mu\text{g/ml}$ , prosečan broj BMK iznosio je  $3,93 \pm 2,24$  log CFU/g. Kod uzoraka sjeničkog sira kod koga je do potpune inhibicije rasta BMK došlo pri koncentraciji tetraciklina od 64  $\mu\text{g/ml}$ , izostanak rasta je postojao i pri najvišim koncentracijama antibiotika (128 i 256  $\mu\text{g/ml}$ ) (Prilog, Grafikoni 32, 33, 39 i 49).



**Grafikon 5.1.3** – Broj BMK (log CFU/g) u sjeničkom siru na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom 16  $\mu\text{g/ml}$  i 64  $\mu\text{g/ml}$  tetraciklina

U jednom uzorku homoljskog i zlatarskog sira nije primećen rast, kako na pločama bez tetraciklina, tako ni na pločama sa dodatkom tetraciklina, odnosno broj CFU/g je iznosio <100.



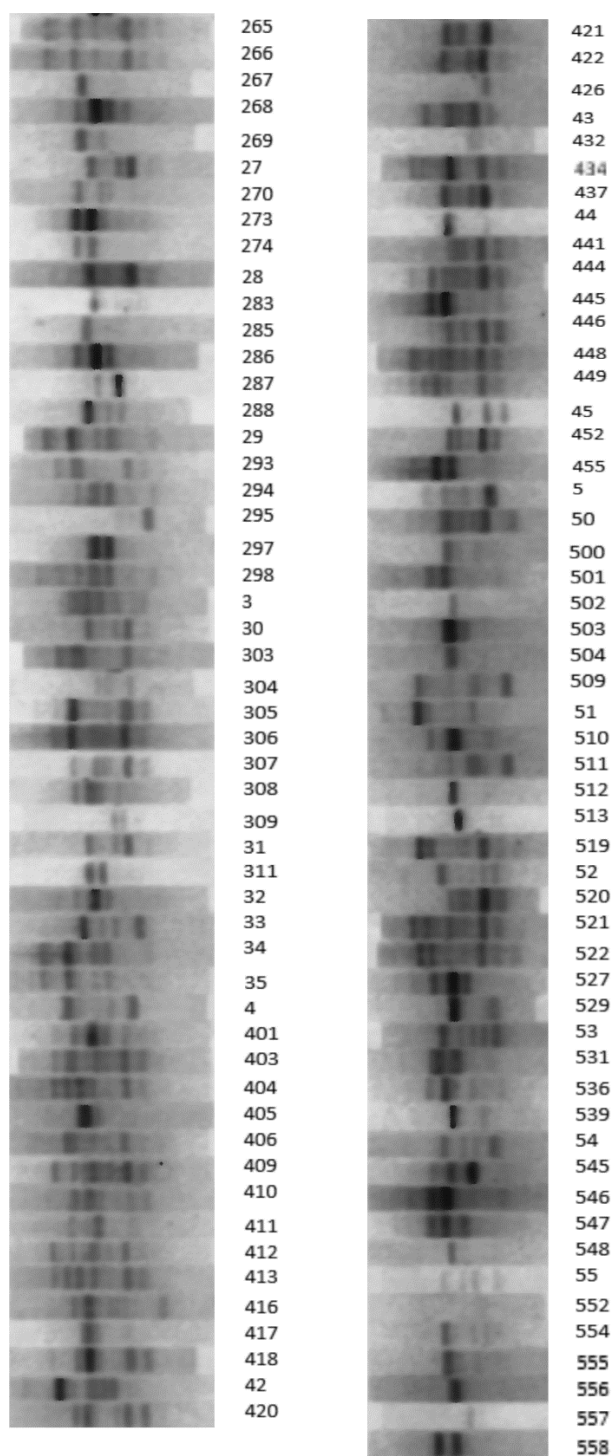
## 5.2. Genotipizacija izolata bakterija mlečne kiseline i odabir reprezentativnih izolata za dalja ispitivanja

Metodom slučajnog odabira, sa ploča bez tetraciklina i ploča u koje je dodat tetraciklin u različitim koncentracijama, odabrano je 395 kolonija. Od ukupnog broja primoizolata, na osnovu fenotipskih testova (bojenje po Gram-u i katalaza test), za dalja ispitivanja odabrano je 223 izolata. Kod svih gram pozitivnih, katalaza negativnih izolata, izvršena je izolacija DNK, a zatim i rep-PCR analiza.

Na osnovu proračuna sličnosti uz pomoć Dice-ovog koeficijenta korelacije, od ukupno 223 izolata, 162 (72,65%) izolata je pokazalo različite rep-PCR *“fingerprint”* tipove. Dobijeni rezultati ukazuju na veliku heterogenost, odnosno visoki genetički diverzitet izolata BMK u tradicionalnim sirevima Srbije. *„Fingerprint“* tipovi izolata BMK poreklom iz tradicionalnih sireva Srbije, prikazani su na Slici 5.2.1.

Izolati BMK, koji su pokazali različite *“fingerprint”* tipove, predstavljali su reprezentativne izolate, i kao takvi, odabrani su za dalja ispitivanja.

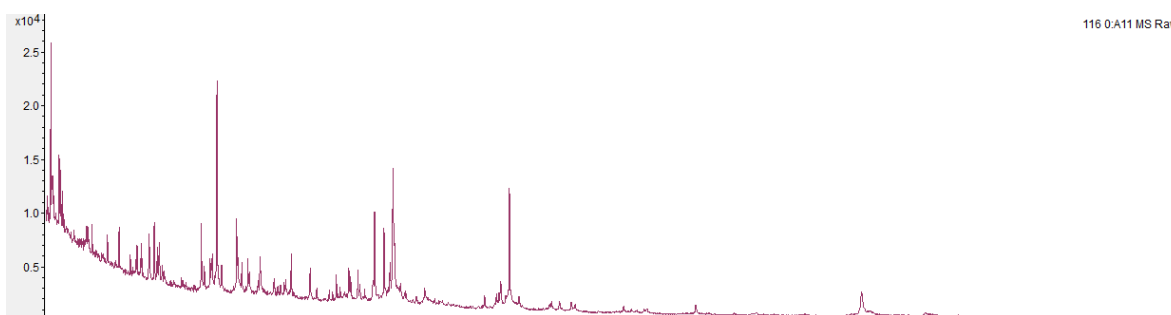
Najveći broj reprezentativnih izolata (124; 76,54%), očekivano, vodio je poreklo sa ploča MRS-S agara u koje nije dodat tetraciklin. Ostali izolati (38; 23,46%) vodili su poreklo sa ploča u koje je dodat tetraciklin: po četiri izolata sa ploča sa koncentracijom tetraciklina 8, 128 i 256  $\mu\text{g/ml}$ , 7 izolata sa ploča gde je tetraciklin dodat u koncentraciji 16  $\mu\text{g/ml}$ , 11 izolata sa ploča sa koncentracijom tetraciklina 32  $\mu\text{g/ml}$  i 8 izolata sa ploča gde je koncentracija tetraciklina iznosila 64  $\mu\text{g/ml}$ .



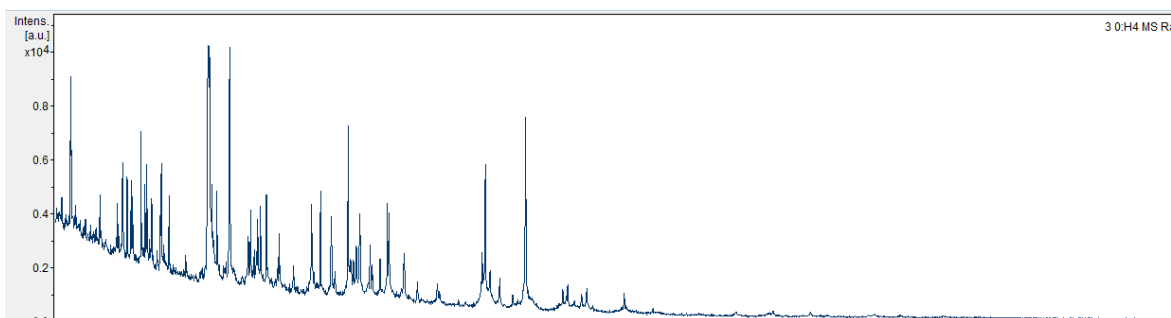
Slika 5.2.1 – (GTG)5 „fingerprintovi“ izolata BMK

### 5.3. Identifikacija izolata bakterija mlečne kiseline

MALDI TOF masena spektrometrija uspešno se primenjuje u identifikaciji, ne samo kliničkih, već i izolata bakterija iz hrane. Od ukupno 162 izolata BMK poreklom iz tradicionalnih sireva Srbije, primenom MALDI TOF masene spektrometrije, identifikovano je 155 (95,68%) izolata. Na Slikama 5.3.1 i 5.3.2 prikazani su „raw“ spektri MALDI TOF masene spektrometrije izolata *Lactobacillus paracasei* 116 i *Enterococcus faecalis* 3.



**Slika 5.3.1** – Prikaz spektra MALDI TOF masene spektrometrije za *Lactobacillus paracasei* 116



**Slika 5.3.2** – Prikaz spektra MALDI TOF masene spektrometrije za *Enterococcus faecalis* 3

Kod 7 izolata (4,32%) identifikacija nije bila uspešna (koeficijent pouzdanosti iznosio je ispod 1,5). Rezultati identifikacije izolata bakterija mlečne primenom MALDI TOF masene spektrometrije, prikazani su u tabeli Tabeli 5.3.1.

**Tabela 5.3.1** – Rezultati identifikacije izolata BMK primenom MALDI TOF masene spektrometrije

<b>Vrsta</b>	<b>Broj izolata (%)</b>	<b>Koeficijent pouzdanosti</b>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	37 (23,87)	2.031-2.416
<i>Lactobacillus paracasei</i>	29 (18,71)	2.053-2.402
<i>Lactobacillus brevis</i>	13 (8,39)	2.049-2.45
<i>Lactobacillus kefir</i>	5 (3,22)	2.079-2.394
<i>Lactobacillus curvatus</i>	3 (1,93)	2.23-2.377
<i>Lactobacillus parakefir</i>	2 (1,29)	1.704-1775
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	1 (0,65)	2.158
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	1 (0,65)	2.153
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	1 (0,65)	2.053
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	18 (11,61)	2.02-2.43
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	2 (1,29)	2.123-2.152
<i>Enterococcus faecalis</i>	17 (10,98)	2.253-2.495
<i>Enterococcus durans</i>	5 (3,22)	2.191-2.246
<i>Lactococcus lactis</i>	14 (9,03)	2.261-2.45
<i>Lactococcus garvieae</i>	5(3,22)	2.082-2.154
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2 (1,29)	2.057-2.09

Od ukupno 155 izolata, 153 su identifikovana sa koeficijentom pouzdanosti većim od 2, što ukazuje na identifikaciju do nivoa vrste. Kod 2 izolata (identifikovani kao *Lactobacillus parakefir*), koeficijent pouzdanosti identifikacije je iznosio <2, a  $\geq 1,7$ , što, prema uputstvu proizvođača, predstavlja uspešnu identifikaciju do nivoa roda. Ipak, kako je jedino preklapanje pomenutih izolata u bazi podataka bilo sa vrstom *Lactobacillus parakefir*, oni su u daljem istraživanju predstavljeni kao pripadnici ove vrste.

Među identifikovanim izolatima BMK, dominantni rod je predstavljao *Lactobacillus* sa ukupno 92 (59,35%) izolata. Osim što je brojčano bio najzastupljeniji, rod *Lactobacillus* pokazuje i najveći biodiverzitet. Identifikovano je 9 vrsta: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus paraplantarum* i *Lactobacillus diolivorans*. Najzastupljeniji su bili izolati *Lactobacillus plantarum*

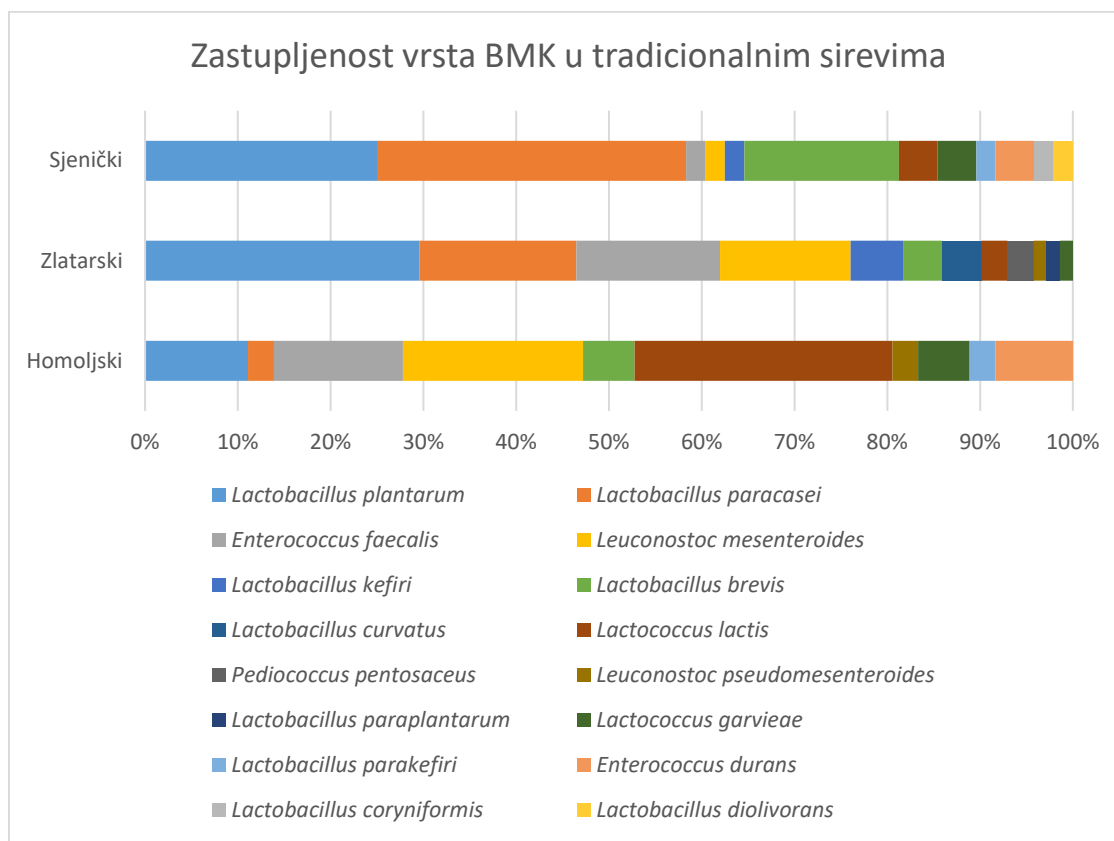
(40,22%), potom izolati *Lactobacillus paracasei* (31,52%) i *Lactobacillus brevis* (14,13%).

Manje zastupljenu populaciju BMK činila su tri roda, u okviru kojih je identifikovan približno podjednak broj izolata: rod *Enterococcus* sa 22 identifikovana izolata, rod *Leuconostoc* sa 20 identifikovanih izolata i rod *Lactococcus* sa 19 identifikovanih izolata. U okviru roda *Enterococcus* identifikovane su vrste *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus durans*; u okviru roda *Leuconostoc* vrste *Leuconostoc mesenteroides* i *Leuconostoc pseudomesenteroides*; u okviru roda *Lactococcus* vrste *Lactococcus lactis* i *Lactococcus garvieae*.

Najmanje zastupljen rod činio je *Pediococcus* sa dva izolata koja su pripadala istoj vrsti – *Pediococcus pentosaceus*.

Iz sjeničkog i zlatarskog sira izolovano je po 12 različitih vrsta, a iz homoljskog sira 10 vrsta BMK.

Posmatranjem distribucije izolata BMK u odnosu na vrstu sira, primećene su određene razlike (Grafikon 5.3.1).



**Grafikon 5.3.1** – Distribucija vrsta BMK u sjeničkom, homoljskom i zlatarskom siru

U sjeničkom siru najzastupljeniji rod predstavljao je *Lactobacillus*, sa 40 (83,33%) od ukupno 48 izolata BMK poreklom iz istog sira. Najzastupljenija vrsta laktobacila bio je *Lactobacillus paracasei* sa 16 (40%) izolata, a zatim *Lactobacillus plantarum* sa 12 (30%) izolata. Treću vrstu po zastupljenosti predstavljao je *Lactobacillus brevis* sa 8 (20%) izolata. Zapaženo je da od ukupno 13 identifikovanih izolata *Lactobacillus brevis*, 8 (61,54%) izolata je poreklom iz sjeničkog sira. Vrste iz roda *Lactococcus* – *Lactococcus lactis* i *Lactococcus garvieae*, u sjeničkom siru, bile su predstavljene sa po dva izolata, kao i vrsta *Enterococcus durans*. Vrste *Enterococcus faecalis* i *Leuconostoc mesenteroides* su bile sporadičan nalaz sa po jednim izolatom. Sa po jednim izolatom, u sjeničkom siru, bile su prisutne vrste: *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parakefiri*, *Lactobacillus coryniformis* i *Lactobacillus diolivorans*.

Najveći broj od ukupno 155 identifikovanih izolata BMK, njih 71 (45,81%), poreklom je iz zlatarskog sira. Kao i kod sjeničkog sira, dominantan rod predstavljao je *Lactobacillus* sa 44 (62,86%) izolata. Zastupljenost izolata u okviru pojedinih vrsta laktobacila, poreklom iz zlatarskog sira, razlikovala se u odnosu na sjenički. Najzastupljenija vrsta bio je *Lactobacillus plantarum*, sa 21 (47,73%) izolatom, zatim vrsta *Lactobacillus paracasei* sa 12 (27,27%) izolata. U zlatarskom siru, *Lactobacillus kefir* je bio predstavljen sa četiri (9,1%) izolata, vrste *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus curvatus* sa po tri (6,8%) izolata, a *Lactobacillus parapantarum* sa jednim (2,27%) izolatom. Za razliku od sjeničkog sira gde je utvrđen sporadičan nalaz vrsta *Enterococcus faecalis* i *Leuconostoc mesenteroides*, u zlatarskom siru *Enterococcus faecalis* je bio zastupljen sa 11 (15,71%) izolata, a *Leuconostoc mesenteroides* sa 10 (14,29%) izolata. Rod *Lactococcus*, kao i u slučaju sjeničkog sira, u zlatarskom siru je činio sporadični nalaz sa dva izolata *Lactococcus lactis* i jednim izolatom vrste *Lactococcus garvieae*. Osim navedenih vrsta, u zlatarskom siru, identifikovan je i jedan izolat *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Svi izolati *Lactobacillus curvatus* (3) i *Pediococcus pentosaceus* (2) koji su izolovani u okviru ove doktorske disertacije, vodili su poreklo iz zlatarskog sira. U slučaju vrste *Lactobacillus kefir*, najveći broj izolata, četiri od ukupno pet izolovanih u okviru ove doktorske disertacije, poreklom je iz zlatarskog sira.

U odnosu na sjenički i zlatarski sir, kod homoljskog sira najzastupljeniji rod predstavljao je *Lactococcus*, sa 12 (33,33%), od ukupno 36 izolata. U okviru roda, *Lactococcus lactis* je bio predstavljen sa 10 (83,33%) izolata, a *Lactococcus garvieae* sa 2 (16,67%) izolata. Za razliku od sjeničkog i zlatarskog sira, u homoljskom siru laktobacili su bili daleko manje zastupljeni. Od ukupno 36 izolata BMK poreklom iz homoljskog sira, 8 (22,22%) predstavljali su laktobacili. U okviru ovog roda, u homoljskom siru, identifikovane su četiri vrste: *Lactobacillus plantarum* (4;50%), *Lactobacillus brevis* (2;25%), *Lactobacillus paracasei* (1;12,5%) i *Lactobacillus parakefir* (1;12,5%). Kod izolata BMK poreklom iz homoljskog sira, *Leuconostoc mesenteroides* je bio predstavljen sa 7 (19,44%) izolata, *Enterococcus faecalis* sa pet

(13,89%) izolata, a *Enterococcus durans* sa tri (8,33%) izolata. Osim navedenih vrsta, kod izolata poreklom iz homoljskog sira, identifikovan je i jedan izolat *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

#### **5.4. Ispitivanje osetljivosti na antibiotike kod izolata bakterija mlečne kiseline**

Kod identifikovanih izolata BMK (n=155), ispitana je osetljivost na odabrane antibiotike. Izolati BMK, sa izuzetkom enterokoka, ukupno 133 izolata, ispitani su na osetljivost prema 8 antibiotika, preporučenih od strane EFSA Panela (FEEDAP): gentamicin, kanamicin, streptomycin, tetraciklin, eritromicin, klindamicin, hloramfenikol i ampicilin. Enterokoke se, pored toga što veoma uspešno razmenjuju gene rezistencije na antibiotike, prepoznaju i kao oportunističko patogene bakterije. Iz ovog razloga, kod izolata enterokoka (n=22), pored osetljivosti na gentamicin, tetraciklin, eritromicin, hloramfenikol i ampicilin, dodatno je ispitana osetljivost na vankomicin, teikoplanin, kvinpristin/dalfopristin, daptomicin, ciprofloksacin, tigeciklin i linezolid, ukupno 12 antibiotika.

Rezultati distribucije MIK vrednosti za svaki od ispitivanih antibiotika kod izolata bakterija mlečne kiseline prikazani su u Tabelama 5.4.1-5.4.8.

Osetljivost na gentamicin, predstavnika grupe aminoglikozidnih antibiotika, ispitivana je kod svih 155 izolata BMK, s tom razlikom što se raspon ispitivanih koncentracija gentamicina razlikovao kod enterokoka u odnosu na druge vrste BMK (Tabela 5.4.1.).



**Tabela 5.4.1** – Distribucija MIK vrednosti za gentamicin kod izolata BMK

<b>Distribucija MIK vrednosti (<math>\mu\text{g/ml}</math>) za gentamicin</b>											
<b>Vrste</b>	<b>MIK (<math>\mu\text{g/ml}</math>)*</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>64</b>	<b>128</b>	<b>256</b>
<i>Lactobacillus plantarum</i> (n=37)	<b>16</b>	2	13	5	7	9					<b>1</b>
<i>Lactobacillus paracasei</i> (n=29)	<b>32</b>				1	2	12	13	<b>1</b>		
<i>Lactobacillus kefir</i> n=5)	<b>16</b>	4	1								
<i>Lactobacillus brevis</i> n=13)	<b>16</b>	1	2	4	4	2					
<i>Lactobacillus curvatus</i> (n=3)	<b>16</b>	1			2						
<i>Lactobacillus parakefir</i> (n=2)	<b>16</b>	2									
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> (n=1)	<b>16</b>				1						
<i>Lactobacillus coryniformis</i> (n=1)	<b>16</b>					1					
<i>Lactobacillus diolivorans</i> (n=1)	<b>16</b>		1								
<i>Lactococcus lactis</i> (n=14)	<b>32</b>			1	8	5					
<i>Lactococcus garvieae</i> (n=5)	<b>4</b>				4	<b>1</b>					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (n=18)	<b>16</b>		1	5	9	2				<b>1</b>	
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (n=2)	<b>16</b>				1		1				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (n=2)	<b>16</b>						1	<b>1</b>			

<b>Distribucija MIK vrednosti (<math>\mu\text{g/ml}</math>) za gentamicin</b>									
<b>Vrste</b>	<b>MIK (<math>\mu\text{g/ml}</math>)*</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>64</b>	<b>128</b>	<b>256</b>	<b>512</b>	<b>1024</b>
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=17)	<b>32</b>	14							<b>3</b>
<i>Enterococcus durans</i> (n=5)	<b>4</b>	5							

\* Rezistentni izolati imaju vrednosti MIK veće od naznačenih graničnih vrednosti

Rezistencija na gentamicin nije bila zastupljena kod velikog broja izolata BMK. Ukupno 13 (8,39%) izolata BMK pokazalo je rezistenciju na gentamicin. Izolati BMK rezistentni na gentamicin pripadali su vrstama *Enterococcus durans* (5), *Enterococcus faecalis* (3) i po jedan izolat *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus garvieae*, *Leuconostoc mesenteroides* i *Pediococcus pentosaceus*. Vredna zapažanja jeste činjenica da je svih pet izolata *Enterococcus durans*, identifikovanih u okviru ove doktorske disertacije, pokazalo rezistenciju na gentamicin. U slučaju interpretacije rezultata osetljivosti na antibiotike kod ove vrste enterokoka, treba imati

u vidu da ne postoje granične vrednosti (MIK) koje su specifične za datu vrstu. Rezultati su interpretirani na osnovu MIK vrednosti za pripadnike svih ostalih vrsta gram pozitivnih bakterija (*engl. "other gram positive bacteria"*), za koje u vodiču EFSA Panela (FEEDAP) nisu postavljene MIK vrednosti specifične u odnosu na vrstu. U ovom slučaju, MIK vrednost za gentamicin iznosi 4 µg/ml, što je za 4-8 puta niža MIK vrednost u odnosu na druge vrste BMK. S obzirom na mali broj ispitanih izolata *Enterococcus durans* (n=5), nije postojala mogućnost da se na osnovu rezultata distribucije MIK vrednosti za gentamicin, a u okviru ovog istraživanja, samostalno odrede granične vrednosti.

Osetljivost na kanamicin, drugi predstavnik grupe aminoglikozidnih antibiotika, ispitana je kod 133 izolata BMK (Tabela 5.4.2). Prema vodiču Referentne laboratorije Evropske Unije za rezistenciju na antimikrobne lekove, ispitivanje osetljivosti na kanamicin kod enterokoka nije predviđeno, te su, u slučaju ovog antibiotika, predstavnici roda *Enterococcus* bili izostavljeni.

**Tabela 5.4.2 – Distribucija MIK vrednosti za kanamicin kod izolata BMK**

Distribucija MIK vrednosti (µg/ml) za kanamicin											
Vrste	MIK (µg/ml)*	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
<i>Lactobacillus plantarum</i> (n=37)	64		2	4	11	4	13	2			1
<i>Lactobacillus paracasei</i> (n=29)	64						4	14	10	1	
<i>Lactobacillus kefir</i> (n=5)	32		3	1	1						
<i>Lactobacillus brevis</i> (n=13)	32				1	8	2	2			
<i>Lactobacillus curvatus</i> (n=3)	64			2	1						
<i>Lactobacillus parakefir</i> (n=2)	32		2								
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> (n=1)	64						1				
<i>Lactobacillus coryniformis</i> (n=1)	64						1				
<i>Lactobacillus diolivorans</i> (n=1)	32				1						
<i>Lactococcus lactis</i> (n=14)	64		1	5	6	2					
<i>Lactococcus garvieae</i> (n=5)	16				4			1			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (n=18)	16		1		3	7	3	3			1
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (n=2)	16				1		1				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (n=2)	64								2		

\* Rezistentni izolati imaju vrednosti MIK veće od naznačenih graničnih vrednosti

Rezistencija na kanamicin predstavljala je najzastupljeniji profil rezistencije kod izolata BMK obuhvaćenih ovim istraživanjem. Od ukupno ispitanih 133 izolata BMK, 50 (37,59%) izolata je pokazalo fenotipsku rezistencije na kanamicin. Rezistencija na kanamicin, ujedno je i predstavljala najzastupljeniji profil rezistencije kod dve vrste BMK: *Lactobacillus paracasei*, gde je 25 od 29 izolata bilo rezistentno (86,21%) i *Leuconostoc mesenteroides*, gde je 14 od 18 sojeva (77,78%) bilo rezistentno na kanamicin. Suprotno ovom nalazu, kod najzastupljenije vrste laktobacila poreklom iz tradicionalnih sireva, *Lactobacillus plantarum*, rezistencija na kanamicin je utvrđena kod tri (8,1%) od ukupno 37 izolata. Rezistencija na kanamicin predstavljala je karakteristiku i dva izolata *Pediococcus pentosaceus*, identifikovanih u okviru ove studije. Kod 7 vrsta BMK nisu utvrđeni izolati rezistentni na kanamicin: *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus parakefiri*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus diolivorans* i *Lactococcus lactis*.

Prema vodiču EFSA Panela (FEEDAP), ispitivanje osetljivosti na streptomycin, pripadnika grupe aminoglikozidnih antibiotika, nije predviđeno za vrstu *Lactobacillus plantarum*. Vodič Referentne laboratorije Evropske unije za rezistenciju na antimikrobne lekove, ni kod *Enterococcus* spp. ne predviđa ispitivanje rezistencije na streptomycin. Rezultati ispitivanja osetljivosti na streptomycin kod preostalih izolata BMK (n=96), prikazana je u Tabeli 5.4.3.

**Tabela 5.4.3** – Distribucija MIK vrednosti za streptomycin kod izolata BMK

Distribucija MIK vrednosti ( $\mu\text{g/ml}$ ) za streptomycin											
Vrste	MIK ( $\mu\text{g/ml}$ )*	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
<i>Lactobacillus paracasei</i> (n=29)	64							5	16	8	
<i>Lactobacillus kefir</i> (n=5)	64				2	3					
<i>Lactobacillus brevis</i> (n=13)	64						4	7	2		
<i>Lactobacillus curvatus</i> (n=3)	64				2	1					
<i>Lactobacillus parakefir</i> (n=2)	64				2						
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> (n=1)	64								1		
<i>Lactobacillus coryniformis</i> (n=1)	64							1			
<i>Lactobacillus diolivorans</i> (n=1)	64					1					
<i>Lactococcus lactis</i> (n=14)	32					1	4	8	1		
<i>Lactococcus garvieae</i> (n=5)	8								3	2	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (n=18)	64						1	7	5	4	1
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (n=2)	64							1	1		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (n=2)	64									1	1

\* Rezistentni izolati imaju vrednosti MIK veće od naznačenih graničnih vrednosti

Rezistencija na streptomycin zapažena je kod 21 od ukupno 96 izolata BMK (21,88%). Kod vrste *Lactococcus garvieae*, rezistencija na kanamicin predstavljala je najzastupljeniji fenotip rezistencije, s obzirom da su svi izolati, identifikovani u okviru ove doktorske disertacije kao *Lactococcus garvieae*, bili rezistentni. I u slučaju ove kombinacije antibiotik/vrsta, prema vodiču EFSA Panela (FEEDAP), MIK vrednosti nisu specifične u odnosu na vrstu. Shodno ovome, rezultati se intepretiraju na osnovu MIK vrednosti za pripadnike ostalih vrsta gram pozitivnih bakterija. U ovom slučaju, MIK vrednost za streptomycin iznosi 8  $\mu\text{g/ml}$ , što je za 8 puta niža MIK vrednost u odnosu na druge vrste BMK. Budući da su svih pet izolata *Lactococcus garvieae* pokazali izuzetno visok nivo rezistencije na streptomycin (MIK vrednost 64  $\mu\text{g/ml}$  i 128  $\mu\text{g/ml}$ ) može se sa velikom sigurnošću pretpostaviti da su izolati bili rezistentni, bez obzira na “nespecifično” postavljene granične vrednosti. Rezistencija na streptomycin predstavljala je karakteristiku 8 (27,59%) izolata *Lactobacillus paracasei*, i pet (27,78%) izolata *Leuconostoc mesenteroides*. Osim vrste *Lactobacillus paracasei*, nijedna druga vrsta laktobacila nije pokazala rezistenciju na streptomycin. Kao i u

slučaju kanamicina, antibiotika iz iste klase, oba izolata *Pediococcus pentosaceus* bila su rezistentna na streptomycin.

Kod svih 155 identifikovanih izolata BMK ispitana je osetljivost na tetraciklin (Tabela 5.4.4.)

**Tabela 5.4.4 – Distribucija MIK vrednosti za tetraciklin kod izolata BMK**

Distribucija MIK vrednosti (µg/ml) za tetraciklin											
Vrste	MIK (µg/ml)*	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
<i>Lactobacillus plantarum</i> (n=37)	32						21	16			
<i>Lactobacillus paracasei</i> (n=29)	4		24	4				1			
<i>Lactobacillus kefir</i> (n=5)	8						1	2	2		
<i>Lactobacillus brevis</i> (n=13)	8						3	9	1		
<i>Lactobacillus curvatus</i> (n=3)	8	1	1	1							
<i>Lactobacillus parakefir</i> (n=2)	8								1	1	
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> (n=1)	8							1			
<i>Lactobacillus coryniformis</i> (n=1)	8		1								
<i>Lactobacillus diolivorans</i> (n=1)	8							1			
<i>Lactococcus lactis</i> (n=14)	4	9	2	2						1	
<i>Lactococcus garvieae</i> (n=5)	2			2			1				2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (n=18)	8			1	12	2	1		1		1
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (n=2)	8				1					1	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (n=2)	8							2			

Distribucija MIK vrednosti (µg/ml) za tetraciklin									
Vrste	MIK (µg/ml)*	1	2	4	8	16	32	64	128
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=17)	4			8				8	1
<i>Enterococcus durans</i> (n=5)	8			5					

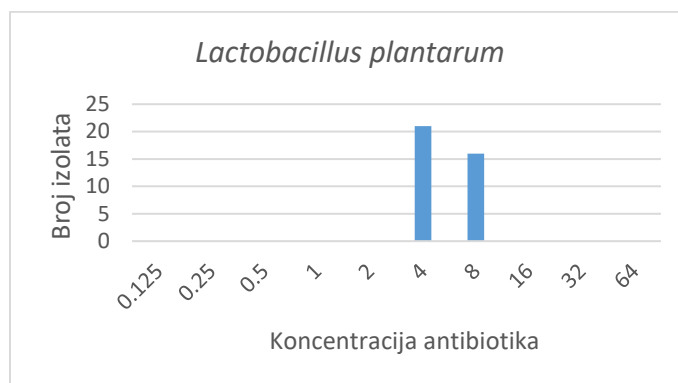
\* Rezistentni izolati imaju vrednosti MIK veće od naznačenih graničnih vrednosti

Rezistencija na tetraciklin je utvrđena kod 21 (13,55%) izolata BMK. Od izolata BMK sa fenotipom rezistencije na tetraciklin, 9 (42,86%) izolata pripadalo je vrsti *Enterococcus faecalis*. Izolati *Enterococcus faecalis* su pokazali visok nivo rezistencije na

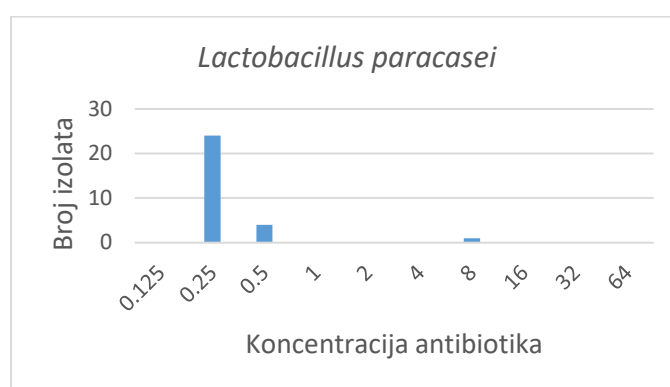
tetraciklin; 8 izolata je pokazalo MIK od 64 µg/ml, a jedan izolat i najvišu ispitivanu MIK vrednost (128 µg/ml). Ostali izolati BMK, koji su se karakterisali rezistencijom na tetraciklin, pripadali su vrstama: *Lactobacillus paracasei* (1), *Lactobacillus kefir* (2), *Lactobacillus brevis* (1), *Lactobacillus parakefir* (2), *Lactococcus lactis* (1), *Lactococcus garvieae* (2), *Leuconostoc mesenteroides* (2) i *Leuconostoc pseudomesenteroides* (1).

Kako je središnji deo ove doktorske disertacije rezistencija na tetraciklin kod izolata BMK, ispitivanje nije bilo isključivo usmereno na detekciju prisustva, odnosno odsustva ovog profila rezistencije, već i na utvrđivanje oblika (urođena ili stečena) rezistencije. Iako je molekularna karakterizacija gena rezistencije jedini način za tačnu i potpunu karakterizaciju oblika rezistencije na antibiotike, distribucija MIK vrednosti u odnosu na dati antibiotik može da ukaže na postojanje stečene rezistencije u određenoj populaciji bakterija. U svrhu preliminarnog utvrđivanja oblika rezistencije na tetraciklin kod izolata BMK, predstavljeni su histogrami distribucije MIK vrednosti za tetraciklin, kod onih vrsta BMK koji su imali veći broj izolata (*Lactobacillus plantarum* n=37; *Lactobacillus paracasei* n=29 i *Enterococcus faecalis* n=17) (Grafikoni 5.4.1-5.4.3.).

Prema konzensusu u naučnoj zajednici (Murray i sar., 2003), distribucija MIK vrednosti za dati antibiotik unutar jedne vrste bakterija, u odsustvu stečenih mehanizama rezistencije (mutacija ili lateralni transfer gena), pokazuje raspodelu sličnu zvonastoj simetričnoj raspodeli, tzv. unimodalna distribucija. Kako je predstavljeno na grafikonima 5.4.1. I 5.4.2. unimodalna distribucija MIK vrednosti se zapaža kod *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus paracasei*. Pretpostavka je da jedan izolat unutar populacije *Lactobacillus plantarum*, čiji MIK ne pokazuje tzv. statističku normalnost, ne predstavlja izolat sa stečenom rezistencijom, jer se ne radi o visokom nivou rezistencije na tetraciklin (MIK 8 µg/ml).

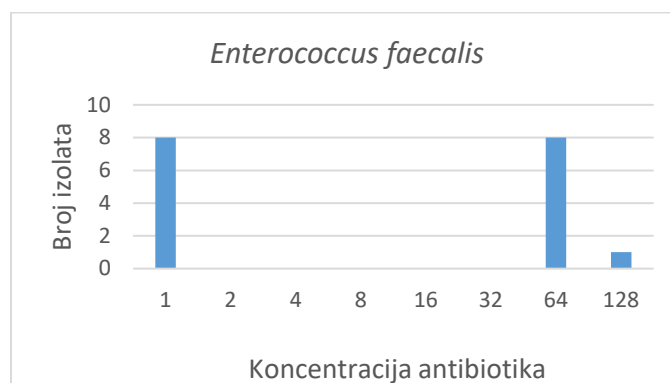


**Grafikon 5.4.1** – Distribucija MIK vrednosti za tetraciklin kod izolata *Lactobacillus plantarum*



**Grafikon 5.4.2** – Distribucija MIK za tetraciklin kod izolata *Lactobacillus paracasei*

Ukoliko distribucija MIK vrednosti pokazuje tzv. bimodalnu raspodelu, gde se jedan deo bakterijske populacije jasno razlikuje od osetljive većine, u tom slučaju postoji indikacija stečene rezistencije. Kod vrste *Enterococcus faecalis* ustanovljena je tipična bimodalna distribucija MIK vrednosti za tetraciklin (Grafikon 5.4.3.).



**Grafikon 5.4.3.** – Distribucija MIK vrednosti za tetraciklin kod izolata *Enterococcus faecalis*

Osetljivost na eritromicin, predstavnika grupe makrolidnih antibiotika, ispitana je kod svih identifikovanih izolata BMK (Tabela 5.4.5.)

**Tabela 5.4.5 – Distribucija MIK vrednosti za eritromicin kod izolata BMK**

<b>Distribucija MIK vrednosti (<math>\mu\text{g/ml}</math>) za eritromicin</b>											
<b>Vrste</b>	<b>MIK (<math>\mu\text{g/ml}</math>)*</b>	<b>0.016</b>	<b>0.032</b>	<b>0.064</b>	<b>0.125</b>	<b>0.25</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
<i>Lactobacillus plantarum</i> (n=37)	1	1	1	9	14	9	1	2			
<i>Lactobacillus paracasei</i> (n=29)	1	2	14	10	2	1					
<i>Lactobacillus kefir</i> (n=5)	1	1	4								
<i>Lactobacillus brevis</i> (n=13)	1			1	8	4					
<i>Lactobacillus curvatus</i> (n=3)	1		1	2							
<i>Lactobacillus parakefir</i> (n=2)	1		2								
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> (n=1)	1				1						
<i>Lactobacillus coryniformis</i> (n=1)	1				1						
<i>Lactobacillus diolivorans</i> (n=1)	1					1					
<i>Lactococcus lactis</i> (n=14)	1		3	5	4	2					
<i>Lactococcus garvieae</i> (n=5)	0.5		3	2							
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (n=18)	1			2	11	4					1
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (n=2)	1					2					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (n=2)	1					1	1				

<b>Distribucija MIK vrednosti (<math>\mu\text{g/ml}</math>) za eritromicin</b>									
<b>Vrste</b>	<b>MIK (<math>\mu\text{g/ml}</math>)*</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>64</b>	<b>128</b>
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=17)	4	6	4	1					6
<i>Enterococcus durans</i> (n=5)	8	5							

\* Rezistentni izolati imaju vrednosti MIK veće od naznačenih graničnih vrednosti

Sa izuzetkom *Enterococcus faecalis*, rezistencija na eritromicin kod izolata bakterija mlečne kiseline poreklom iz tradicionalnih sireva Srbije bila je izuzetno retka. Svega dva izolata *Lactobacillus plantarum* i jedan izolat *Leuconostoc mesenteroides* pokazali su rezistenciju na eritromicin. Kod vrste *Enterococcus faecalis*, od ukupno 17 izolata, 6 (35,29%) izolata je bilo rezistentno na eritromicin. Svih 6 izolata *Enterococcus faecalis* sa karakteristikom rezistencije na eritromicin, pokazali su visok nivo



rezistencije na ovaj antibiotik (MIK 128 µg/ml), što je indikacija stečenih mehanizama rezistencije.

Za ispitivanje osetljivosti na linkozamide, od strane EFSA Panela (FEEDAP), preporučen je klindamicin. Kako vodič Referentne laboratorije Evropske Unije za rezistenciju na antimikrobne lekove, ne zahteva ispitivanje osetljivosti na klindamicin kod *Enterococcus* spp., enterokoke nisu bile obuhvaćene u ovom ispitivanju. Rezultati ispitivanja osetljivosti na klindamicin kod izolata BMK prikazani su u tabeli 5.4.6.

**Tabela 5.4.6 – Distribucija MIK vrednosti za klindamicin kod izolata BMK**

Distribucija MIK vrednosti (µg/ml) za klindamicin											
Vrsta	MIK (µg/ml)	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
<i>Lactobacillus plantarum</i> (n=37)	2	2	1	3	9	9	7	3	3		
<i>Lactobacillus paracasei</i> (n=29)	1	3	14	9	2		1				
<i>Lactobacillus kefir</i> (n=5)	1	3	1	1							
<i>Lactobacillus brevis</i> (n=13)	1	3						1	4	3	2
<i>Lactobacillus curvatus</i> (n=3)	1	3									
<i>Lactobacillus parakefir</i> (n=2)	1	1	1								
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> (n=1)	1						1				
<i>Lactobacillus coryniformis</i> (n=1)	1		1								
<i>Lactobacillus diolivorans</i> (n=1)	1	1									
<i>Lactococcus lactis</i> (n=14)	1	1	6	5	1						1
<i>Lactococcus garvieae</i> (n=5)	0.25		2	2	1						
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (n=18)	1	2	12	3							1
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (n=2)	1	1	1								
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (n=2)	1	2									

\* Rezistentni izolati imaju vrednosti MIK veće od naznačenih graničnih vrednosti

Od ukupno 133 izolata BMK, rezistenciju na klindamicin pokazalo je 15 (11,28%) izolata. Izolati BMK, rezistentni na klindamicin, utvrđeni su kod četiri vrste BMK: *Lactobacillus plantarum* (3), *Lactobacillus brevis* (10), *Lactococcus lactis* (1) i *Leuconostoc mesenteroides* (1). Kod vrste *Lactobacillus brevis*, 10 (76,92%) od ukupno 13 izolata, karakterisalo se rezistencijom na klindamicin.

Osetljivost na hloramfenikol ispitana je kod svih izolata BMK. Rezultati ispitivanja osetljivosti na hloramfenikol kod izolata BMK, prikazani je u Tabeli 5.4.7.

**Tabela 5.4.7 – Distribucija MIK vrednosti za hloramfenikol kod izolata BMK**

Distribucija MIK vrednosti ( $\mu\text{g/ml}$ ) za hloramfenikol											
Vrste	MIK ( $\mu\text{g/ml}$ )*	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
<i>Lactobacillus plantarum</i> (n=37)	8					4	31	2			
<i>Lactobacillus paracasei</i> (n=29)	4					1	28				
<i>Lactobacillus kefir</i> (n=5)	4					4		1			
<i>Lactobacillus brevis</i> (n=13)	4						10	3			
<i>Lactobacillus curvatus</i> (n=3)	4					3					
<i>Lactobacillus parakefir</i> (n=2)	4					1	1				
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> (n=1)	4					1					
<i>Lactobacillus coryniformis</i> (n=1)	4						1				
<i>Lactobacillus diolivorans</i> (n=1)	4					1					
<i>Lactococcus lactis</i> (n=14)	8					12	2				
<i>Lactococcus garvieae</i> (n=5)	2					5					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (n=18)	4						12	5			1
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (n=2)	4						2				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (n=2)	4						2				

Distribucija MIK vrednosti ( $\mu\text{g/ml}$ ) za hloramfenikol							
Vrste	MIK ( $\mu\text{g/ml}$ )*	4	8	16	32	64	128
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=17)	32	6	7	1	1	2	
<i>Enterococcus durans</i> (n=5)	n.d.	5					

\* Rezistentni izolati imaju vrednosti MIK veće od naznačenih graničnih vrednosti

Kod 12 (7,74%) izolata BMK je dokazana rezistencija na hloramfenikol. Izolati BMK, rezistentni na hloramfenikol, pripadali su vrstama: *Lactobacillus kefir* (1), *Lactobacillus brevis* (3), *Leuconostoc mesenteroides* (6) i *Enterococcus faecalis* (2). Iako za *Enterococcus durans* nisu predložene granične vrednosti (MIK) za hloramfenikol, može se pretpostaviti da su svi izolati bili osetljivi na hloramfenikol, s obzirom da su već i najmanje ispitivane koncentracije antibiotika bile inhibitorne.

Kod svih izolata BMK ispitana je osetljivost na ampicilin. Rezultati ispitivanja osetljivosti na ampicilin kod izolata BMK prikazana je u Tabeli 5.4.8.

**Tabela 5.4.8** – Distribucija MIK vrednosti za ampicilin kod izolata BMK

Distribucija MIK vrednosti ( $\mu\text{g/ml}$ ) za ampicilin											
Vrste	MIK ( $\mu\text{g/ml}$ )*	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
<i>Lactobacillus plantarum</i> (n=37)	2	1	10	19	3		2	1	1		
<i>Lactobacillus paracasei</i> (n=29)	4	1				8	20				
<i>Lactobacillus kefir</i> (n=5)	2					1	4				
<i>Lactobacillus brevis</i> (n=13)	2					4	8	1			
<i>Lactobacillus curvatus</i> (n=3)	2					2	1				
<i>Lactobacillus parakefir</i> (n=2)	4					1	1				
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> (n=1)	2		1								
<i>Lactobacillus coryniformis</i> (n=1)	4						1				
<i>Lactobacillus diolivorans</i> (n=1)	2						1				
<i>Lactococcus lactis</i> (n=14)	4		5	5	4						
<i>Lactococcus garvieae</i> (n=5)	1		1	1	2	1					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (n=18)	2				3	13	2				
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (n=2)	4					2					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (n=2)	2						1	1			

Distribucija MIK vrednosti ( $\mu\text{g/ml}$ ) za ampicilin									
Vrste	MIK ( $\mu\text{g/ml}$ )*	0.5	1	2	4	8	16	32	64
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=17)	4	5	12						
<i>Enterococcus durans</i> (n=5)	1	5							

\* Rezistentni izolati imaju vrednosti MIK veće od naznačenih graničnih vrednosti

Rezistencija na ampicilin, predstavljala je najmanje zastupljen profil rezistencije kod izolata BMK. Svega jedan (0,65%) izolat BMK, identifikovan kao *Lactobacillus plantarum*, se karakterisao rezistencijom na ampicilin.

Osim navedenih antibiotika, za vrste iz roda *Enterococcus*, od strane Referentne laboratorije Evropske Unije za rezistenciju na antimikrobne lekove, predloženo je ispitivanje osetljivosti i na sledeće antibiotike: vankomicin, teikoplanin, kvinpristin/dalfopristin, daptomicin, ciprofloksacin, tigeciklin i linezolid. Kod izolata

enterokoka (n = 22), obuhvaćenih ovim istraživanjem, nije dokazana rezistencije ni na jedan od navedenih antibiotika.

Distribucija rezistencije na sve ispitivane antibiotike kod izolata BMK prikazana je u Tabeli 5.4.9. U Tabeli 5.4.9. nisu prikazani rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike vankomicin, teikoplanin, kvinpristin/dalfopristin, daptomicin, ciprofloksacin, tigeciklin i linezolid, budući da se ova vrsta ispitivanja odnosi samo na izolate enterokoka, a pored toga, svi izolati enterokoka su pokazali osetljivost na navedene antibiotike.

Tabela 5.4.9 - Distribucija rezistencije na ispitivane antibiotike kod izolata BMK

	Bez fenotipske rezistencije n (%)	Rezistentan na jedan antibiotik n (%)	Multirezistentan n (%)	Gentamicin n (%)	Kanamycin n (%)	Streptomycin n (%)	Tetraciklin n (%)	Eritromicin n (%)	Klindamicin n (%)	Hloramfenikol n (%)	Ampicilin n (%)
<i>Lb. plantarum</i> (n=37)	30 (81,08)	5 (13,51)	0	1(2,70)	3 (8,11)	/*	0	2(5,41)	3 (8,11)	0	1(2,70)
<i>Lb. paracasei</i> (n=29)	1(3,45)	21 (72,41)	0	1(3,45)	25 (86,21)	8 (27,59)	1(3,45)	0	0	0	0
<i>Lb. kefir</i> (n=5)	3 (60,0)	1 (20,0)	0	0	0	0	2 (40,0)	0	0	1 (20,0)	0
<i>Lb. brevis</i> (n=13)	1(7,69)	8(61,53)	1(7,69)	0	4 (30,77)	0	1 (7,69)	0	10 (76,92)	3 (23,08)	0
<i>Lb. curvatus</i> (n=3)	3 (100,0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lb. parakefir</i> (n=2)	0	2 (100,0)	0	0	0	0	2 (100,0)	0	0	0	0
<i>Lb. paraplantarum</i> (n=1)	1(100,0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lb. coryniformis</i> (n=1)	1(100,0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lb. diolivorans</i> (n=1)	1(100,0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i> (n=17)	5 (29,41)	8 (47,06)	2 (11,76)	3 (17,65)	/*	/*	9 (52,94)	6 (35,29)	/*	2 (11,76)	0
<i>E. durans</i> (n=5)	0	5 (100,0)	0	5 (100,0)	/*	/*	0	0	/*	0	0
<i>Lc. lactis</i> (n=14)	13 (92,85)	0	1 (7,14)		0	1 (7,14)	1 (7,14)	0	1 (7,14)	0	0
<i>Lc. garvieae</i> (n=5)	0	3 (60,0)	0	1(20,0)	1 (20)	5 (100,0)	2 (40,0)	0	0	0	0
<i>Ln. mesenteroides</i> (n=18)	2(11,11)	9 (50,0)	1 (5,56)	1(5,56)	14 (77,78)	5 (27,78)	2 (11,11)	1 (5,56)	1(5,56)	6 (33,33)	0
<i>Ln. pseudomesenteroides</i> (n=2)	1 (50,0)	0	0		1 (50,0)	0	1 (50,0)	0	0	0	0
<i>P. pentosaceus</i> (n=2)	0	0	0	1(50,0)	2 (100,0)	2 (100,0)	0	0	0	0	0
<b>Ukupno</b>	<b>62 (40,0)</b>	<b>62 (40,0)</b>	<b>5 (3,23)</b>	<b>13 (8,39)</b>	<b>50 (37,59)</b>	<b>21 (21,88)</b>	<b>21 (13,55)</b>	<b>9 (5,81)</b>	<b>15 (11,28)</b>	<b>12 (7,74)</b>	<b>1 (0,65)</b>

\* - nije predviđeno ispitivanje osjetljivosti

Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike pokazuju da 62 (40,0%) izolata BMK ne pokazuje rezistenciju ni na jedan od ispitivanih antibiotika. Rezistencija na jedan od ispitivanih antibiotika utvrđena je kod 62 (40,0%) izolata BMK. Najzastupljenija rezistencija kod izolata BMK bila je rezistencija na predstavnike aminoglikozidnih antibiotika. Rezistencija na kanamicin je predstavljala karakteristiku 50 (37,59%) izolata BMK, dok je rezistencija na streptomycin utvrđena kod 21 (21,88%) izolata BMK. Prevalencija ostalih fenotipa rezistencije na antibiotike je bila sledeća: rezistencija na tetraciklin (13,55%), klindamicin (11,28%), gentamicin (8,39%), hloramfenikol (7,74%), eritromicin (5,81%), ampicilin (0,65%).

Kod četiri vrste BMK nije zabeleženo prisustvo nijednog fenotipa rezistencije: *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus diolivorans* i *Lactobacillus paraplantarum*. U okviru vrsta BMK, koje su predstavljene sa većim brojem izolata, najveći broj fenotipski osetljivih izolata je utvrđen kod *Lactobacillus plantarum*; 30 (81,08%) od 37 izolata je pokazalo osetljivost na sve ispitivane antibiotike. Kod vrste *Lactococcus lactis*, 11 (78,57%) od 14 izolata je bilo osetljivo na sve ispitivane antibiotike. S druge strane, visoka prevalencija fenotipske rezistencije je utvrđena kod vrste *Lactobacillus paracasei*, gde je samo kod jednog (3,45%) izolata zabeležena osetljivost na sve ispitivane antibiotike.

Multirezistencija ili multipla rezistencija označava neosetljivost ili smanjenu osetljivost bakterija na najmanje jedan antibiotik iz tri ili više klasa antibiotika. Multirezistencija je utvrđena kod pet (3,23%) izolata BMK. Profili multirezistencije kod izolata BMK prikazani su u Tabeli 5.4.10.

**Tabela 5.4.10.** – Profili multirezistencije kod izolata BMK

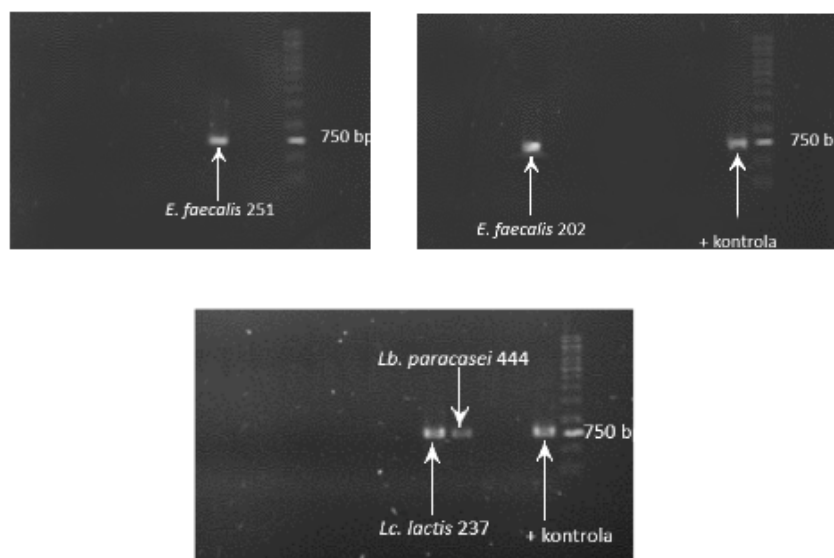
Profil multirezistencije	Vrsta	Br. izolata
Eritromicin + tetraciklin + hloramfenikol	<i>Enterococcus faecalis</i>	2
Kanamicin + klindamicin + hloramfenikol	<i>Lactobacillus brevis</i>	1
Hloramfenikol + streptomycin + tetraciklin	<i>Lactococcus lactis</i>	1
Eritromicin + gentamicin + hloramfenikol + kanamicin + klindamicin + streptomycin + tetraciklin	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1

Multirezistencija je predstavljala karakteristiku četiri vrste BMK: *Enterococcus faecalis* (2), *Lactobacillus brevis* (1), *Lactococcus lactis* (1) i *Leuconostoc mesenteroides* (1). Fenotipsku rezistenciju na sve ispitivane antibiotike, izuzev ampicilina, pokazao je jedan izolat *Leuconostoc mesenteroides*.

### 5.5. Ispitivanje prisustva gena za rezistenciju na tetraciklin kod izolata bakterija mlečne kiseline

Kod 155 izolata BMK poreklom iz tradicionalnih sireva Srbije, primenom PCR reakcije, ispitano je prisustvo 8 gena za rezistenciju na tetraciklin: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* i *tet(W)*. Geni *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(K)*, *tet(O)* i *tet(W)* nisu utvrđeni kod izolata BMK.

Prisustvo *tet(M)* gena utvrđeno je kod četiri (2,58%) izolata BMK: dva izolata *Enterococcus faecalis* (oznaka izolata 251 i 202), jedan izolat *Lactococcus lactis* (oznaka izolata 237) i jedan izolat *Lactobacillus paracasei* (oznaka izolata 444) (Slika 5.5.1.).



**Slika 5.5.1** – Agarozna gel elektroforeza za produkte PCR amplifikacije izolata BMK korišćenjem prajmera specifičnog za 750-bp fragment *tet(M)* gena

Kod izolata *Enterococcus faecalis* 251, koji je bio nosilac *tet(M)* gena, utvrđeno je prisustvo gena *tet(L)*, pa je ovo bio i jedini izolat BMK, koji je imao dva gena za rezistenciju na tetraciklin.

Izolati *Enterococcus faecalis* i *Lactococcus lactis*, nosioci gena za rezistenciju na tetraciklin, pokazali su i fenotipsku rezistenciju na tetraciklin. Vrednost MIK za izolat *Enterococcus faecalis*, nosioca gena *tet(M)* i *tet(L)*, iznosila je 64 µg/ml, dok je kod izolata *Enterococcus faecalis*, nosioca gena *tet(M)*, MIK vrednost iznosila 128 µg/ml. Kod izolata *Lactococcus lactis* 237, nosioca *tet(M)* gena, MIK vrednost je iznosila 64 µg/ml. Za razliku od njih, izolat *Lactobacillus paracasei* 444, kod koga je utvrđeno prisustvo *tet(M)* gena, fenotipski je bio osetljiv na tetraciklin (MIK 0,5 µg/ml).

Kod ostalih izolata BMK, koji su se karakterisali fenotipskom rezistencijom na tetraciklin (n=18), nije utvrđeno prisustvo *tet* gena. Rezistencija na tetraciklin kod ovih izolata BMK posledica je, ili do sada neprepoznatog mehanizma rezistencije, ili prisustva gena koji ovim ispitivanjem nisu bili obuhvaćeni.

#### **5.6. Ispitivanje mogućnosti prenosa gena za rezistenciju na tetraciklin na odabrane recipijente u uslovima *in vitro***

U okviru istraživanja ove doktorske disertacije, ispitana je mogućnost prenosa gena za rezistenciju na tetraciklin *tet(M)* sa izolata *Enterococcus faecalis* 202 i *Lactococcus lactis* 237, poreklom iz tradicionalnih sireva od sirovog mleka, na dva potencijalna recipijenta: *Staphylococcus aureus* (rezistentan na rifampicin; deo kolekcije bakterija Katedre za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla Fakulteta veterinarske medicine) i *Enterococcus faecalis* JH2-2 (LMG 19456), rezistentan na rifampicin i fuzidinsku kiselinu. Prenos *tet(M)* gena je utvrđen unutar vrste, odnosno sa *tet(M)* pozitivnog izolata *Enterococcus faecalis* 202 na *Enterococcus faecalis* JH2-2. U drugim kombinacijama donor/recipijent (*Enterococcus faecalis* 202/ *Staphylococcus aureus*; *Lactococcus lactis* 237/ *Enterococcus faecalis* JH2-2; *Lactococcus lactis* 237/ *Staphylococcus aureus*) prenos *tet(M)* gena nije dokazan.



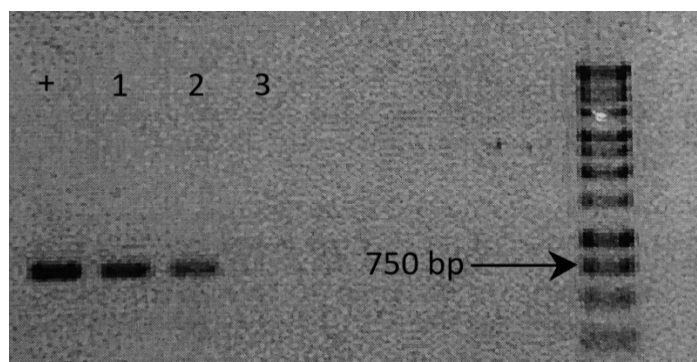
Broj donora, recipijenata i transkonjuganata, kao i frekvencija prenosa, u eksperimentu „*filter mating*“-a između izolata *Enterococcus faecalis* 202 i *Enterococcus faecalis* JH2-2 prikazana je u Tabeli 5.6.1.

**Tabela 5.6.1.** Rezultati mogućnosti prenosa gena između sojeva *Enterococcus faecalis* u uslovima *in vitro*

	Donor (log CFU/ml)	Recipijent (log CFU/ml)	Transkonjugant (log CFU/ml)	Stopa transfera	Vrednost MIK kod transkonjuganata
<i>E. faecalis</i> 202 x <i>E. faecalis</i> JH2-2 10:1	7,6 ± 0,28 x 10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	6,2 ± 0,11 x 10 <sup>2</sup>	6	>128 µg/ml
<i>E. faecalis</i> 202 x <i>E. faecalis</i> JH2-2 1:1	7,1 ± 0,34 x 10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>2</sup>	8	>128 µg/ml

Frekvencija transfera gena bila je niska: u slučaju mešanja donora i recipijenta u odnosu 10:1 iznosila je  $1,35 \pm 0,57 \times 10^{-6}$  transkonjuganata po recipijentu, a u slučaju kada su donor i recipijent mešani u odnosu 1:1, iznosila je  $7,82 \pm 0,72 \times 10^{-8}$  transkonjuganata po recipijentu.

Kod dobijenih transkonjuganata potvrđen je fenotip rezistencije na tetraciklin (MIK > 128 µg/ml), kao i prisustvo *tet*(M) gena lančanom reakcijom polimeraze (Slika 5.6.1). Zasejavanjem donora i recipijenata na dvostruko selektivnu podlogu nije utvrđen rast kolonija, što ukazuje da spontane mutacije nisu nastupile kod donora i recipijenta.



**Slika 5.6.1** - Prisustvo *tet(M)* gena kod transkonjuganta. + - pozitivna kontrola (*Enterococcus faecium* IM 338), 1 - dobijeni transkonjugant, 2 - donor (*Enterococcus faecalis* 202), 3 - recipijent (*Enterococcus faecalis* JH2-2)

## 6. DISKUSIJA

Sirevi proizvedeni od sirovog mleka postaju sve popularniji kod potrošača zbog svojih jedinstvenih senzornih osobina. Pored toga, sa tehnološkog aspekta, ovi sirevi se mogu posmatrati kao dragoceni izvor potencijalnih starter i protektivnih kultura BMK.

U Srbiji postoji duga tradicija proizvodnje i potrošnje belih sireva u salamuri, koji ujedno čine i najzastupljeniju vrstu sireva (~ 60%) (Donelly, 2016). Najznačajniji predstavnici ove vrste sireva su homoljski, sjenički i zlatarski sir. Uobičajeno je da se proizvode od kravljeg, ovčijeg ili kozjeg mleka, mada se danas uglavnom proizvode od kravljeg mleka, dok kozji i ovčiji beli sirevi u salamuri čine svega nešto više od 1% ukupno proizvedenih sireva ove vrste. Tradicionalna proizvodnja ovih sireva podrazumeva uglavnom sirovo mleko i odsustvo starter kultura. Bakterije mlečne kiseline čine značajan deo mikrobiote tradicionalnih sireva proizvedenih od sirovog mleka. Različiti rodovi i vrste BMK karakterišu kompleksnu mikrobiotu tradicionalnih sireva. Usled specifičnosti mikrobiote BMK, tradicionalni sirevi se smatraju zasebnim ekosistemima. Specifičnost mikrobiote tradicionalnih sireva je uslovljena faktorima sredine (nadmorska visina, pedioklimatski uslovi, sezonske varijacije, način hranjenja životinja, sastav biljne paše), ali i parametrima procesa proizvodnje (temperatura, pH, aw, dužina zrenja). Taksonomski biodiverzitet zajednice BMK u fermentisanim proizvodima od mleka, pre svega sirevima proizvedenim od sirovog mleka, veoma otežava mogućnost da se tako složena populacija bakterija proceni sa aspekta mogućnosti prenosa gena za rezistenciju na antibiotike. Ipak, brojni podaci iz literature, veoma dobro dokumentuju ulogu BMK kao "tihih" rezervoara rezistencije.

Tetraciklini spadaju u grupu najčešće korišćenih antibiotika u veterinarskoj medicini u Srbiji. Tokom 2014. godine potrošnja tetraciklina iznosila je preko 15 tona (Agencija za lekove i medicinska sredstva, 2014), sa tendencijom porasta tokom 2015. I 2016. godine, kada je iznosila preko 16 tona godišnje u Republici Srbiji (Agencija za

lekove i medicinska sredstva, 2015; 2016). Postavlja se pitanje da li su bakterije poreklom od životinja i životne sredine, uz postojeći jak selektivni pritisak, razvile rezistenciju na ovaj antibiotik i da li, ulaskom u lanac hrane, nose rizik od prenosa rezistencije na antibiotike na mikrobiotu gastrointestinalnog trakta ljudi.

Kako bi se odredila zastupljenost BMK u tradicionalnim sirevima Srbije, uzorci tradicionalnih sireva su zasejani na MRS-S agar. U cilju određivanja zastupljenosti subpopulacije BMK rezistentne na tetraciklin, uzorci sireva su, osim na MRS-S podlogu, zasejavani i na MRS-S podlogu sa dodatkom tetraciklina.

Populacija BMK u sva tri tipa sira je bila ujednačena po brojnosti i zastupljena u visokom broju: u homoljskom siru  $7,65 \pm 1,09$  log CFU/g, u zlatarskom  $7,74 \pm 0,6$  log CFU/g, a u sjeničkom  $7,47 \pm 0,71$  log CFU/g. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima prethodno objavljenih istraživanja koja su ispitivala mikrobiotu BMK u tradicionalnim sirevima Srbije, gde je utvrđeno da se broj BMK kretao u rasponu 6-9 log CFU/g (Veljovic i sar., 2007; Terzic-Vidojevic, 2009a, 2009b; Golić i sar., 2013).

Pri dodavanju tetraciklina u podlogu u niskim koncentracijama (1, 2, 4 i 8  $\mu\text{g/ml}$ ), kod najvećeg broja uzoraka sireva nije bio primetan veći pad broja BMK, što se moglo i očekivati, s obzirom da su ove koncentracije ispod graničnih MIK vrednosti za tetraciklin za najveći broj vrsta BMK, pa navedene koncentracije tetraciklina mogu da deluju selektivno samo u slučaju veoma osetljivih bakterija mlečne kiseline. Koncentracija tetraciklina u MRS-S podlozi od 16  $\mu\text{g/ml}$  je, kod najvećeg broja sireva, dovela do smanjenja broja BMK za 1,5-3 log CFU/ml. Koncentracija tetraciklina od 16  $\mu\text{g/ml}$  u MRS-S podlozi dovela do potpune inhibicije rasta bakterija mlečne kiseline u četiri uzorka sireva (jednom uzorku zlatarskog i tri uzorka sjeničkog sira). U ostalim uzorcima homoljskog sira utvrđen je prosečan broj BMK od  $6,01 \pm 1,04$  log CFU/g, u uzorcima zlatarskog  $5,14 \pm 1,44$  log CFU/g i u uzorcima sjeničkog  $4,15 \pm 2,31$  log CFU/g.

Koncentracija tetraciklina od 64  $\mu\text{g/ml}$  je, kod određenog broja uzoraka sireva, dovela do potpune inhibicije rasta BMK. Pri ovoj koncentraciji tetraciklina u MRS-S podlozi, u dva uzorka homoljskog, pet uzoraka zlatarskog i četiri uzorka sjeničkog sira,

rast BMK je bio potpuno inhibiran. U uzorcima sireva gde je, i pri koncentraciji od 64 µg/ml tetraciklina u podlozi, zabeležen rast kolonija, prosečan broj BMK je iznosio  $3,98 \pm 2,28$  log CFU/g u uzorcima homoljskog sira;  $3,35 \pm 2,02$  log CFU/g u uzorcima zlatarskog sira i  $3,93 \pm 2,24$  log CFU/g u uzorcima sjeničkog sira. Kako su studije, koje su se bavile „*screening*”-om prisustva subpopulacije BMK rezistentne na tetraciklin u uzorcima sireva malobrojne (Devirgiliis i sar., 2008; Flórez i sar., 2014), ali i zbog činjenice da sirevi od sirovog mleka proizvedeni na tradicionalan način predstavljaju zasebne entitete definisane specifičnošću mikrobiote sirovog mleka, geografije, mikroklimatskih faktora, procesa proizvodnje i dužine zrenja, poređenje rezultata nije bilo moguće.

Pregledom mikroskopskih preparata slučajno odabranih kolonija sa površine MRS-S agara i MRS-S agara sa dodatkom tetraciklina, utvrđeno je da su veliki broj kolonija (169/395) činili kvasci (rezultati nisu prikazani), pre svega kod uzoraka homoljskog sira. Prisustvo kvasaca u uzorcima sireva nije neočekivano, imajući u vidu tradicionalan način proizvodnje sireva i mnogostruke izvore kontaminacije kvascima (vazduh, salamura, radne površine, posuđe i pribor korišćeni za prihvatanje i koagulaciju mleka). O brojnosti populacije kvasaca u sirevima govori i studija Banjara i sar. (2015), koji su, zasejavanjem 44 uzoraka sireva na površinu YGC (Yeast extract-Glucose-Chloramphenicol) agara, dobili 12 000 kolonija kvasaca i plesni. Kvasci čine sekundarnu mikrobiotu sireva, a među njima kao dominantne vrste se izdvajaju *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii* i *Sacharomyces cerevisiae* (Frölich-Wyder, 2003; Chebeňová-Turcovská i sar., 2011). Prisustvo kvasaca u velikom broju kod sireva, jednim delom oslikava nehigijenske uslove procesnog okruženja, a sa druge strane, sposobnost kvasaca da rastu pri visokim koncentracijama soli, nižim pH vrednostima (Gori i sar., 2012), ali i pri niskim temperaturama i uslovima niske aw vrednosti (Breuer i Harms, 2006), uz mogućnost da koriste laktat kao jedini izvor ugljenika. Kvasci prisutni u tradicionalnim sirevima Srbije pokazali su mogućnost korišćenja laktata, što ukazuje na njihovo učešće u procesu zrenja kao sekundarne mikroflore (Golić i sar., 2013). Problem kontaminacije sireva kvascima uočavaju i drugi

autori. U istraživanju Devirgiliis i sar. (2008), dodavanjem tetraciklina u MRS podlogu u kombinaciji sa pumaricinom, specifičnim inhibitorom kvasaca, broj BMK na podlozi sa antibiotikom i pumaricinom opadao je istom dinamikom kao kada u podlogu nije dodavan pumaricin, odnosno, dodavanje tetraciklina u podlogu se odražava isključivo na smanjenje broja BMK. Kako se selektivnost podloga za izolaciju kvasaca iz proizvoda od mleka obično postiže dodatkom antibiotika (hloramfenikol, oksitetraciklin i hlortetraciklin)(Welthagen i Viljoen, 1997), postoji pretpostavka da je dodatak tetraciklina u MRS-S agar u cilju izolacije rezistentne subpopulacije BMK, dodatno favorizovao rast kvasaca.

U nastojanju da se održi diverzitet izolata BMK, bitno je prilikom "screening" procedure izolata da postoji mogućnost identifikacije potencijalnih duplikata. Izolati BMK, koji su na osnovu fenotipskih metoda (bojenje po Gramm-u i katalaza test), potvrđeni kao gram-pozitivni, katalaza negativni (n=223), izloženi su genotipizaciji primenom rep-PCR sa (GTG)<sub>5</sub> oligonukleotidnim prajmerom. (GTG)<sub>5</sub>-PCR metod pokazuje moć diskriminacije na nivou ispod vrste, te izolati koji pokazuju isti obrazac, u smislu odsustva ili prisustva traka na agaroznom gelu, predstavljaju isti "fingerprint" tip. Na ovaj način, rep-PCR metod, kao jednostavna tehnika, sa velikom diskriminatornom sposobnošću i visokom pouzdanošću u diferencijaciji i klasifikaciji velikog broja izolata, daje sliku homogenosti ili heterogenosti mikrobne zajednice. Gevers (2001) navodi da u genotipizaciji BMK izolovanih iz fermentisanih kobasica, rep-PCR ima veliku moć rezolucije, visoku reproducibilnost i veoma je pogodan za "screening" velikog broja izolata BMK. Rep-PCR metod, u kombinaciji sa sekvencioniranjem 16S rDNK regiona, uspešno je primenjen u svrhu identifikacije bakterija mlečne kiseline poreklom iz tradicionalnih sireva Srbije (Terzić-Vidojević i sar., 2009a, 2009b; Terzić-Vidojević i sar., 2014).

U okviru ove doktorske disertacije, rep-PCR metod je poslužio za oslikavanje različitosti izolata i posledično odabir reprezentativnih izolata BMK za dalja ispitivanja. Od ukupno 223 izolata BMK, 162 (72,65%) izolata je pokazalo različite rep-PCR "fingerprint" tipove, što ukazuje na visoku heterogenost, odnosno genetički diverzitet

izolata BMK u tradicionalnim sirevima Srbije. Upravo ovi izolati sa jedinstvenim "fingerprint" tipovima (n=162) su predstavljali reprezentativne izolate, odabrane za dalja ispitivanja. Od ukupno 115 izolata laktobacila, preliminarno identifikovanih kao *Lactobacillus paracasei* i *Lactobacillus casei*, poreklom iz hrane (proizvodi od mleka, fermentisano voće i povrće, alkoholna i bezalkoholna pića), primenom rep-PCR, Huys i sar. (2008) utvrđuju 65 genotipski jedinstvenih izolata laktobacila. Na veliki genetički diverzitet BMK poreklom iz sireva iz sirovog mleka ukazuju i studije autora (Mas i sar., 2002.; Ayad i sar., 2004; Ouadghiri i sar., 2005; Abriouel i sar., 2008), koji se u proceni heterogenosti izolata BMK oslanjaju na metode genotipizacije.

Tradicionalne metode, koje se rutinski koriste za određivanje broja i identifikaciju kompleksnih mikrobnih zajednica u sirevima, zasnovane su na tehnikama izolacije na selektivnim podlogama i u identifikaciji se oslanjaju isključivo na biohemijske osobine bakterija. S obzirom na izrazitu metaboličku varijabilnosti BMK, ove metode obično ne daju pouzdane rezultate pri identifikaciji BMK (Quigley i sar., 2011). U novije vreme, tehnike izolacije bakterija u čistoj kulturi na površini selektivnih podloga, uz metode fenotipizacije u identifikaciji, se dopunjuju molekularnim metodama (Beresford i sar., 2001). Ali, i u ovom slučaju, identifikovane će biti samo bakterije koju pokazuju sposobnost rasta na podlogama za kultivaciju, kao i predstavnici dominantnih populacija u određenom ekosistemu, odnosno vrste koje se pokažu dobrim kompetitorima. Dobro je poznata činjenica da tradicionalni sirevi proizvedeni od sirovog mleka predstavljaju veoma složene ekosisteme, uz interakciju mnogobrojnih, različitih populacija bakterija, a da je veći deo manje zastupljenih populacija bakterija u siru, teško ili gotovo nemoguće izolovati na podlogama (Giraffa i Neviani, 2001).

Iz ovog razloga, u identifikaciji kompleksne mikrobiote sireva od sirovog mleka koriste se kulturelno-nezavisne molekularne tehnike. Ove tehnike se zasnivaju na direktnoj analizi sveukupne mikrobne zajednice (izolacija celokupne bakterijske DNK iz matriksa sira) i potom proceni ekspresije gena i metaboličke aktivnosti (Giraffa i Neviani 2001; Randazzo i sar., 2009). Konačno, kulturelno-nezavisne tehnike mogu biti

dopunjene studijama proteomike i metabolike u cilju potpune spoznaje dinamike evolucije mikrobiote sireva (Ndoye i sar., 2011).

MALDI TOF masena spektrometrija predstavlja metod izbora u identifikaciji rodova i vrsta bakterija, u pojedinim slučajevima i podvrsta (Dušková i sar., 2013). Metoda se zasniva na generisanju "fingerprint"-ova najviše zastupljenih proteina u ćeliji bakterije, i njihovim poređenjem sa postojećom bazom podataka (Pavlovic i sar., 2013). Iako se primenom MALDI TOF masene spektrometrije identifikuju samo oni izolati bakterija, koji su prethodno predstavljeni rastom u čistoj kulturi na površini podloga, ipak, u poređenju sa molekularnim metodama, ima brojne prednosti; metoda je brza, tačna i jednostavna za izvođenje, zahteva se mala količina uzorka, i cena reagensa je niska (Singhal i sar., 2015). Iako u literaturi ima malo podataka o primeni MALDI TOF masene spektrometrije u identifikaciji bakterija izolovanih iz sireva, ipak rezultati ovih studija deluju ohrabrujuće (Angelakis i sar., 2011; Böhme i sar., 2012; Nicolaou i sar., 2012).

U identifikaciji izolata bakterija mlečne kiseline poreklom iz tradicionalnih sireva Srbije korišćen je metod MALDI TOF masene spektrometrije. Od ukupno 162 izolata BMK obuhvaćenih ovim istraživanjem, primenom MALDI TOF masene spektrometrije do nivoa vrste (koeficijent pouzdanosti veći od 2), uspešno je identifikovano 153 (94,44%) izolata. Nacef i sar. (2017) su u studiji identifikacije izolata BMK, poreklom iz sireva Francuske, primenom MALDI TOF MS uspešno identifikovali 97,46% izolata.

Od ostalih izolata BMK, ispitivanih u okviru ove doktorske disertacije, 7 (4,32%) izolata nije identifikovano, a 2 (1,24%) izolata su identifikovana kao *Lactobacillus parakefiri*, uz koeficijent pouzdanosti oko 1,7, što prema uputstvu proizvođača označava uspešnu identifikaciju na nivou roda. Iako koeficijent pouzdanosti nije bio zadovoljavajući za identifikaciju na nivou vrste, a kako je u bazi podataka jedino preklapanje izolata bilo sa vrstom *Lactobacillus parakefiri*, ipak su ova dva izolata, u daljem istraživanju, tretirana kao pripadnici ove vrste. Pretpostavka je da usled toga što se radi o tzv. "divljim" izolatima BMK, poreklom od tradicionalnih sireva proizvedenih od sirovog mleka, koji, kao takvi, nose specifični metabolizam, a time i specifični



“*fingerprint*” proteina, nije bilo ni mogućnosti da dođe do većeg preklapanja u bazi podataka, iako izolati nisu ništa manje *Lactobacillus brevis*, nego drugi “uredniji” izolati, koje baza podataka prepoznaje. Pretpostavka o specifičnosti izolata BMK, i nemogućnosti prepoznavanja takve specifičnosti u bazi podataka, izvedena je na osnovu rezultata o izvanrednom genetičkom diverzitetu izolata BMK primenom (GTG)<sub>5</sub>-PCR metode. Ovo je ujedno i glavni nedostatak MALDI TOF MS identifikacije, odnosno moguće je uspešno identifikovati samo one izolate bakterija, čiji profili proteina već postoje u bazi podataka, te se kao imperativ uspešnosti ove metode nameće potreba stalnog proširivanja baze podataka.

U uzorcima tradicionalnih sireva Srbije, primenom MALDI TOF masene spektrometrije u identifikaciji izolata BMK, utvrđena je sledeća prevalencija vrsta BMK: *Lactobacillus plantarum* (23,87%), *Lactobacillus paracasei* (18,71%), *Leuconostoc mesenteroides* (11,61%), *Enterococcus faecalis* (10,98%), *Lactococcus lactis* (9,03%), *Lactobacillus brevis* (8,39%), *Lactobacillus kefir* i *Lactococcus garvieae* (3,22%), *Lactobacillus curvatus* (1,93%), a sporadičan nalaz su činili izolati *Lactobacillus parakefir*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus coryniformis* i *Lactobacillus diolivorans*. U prethodno sprovedenim istraživanjima, gde su izolati BMK poreklom iz tradicionalnih sireva Srbije, identifikovani primenom rep-PCR metode i sekvenciranja 16s rDNK, najčešće identifikovane izolate BMK predstavljali su *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* i *Enterococcus faecalis*, prisutni u ispitivanim sirevima u različitom broju i odnosu, u zavisnosti od tipa sira i dužine zrenja (Terzic-Vidojevic i sar., 2007; Veljovic i sar, 2007; Begovic i sar., 2011; Golić i sar., 2013).

Najveći broj izolata BMK, u okviru ove doktorske disertacije, identifikovani su kao pripadnici roda *Lactobacillus*, sa predstavnicima 9 vrsta: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus diolivorans* i *Lactobacillus coryniformis*. Laktobacili čine najvažniju grupu nestarterskih BMK, a

njihova glavna uloga ogleda se u stvaranju specifične arome sira tokom zrenja, zahvaljujući, pre svega, njihovoj proteolitičkoj aktivnosti (López i Mayo, 1997). Brojnost laktobacila u sirevima posledica je njihove sposobnosti da opstanu u uslovima niske pH vrednosti u poređenju sa pripadnicima ostalih rodova BMK (Caridi i sar., 2003). Među vrstama roda *Lactobacillus*, najviše su bili zastupljeni *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus paracasei*. Dominantno prisustvo ove dve vrste u zlatarskom i sjeničkom siru može se objasniti činjenicom da su ovo jedine dve vrste BMK koje imaju mogućnost da se umnožavaju tokom celog perioda zrenja, pre svega zbog njihove mogućnosti da koriste citrat kao izvor ugljenika (Palles i sar., 1998). U prethodnim istraživanjima koja su se bavila mikrobiotom zlatarskog sira, dobijeni su slični rezultati: u istraživanju Terzić-Vidojević i sar. (2009) i Veljović i sar. (2007) najveći broj izolata BMK pripadao je vrsti *Lactobacillus paracasei*, a zatim *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus plantarum*. Najveći diverzitet vrsta u okviru različitih rodova BMK ustanovljen je i u slučaju laktobacila izolovanih iz tradicionalnog sira sa Golije, iako su predstavnici rodova *Leuconostoc* i *Enterococcus* bili prisutni u većem broju u odnosu na laktobacile (Terzić-Vidojević i sar., 2014). U skladu sa rezultatima dobijenim u okviru ove doktorske disertacije, u ispitivanju mikrobiote BMK iz pirotskog sira (Terzić-Vidojević i sar., 2009a), najveći broj izolata BMK pripadao je rodu *Lactobacillus*. Interesantno je da su vrste *Lactobacillus diolivorans* i *Lactobacillus coryniformis*, prema našem saznanju, prvi put izolovane iz tradicionalnih sireva Srbije u okviru ove doktorske disertacije.

Manje zastupljenu mikrobiotu BMK u sva tri tipa tradicionalnih sireva činili su rodovi *Leuconostoc* i *Enterococcus*. U okviru roda *Leuconostoc* identifikovane su *Leuconostoc mesenteroides* i *Leuconostoc pseudomesenteroides*, dok su u okviru roda *Enterococcus* identifikovani *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus durans*. *Leuconostoc* spp. čini veoma važan rod heterofermentativnih BMK koje značajno doprinose senzornom kvalitetu sira. Iako je njihova proteolitička aktivnost slaba, bakterije iz ovog roda imaju značajnu ulogu u formiranju senzornih osobina sira; njihova sposobnost produkcije ugljen-dioksida potpomaže stvaranje okaca u siru, dok sposobnost

razgradnje citrata dovodi do produkcije diacetila, acetoina i acetaldehida koji čine neke od najvažnijih komponenti ukusa sireva (Hemme i Foucaud-Scheunemann, 2004).

Enterokoke se često u veoma značajnom broju utvrđuju kod tradicionalno proizvedenih evropskih sireva, pre svega sa mediteranskog područja, dobijenih od sirovog ovčijeg, kozjeg, mleka bivolice ili kravljeg mleka (Giraffa, 2002). U okviru ove doktorske disertacije izolati *Enterococcus* spp. su identifikovani kao *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus durans*. U prošlim vremenima, u najvećem broju slučajeva, iz sireva su izolovani *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*. Ipak, u poslednje vreme, sve više se izoluje i vrsta *Enterococcus durans*, koja takođe čini značajan deo mikrobiote sireva (Suzzi i sar., 2000; Andrighetto i sar., 2001; Cosentino i sar., 2004). Najverovatniji razlog za to što je u istraživanjima ova vrsta bila prenebregnuta, verovatno leži u tome što su, zbog manje osetljivih metoda identifikacije, pripadnici ove vrste u sirevima često bili pogrešno identifikovani (Ogier i Serror, 2008). Za razliku od prethodnih istraživanja mikrobiote tradicionalnih sireva (Veljovic i sar., 2007; Begovic i sar., 2011; Golić i sar., 2013; Terzić-Vidojević i sar., 2014), izolati *Enterococcus faecium* nisu identifikovani u okviru ovog istraživanja.

Dva izolata BMK, poreklom iz zlatarskog sira, pripadala su vrsti *Pediococcus pentosaceus*. Ni u jednom od prethodnih istraživanja koja su ispitivala sastav mikrobiote BMK tradicionalnih sireva Srbije, pediokoke nisu izolovane (Terzić-Vidojević i sar., 2007; Veljovic i sar., 2007; Nikolic i sar., 2008; Begovic i sar., 2011; Golić i sar., 2013; Terzić-Vidojević i sar., 2014), što verovatno ukazuje na činjenicu da u tradicionalnim sirevima Srbije, *Pediococcus* spp. ne čine značajnu populaciju BMK.

Rezultati studija mnogih autora (Terzić-Vidojević i sar., 2007; Veljovic i sar., 2007; Terzić-Vidojević i sar., 2009a, 2009b; Begovic i sar., 2011; Golić i sar., 2013) utvrđuju da se u u tradicionalnim sirevima Srbije, kao najzastupljeniji rodovi BMK identifikuju *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* i *Leuconostoc*, iako procentualna zastupljenost rodova, kao i diverzitet vrsta u okviru njih značajno varira, kako u zavisnosti od tipa sira, tako i od seoskih domaćinstva u kojima je sir proizveden. Slični rezultati se mogu

zapaziti i u slučaju sireva od sirovog mleka ispitanih u okviru ove doktorske disertacije. U uzorcima homoljskog, sjeničkog i zlatarskog sira, identifikovano je 16 vrsta BMK, u okviru pet rodova: najčešće prisutan rod bio je *Lactobacillus*, a zatim *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Pediococcus*. Razlike u zastupljenosti vrsta BMK su bile uočljive između tipova sireva: dok su u zlatarskom i sjeničkom siru najzastupljeniji bili laktobacili, u slučaju homoljskog sira, iz čak 9 uzoraka laktobacili uopšte nisu bili izolovani, a dominantnu populaciju BMK činile su laktokoke. Prema istraživanju Begovic i sar. (2011) broj laktotoka izolovanih iz sira, opadao je sa nadmorskom visinom, što je bilo uočljivo i kod sireva obuhvaćenih ovim istraživanjem. Homoljski sir se pravi na teritoriji opštine Žagubica koja se nalazi na približno 300 m nadmorske visine i laktokoke su u uzorcima homoljskog sira predstavljale populaciju BMK. Sa druge strane, sjenički i zlatarski sir se se proizvode na području opština Nova Varoš i Sjenica, koje se nalaze na nadmorskoj visini 1000-1100m i laktokoke su, iz uzoraka ovih sireva, izolovane sporadično.

Rezistencija na antibiotike predstavlja ozbiljnu pretnju po ljudsko zdravlje. U cilju proaktivnog pristupa problemu, EFSA je u okviru QPS sistema postavila kriterijum da bakterije koje se, sa namerom dodaju u različitim fazama lanca hrane, nisu nosioci prenosivih gena za rezistenciju na antibiotike (European Food Safety Authority, 2012). Prvi korak u ispitivanju prenosivih mehanizama za rezistenciju na antibiotike jeste utvrđivanje fenotipske osetljivosti, odnosno osetljivosti na grupu antibiotika, predloženih od strane EFSA. U slučaju enterokoka, broj antibiotika koji se ispituju je veći u odnosu na ostale BMK, zbog toga što su u pitanju oportunističke patogene bakterije.

U okviru ove doktorske disertacije, kod identifikovanih izolata BMK (sa izuzetkom enterokoka) ispitivana je osetljivost na 8 antibiotika: gentamicin, kanamicin, streptomycin, tetraciklin eritromicin, klindamicin, hloramfenikol i ampicilin. Kod izolata enterokoka, pored ispitivanja osetljivosti na tetraciklin, eritromicin, gentamicin, ampicilin i hloramfenikol, ispitivana je osetljivost i na vankomicin, teikoplanin, kvinpristin/dalfopristin, daptomicin, ciprofloksacin, tigeciklin i linezolid.

Najzastupljeniji profil rezistencije kod BMK izolovanih u okviru ovog doktorata je rezistencija na predstavnike aminoglikozidnih antibiotika. Rezistencija na kanamicin je predstavljala karakteristiku 37,59% izolata BMK, dok je rezistencija na streptomycin utvrđena kod 21,88% izolata BMK. Kod izolata *Lactobacillus paracasei* i *Leuconostoc mesenteroides*, rezistencija na kanamicin predstavljala je najčešći profil rezistencije. Prevalencija ostalih fenotipa rezistencije na antibiotike, po redosledu zastupljenosti, je bila sledeća: rezistencija na tetraciklin (13,55%), klindamicin (11,28%), gentamicin (8,39%), hloramfenikol (7,74%), eritromicin (5,81%). Svega jedan (0,65%) izolat BMK je pokazao rezistenciju na ampicilin.

Kod 16 izolata primećeno je istovremeno prisustvo rezistencije na dva, ili na tri ispitivana aminoglikozidna antibiotika. Prema rečima Danielsen i Wind (2003), ukoliko veliki broj izolata u okviru jedne vrste bakterija pokazuje rezistenciju na određeni antibiotik, taj oblik rezistencije se interpretira kao urođena (prirodna) rezistencija. Urođena rezistencija nije prenosivog karaktera i kao takva ne predstavlja rizik za širenje rezistencije na antibiotike. Rezistencija na aminoglikozide, kao što su streptomycin i gentamicin, se smatra generalnom karakteristikom laktobacila (Charteris i sar., 1998.; Danielsen i Wind, 2003) i time se rezistencija laktobacila na aminoglikozidne antibiotike prihvata kao urođeni oblik rezistencije. Mehanizam urođene rezistencije se objašnjava nepostojanjem citohromima posredovanog transportnog sistema (Bryan i Kwan, 1981), koji je potreban za ulazak aminoglikozida u bakterijsku ćeliju, odnosno kao posledica smanjene permeabilnosti membrane, tako da antibiotici ne mogu da prodru u bakterijsku ćeliju (Elkins i Mullis, 2004). Za razliku od streptomicina i kanamicina, gentamicin ima veću sposobnost prolaska kroz ćelijsku membranu, zbog čega su vrednosti MIK za ovaj antibiotik kod BMK često niže u odnosu na ostale aminoglikozidne antibiotike (Danielsen i Wind, 2003; Egervärn i sar., 2007). Posmatrajući distribucije MIK vrednosti izolata laktobacila u odnosu na sva tri aminoglikozidna antibiotika, koja su ispitivana u okviru ovog doktorata, može se zaključiti da su rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije u skladu sa gore navedenim tvrdnjama. Razlog za smanjenu osetljivost ispitivanih izolata laktobacila iz

tradicionalnih sireva Srbije, takođe se može objasniti i uticajem pH vrednosti medijuma na aktivnost aminoglikozidnih antibiotika. Optimalna pH vrednost za delovanje aminoglikozidnih antibiotika je 7,8, a kako je pH vrednost LSM medijuma podešena na 6,7, antibakterijska aktivnost ovih antibiotika može da bude značajno smanjena (Klare i sar., 2007). U prilog ovoj tvrdnji ide i činjenica da je u istraživanjima u kojima su primećene veoma visoke vrednosti MIK za aminoglikozidne antibiotike kod pripadnika BMK, molekularnim metodama nije detektovano prisustvo gena za rezistenciju (Klare i sar., 2007; Ouoba i sar., 2008). Takođe, visok stepen spontanijih mutacija koje vode do rezistencije na streptomycin i kanamicin je zabeležen kod laktobacila, što može biti još jedno od objašnjenja ovako visokog stepena rezistencije na aminoglikozidne antibiotike (Curragh i Collins, 1992).

Budući da su izolati laktobacila, u okviru ove doktorske disertacije, pokazali unimodalnu distribuciju rezistencije na aminoglikozidne antibiotike, i ovi rezultati, govore u prilog prirodnog oblika rezistencije.

U okviru ove doktorske disertacije, 14 (77,78%) od ukupno 18 izolata *Leuconostoc mesenteroides* pokazalo je rezistenciju na kanamicin, što odgovara rezultatima istraživanja Flórez i sar. (2016), gde je većina izolata *Leuconostoc mesenteroides*, poreklom iz tradicionalnih italijanskih i španskih sireva, pokazala rezistenciju na kanamicin.

Oba izolata *Pediococcus pentosaceus* obuhvaćena ovim istraživanjem, pokazala su rezistenciju na dva, odnosno na sva tri predstavnika aminoglikozidnih antibiotika sa veoma visokim MIK vrednostima, što je u skladu sa rezultatima studije Danielsen i sar. (2007). Prema Tenorio i sar. (2001), visok nivo rezistencije na aminoglikozidne antibiotike kod pediokoka, u vezi je sa prisustvom gena *aac(6')Ie-aph(2'')*. Ipak, kako je broj izolata *Pediococcus pentosaceus* u okviru ovog istraživanja bio mali (n=2), a genetska baza rezistencije na antibiotike nije bila ispitana, na osnovu podataka dobijenih u okviru ovog istraživanja, ne može se doneti zaključak o obliku rezistencije.

Po prevalenciji, odmah iza rezistencije na aminoglikozidne antibiotike, kod izolata BMK, u okviru ove doktorske disertacije, utvrđuje se rezistencija na tetraciklin. Izolati *Enterococcus faecalis* su predstavljali gotovo polovinu izolata BMK (9/21), kod kojih je potvrđena fenotipska rezistencija na tetraciklin. S obzirom na prenosivi karakter rezistencije na tetraciklin i gotovo univerzalnu sklonost enterokoka da razmenjuju gene, ovakvi rezultati nisu iznenađujući i u skladu su sa podacima drugih istraživanja gde se rezistencija na tetraciklin utvrđuje kao jedan od od najčešćih fenotipa kod enterokoka (Peters i sar 2003.; Huys i sar., 2004; Jamet i sar., 2012; Gaglio i sar., 2016). Zanimljivo je da je fenotip rezistencije na tetraciklin kod četiri izolata *Enterococcus faecalis*, u okviru ove doktorske disertacije, bio povezan sa fenotipom rezistencije na eritromicin, a kod dva izolata *E. faecalis*, pored rezistencije na tetraciklin i eritromicin, utvrđena je i fenotipska rezistencija na hloramfenikol. Prema podacima iz literature, ovi obrasci fenotipske rezistencije se često mogu naći kod izolata *Enterococcus faecalis* iz hrane (Peters i sar., 2003; Huys i sar., 2004). Naročito je čest nalaz istovremenog prisustva rezistencije na tetraciklin i eritromicin, zbog lokalizacije gena *tet(M)* i *erm(B)* na istom konjugativnom transpozonu (Chopra i Roberts, 2001).

Od ukupno 38 izolata BMK, koji su izolovani sa ploča MRS-S agara sa dodatkom tetraciklina (1-256 µg/ml), 12 (31,58%) izolata je, na osnovu MIK vrednosti, pokazalo fenotip rezistencije na tetraciklin. Rezultati su poredivi sa rezultatima studije Ishihara i sar. (2013), gde od ukupno 250 izolata BMK izolovanih sa ploča sa dodatkom antibiotika, 64 (25,60%) izolata pokazuje fenotip rezistencije na dodate antibiotike. Autori zaključuju da budući da populacija BMK uključuje taksonomski heterogenu zajednicu (različiti rodovi i vrste), a granične MIK vrednosti se ne vezuju za rod, već za vrste, jasno je da i osetljivi izolati BMK mogu rasti na pločama sa dodatkom tetraciklina, pogotovo u situacijama, kada je koncentracija tetraciklina niža od graničnih MIK vrednosti za dotičnu vrstu. U istoj studiji (Ishihara i sar., 2013), izolat BMK, koji je pokazao rast na ploči sa dodatkom eritromicina, presejan je na ploču sa istim agarom sa dodatkom eritromicina, ali, pri subkultivaciji, rast izolata se ne zapaža. Autori

postavljaju hipotezu da direktno zasejavanje decimalnih razblaženja uzoraka sireva na površinu agara može inhibisati antimikrobnu aktivnost antibiotika.

Rezistencije na eritromicin, utvrđena je samo kod dva izolata *Lactobacillus plantarum* i jednog izolata *Leuconostoc mesenteroides*, i u većoj prevalenciji kod izolata *Enterococcus faecalis* (6/17; 35,29%). Dobijeni rezultati su u skladu sa istraživanjem Divergiliis i sar. (2008), gde od ukupno ispitanih 293 izolata različitih vrsta laktobacila, izolovanih u različitim stadijumima tradicionalne proizvodnje mocarele, ni kod jednog izolata nije utvrđen fenotip rezistencije na eritromicin. Kod četiri izolata *Enterococcus faecalis*, kao što je već navedeno, utvrđuje se rezistencija i na eritromicin i na tetraciklin. Budući da su kod sva četiri rezistentna izolata *Enterococcus faecalis* MIK vrednosti bile visoke, kako za eritromicin (128 µg/ml), tako i za tetraciklin (64 µg/ml i 128 µg/ml), pretpostavka je da su rezistencija na eritromicin i tetraciklin kod enterokoka, posledica nekog od prenosivih gena. Rezultati povezanosti rezistencije na tetraciklin i eritromicin, kod izolata *Enterococcus faecalis*, dobijeni u okviru ovog istraživanja, imaju uporište i u literaturi, gde rezultati mnogih studija potvrđuju činjenicu da su gen *tet(M)* koji kodira rezistenciju na tetraciklin i gen *erm(B)*, odgovoran za rezistenciju na eritromicin, često zajedno lokalizovani na konjugativnom transpozonu iz familije *Tn916* (Rice, 1998).

Rezistencija na klindamicin kod izolata BMK, sa izuzetkom *Lactobacillus brevis*, bila je sporadična pojava, što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima (Klare i sar., 2007). Kod vrste *Lactobacillus brevis*, 10 od ukupno 13 izolata pokazalo je rezistenciju na klindamicin. Iako su BMK najčešće osetljive na klindamicin, rezistencija na ovaj antibiotik je zabeležena kod pojedinih izolata BMK, kako poreklom iz sireva (Flórez i sar., 2005), tako i iz drugih namirnica i probiotskih proizvoda (Blandino i sar., 2008; Egervarn i sar., 2009; Nawaz i sar., 2011). Uzevši u obzir unimodalnu distribuciju MIK vrednosti na klindamicin kod izolata *Lactobacillus brevis*, obuhvaćenih ovim istraživanjem, pretpostavka je da se radi o prirodnoj rezistenciji. Ipak, kako postoji 66 opisanih gena koji kodiraju rezistenciju na makrolide, linkozamide i streptogramine, od kojih su pojedini geni često lokalizovani na mobilnim genetskim elementima (Rao



Thumu i Halami, 2012), molekularna karakterizacija baze rezistencije na klindamicin je neophodna u cilju utvrđivanja prirode rezistencije.

Prevalencija rezistencije na hloramfenikol kod izolata BMK, obuhvaćenih ovim istraživanjem, bila je niska, osim u slučaju vrste *Leuconostoc mesenteroides*, gde je trećina izolata (6/18) bila rezistentna. Kod 2 izolata *Enterococcus faecalis* rezistentnih na hloramfenikol, utvrđena je i rezistencija na tetraciklin i eritromicin.

Rezistencija na ampicilin predstavljala je najmanje zastupljen fenotip rezistencije među izolatima BMK poreklom iz tradicionalnih sireva Srbije, što je u skladu sa podacima iz literature, gde BMK, u najvećem broju slučajeva pokazuju osetljivost na beta laktamske antibiotike (Danielsen i Wind, 2003, Zhou i sar., 2005; Klare i sar., 2007; Beletti i sar., 2009; Nawaz i sar., 2011; Ishihara i sar., 2013).

Svih 155 identifikovanih izolata BMK, poreklom iz tradicionalnih sireva Srbije, bez obzira da li su ili nisu pokazali fenotip rezistencije na tetraciklin, primenom PCR metode, ispitani su na prisustvo 8 gena, odgovornih za rezistenciju na tetraciklin: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* i *tet(W)*. PCR amplikoni, specifični za sekvencu *tet(M)* gena, dobijeni su kod dva izolata *Enterococcus faecalis*, jednog izolata *Lactococcus lactis* i jednog izolata *Lactobacillus paracasei*. Kod izolata *Enterococcus faecalis* 251, nosioca *tet(M)* gena, utvrđeno je prisustvo i gena *tet(L)*. Ovaj genotip rezistencije na tetraciklin često je prisutan kod kliničkih izolata *Enterococcus faecalis* (Huys i sar., 2004). Studija Huys i sar. (2004) potvrđuje *tet(M)* gen kao najčešći kod enterokoka rezistentnih na tetraciklin, poreklom iz različitih evropskih sireva. I u studiji Aarestrup i sar. (2001) i Wilcks i sar. (2005), *tet(M)* gen predstavlja dominantan gen kod izolata enterokoka rezistentnih na tetraciklin. Rezultati studije Hummel i sar. (2007) govore suprotno. Analizom distribucije genetskih determinanti, odgovornih za rezistenciju na tetraciklin kod izolata *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* poreklom iz sireva, fermentisanih proizvoda od mleka i surutke, *tet(L)* gen se utvrđuje kod 94% izolata, *tet(M)* gen kod 63% izolata, *tet(K)* gen kod 56% izolata, dok se geni *tet(O)* i *tet(S)* ne utvrđuju.

Zanimljivo je da su MIK vrednosti za tetraciklin kod izolata BMK, nosioca *tet* gena, bile veoma visoke, osim u slučaju *Lactobacillus paracasei* kod koga je MIK vrednost iznosila 0,5 µg/ml. Niske vrednosti MIK, uz istovremeno detektovanje gena za rezistenciju na tetraciklin, najčešće se dovode u vezu sa postojanjem tzv. "tihih", odnosno pseudo gena, koji nisu u ekspresiji (Korhonen, 2010), bilo usled "down-regulation" efekta u promotor regiji, ili usled nekog drugog mehanizma. Postojanje ovakvih gena, može da bude uzrok nepodudaranja rezultata fenotipa i genotipa rezistencije (Sundsford i sar., 2004, Woodford i Sunsfjord, 2005).

Niska prevalencija gena za rezistenciju na tetraciklin kod izolata BMK, utvrđena u ovoj doktorskoj disertaciji, u skladu je sa prethodnim istraživanjima koja su obuhvatala fermentisane proizvode od mleka i mesa, a među njima i tradicionalne sireve od sirovog mleka (Devirgiliis i sar., 2008; Comunian i sar., 2010; Zycka-Krzesinska i sar., 2015). Niska prevalencija gena za rezistenciju na tetraciklin kod izolata BMK može da se dovede u vezu sa načinom uzgoja životinja, čije mleko služi za proizvodnju sireva. U istraživanju Comunian i sar.a (2010) utvrđeno je da je prevalencija gena za rezistenciju na tetraciklin i eritromicin, kod izolata *Lactobacillus parcasei* poreklom iz fermentisanih proizvoda od mleka i mesa u Italiji, daleko manja kada su životinje, čije je mleko i meso predstavljalo sirovinu za dobijanje fermentisanih proizvoda, bile uzgajane u ekstenzivnim uslovima, gde antibiotici nisu sistemski primenjivani. Suprotno ovome, kada su mleko i meso, poreklom od životinja u intenzivnom uzgoju, prevalencija ovih gena je značajno veća. Kako se muzna grla koja daju mleko za proizvodnju tradicionalnih sireva Srbije ekstenzivno drže, a antibiotici se ne primenjuju, rezultati veoma niske prevalencije gena za rezistenciju su mogli biti očekivani. Pored toga, u ispitivanju Devirgillis i sar. (2008) utvrđeno je da geni za rezistenciju na tetraciklin, eritromicin i kanamicin predstavljaju, gotovo isključivo karakteristiku BMK izolovanih iz sirovog mleka, dok gotovi proizvod, sir, ne sadrži fenotipski rezistentne BMK. Isti autori postavljaju hipotezu da tradicionalni proces proizvodnje mocarele uspostavlja negativnu selekciju u odnosu na BMK koje nose gene rezistencije na antibiotike. Takođe, prema istraživanju Flórez i Mayo (2015), osetljiva

populacija BMK, tzv. „*wild-type*“ populacija, koji nisu nosioci stečene rezistencije na antibiotike, brže se umnožavaju i postižu veću brojnost u matriksu sira u odnosu na rezistentnu subpopulaciju BMK, i time na osnovu kompeticije, bakterije rezistentne na antibiotike bivaju isključene.

U istraživanjima u kojima su primenjene kulturno nezavisne tehnike, gde se prisustvo gena za rezistenciju utvrđuje u uzorku celokupne DNK ekstrahovane iz uzorka sira, utvrđuje se daleko veća prevalencija gena za rezistenciju na tetraciklin (Flórez i sar., 2014; Flórez i Mayo, 2015). U istraživanju Flórez i sar. (2014), koje je obuhvatilo 20 španskih i italijanskih sireva, zabeleženo je značajna prevalencija gena *tet(S)* i *tet(W)*, a utvrđeni su i geni *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*. Samo u jednom od 20 uzoraka sireva, nije bilo utvrđeno prisustvo gena za rezistenciju na tetraciklin. Iako ovaj pristup daje širu sliku o opterećenosti sireva genima za rezistenciju na tetraciklin, ipak ne postoji informacija o tome da li geni potiču od živih bakterija i koja populacija bakterija predstavlja rezervoar ovih gena. Kako bi se dobila potpuna slika o stvarnoj opterećenosti sireva genima za rezistenciju na antibiotike, interdisciplinarni pristup uz kombinaciju kulturnih i kulturno nezavisnih tehnika, svakako bi dalo najbolje rezultate.

Lateralni prenos gena ima glavnu ulogu u evoluciji bakterija, a s obzirom da dovodi do rearanžiranja bakterijskog genoma pomaže u sticanju novih, poželjnih osobina, ali i brisanju onih genetičkih informacija koje ćeliji nisu potrebne (Rossi i sar., 2014). Ispitivanjem mogućnosti transfera gena za rezistenciju na tetraciklin *tet(M)* u uslovima *in vitro*, u okviru ove disertacije dokazana je jedino mogućnost intraspecijskog transfera gena u okviru vrste *Enterococcus faecalis*, sa niskom frekvencijom prenosa  $10^{-7}$ - $10^{-8}$  transkonjuganata po recipijentu. Ipak, rezultati iz literature u pogledu mogućnosti transfera gena za rezistenciju u populaciji bakterija mlečne kiseline veoma variraju. U istraživanju Huys i sar. (2008) i Nawaz i sar. (2011) ispitivana je mogućnost prenosa *tet* gena između enterokoka, gde je dokazan prenos sa frekvencijom transfera  $10^{-6}$ - $10^8$ . U pojedinim studijama potvrđena je mogućnost i interspecijskog lateralnog transfera *tet* gena sa sličnom stopom transfera, uglavnom sa laktobacila na *Enterococcus faecalis*

i *Enterococcus faecium* (Ge i sar., 2007; Ouoba i sar., 2008; Devirgiliis i sar., 2009; Nawaz i sar., 2011). Za razliku od ovih ispitivanja, u istraživanju Ge i sar. (2007) nije utvrđena mogućnost interspecijskog prenosa gena sa *Streptococcus thermophilus* na *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*. Ni u istraživanju Ouoba i sar. (2008), geni za rezistenciju na tetraciklin nisu mogli da se prenesu sa *Lactobacillus reuteri* na *Enterococcus faecium*. U istraživanju Klare i sararadnika (2007), nije potvrđena mogućnost kako intra-, tako ni interspecijskog transfera gena. Do lateralnog transfera gena u mikrobnim ekosistemima obično dolazi između bakterija koje pokazuju zajedničke karakteristike u veličini genoma, udelu G-C nukleotidnih parova, sistemima iskorišćenja izvora ugljenika i toleranciji na kiseonik (Rossi i sar., 2014). Kako je prenos gena složen proces, koji zavisi od mnogih spoljašnjih uticaja, ne može se sa sigurnošću tvrditi da li će do prenosa doći ili ne, čak i kod bakterija iste vrste.

Problem u eksperimentima prenosa gena je i nemogućnost interpolacije rezultata dobijenih u uslovima *in vitro*, na uslove *in vivo*. Iako postoji hipoteza da do lateralnog transfera gena u gastrointestinalnom traktu može da dođe, kako zbog diverziteta vrsta, tako i zbog brojnosti mikrobiote creva, ova hipoteza još uvek nije ni potvrđena ni opovrgnuta (Rossi i sar., 2014). Razloge za ovo pre svega treba tražiti u složenosti osmišljavanja eksperimenta u uslovima *in vivo*, pa tako odgovor na pitanje da li je i u kojoj meri rizik od razmene gena u gastrointestinalnom traktu nakon konzumacije neke hrane prisutan, ostaje bez konačnog odgovora (Schjørring i Krogfelt, 2011).

Generalna slika, na osnovu dostupnih studija o BMK poreklom iz hrane, ukazuje na nisku prevalenciju gena rezistencije na antibiotike, sa čak još nižim potencijalom za lateralni transfer gena na patogene ili oportunističko patogene bakterije, prilikom izvođenja eksperimenata konjugacije u uslovima *in vitro*. Ipak, imajući u vidu značajnu prevalenciju rezistencije na antibiotike kod kliničkih izolata, široki spektar rezervoara komensalnih bakterija rezistentnih na antibiotike (Marshall i sar., 2009), ali i visoku frekvenciju lateralnog prenosa gena, koja se uspostavlja u prirodnim mikrobnim zajednicama, prava prevalencija BMK rezistentnih na antibiotike može biti potcenjena. Razlozi ovome, delom leže i u heterogenosti eksperimentalnih studija koje se bave

ovom problematikom, sa velikim varijacijama, kako u broju, tako i u panelima ispitivanih antibiotika, dok molekularne metode često ne prate dokaz fenotipa rezistencije. Gram pozitivne BMK nisu patogenog karaktera, i kao takve, često se nepravedno potcenjuje značaj genetske karakterizacije fenotipa rezistencije na antibiotike, a ako do karakterizacije i dođe, obično se geni povezuju sa poznatim konjugativnim transpozonomima ili insercionim sekvencama. Ukoliko se ova veza ne može uspostaviti, problem postoji kako dokazati da potvrđeni gen za rezistenciju na određeni antibiotik, nije prenosivog karaktera. Time se identifikacija mobilnih elemenata u genomskom kontekstu determinanti za rezistenciju smatra faktorom od suštinskog značaja u proceni rizika od lateralnog transfera gena za rezistenciju.

## 7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ispitivanja izvedeni su sledeći zaključci:

1. Prosečan broj bakterija mlečne kiseline u uzorcima tradicionalnih sireva Srbije iznosio je 7,47-7,74 log CFU/g. Pri koncentraciji tetraciklina od 64 µg/ml, prosečan broj bakterija mlečne kiseline u uzorcima istih sireva iznosio je 3,35-3,98 log CFU/g.
2. Genotipizacijom izolata bakterija mlečne kiseline, primenom rep-PCR sa (GTG)<sub>5</sub> oligonukleotidnim prajmerom, utvrđen je visoki genetički diverzitet.
3. MALDI TOF masena spektrometrija se pokazala kao uspešna metoda u identifikaciji bakterija mlečne kiseline poreklom iz tradicionalnih sireva. Izolati bakterija mlečne kiseline su identifikovani kao: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus parakefiri*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus diolivorans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae* i *Pediococcus pentosaceus*.
4. Najzastupljeniji fenotip rezistencije kod izolata bakterije mlečne kiseline jeste rezistencija na aminoglikozidne antibiotike. Rezistencija na kanamicin predstavljala je karakteristiku 37,59% izolata, dok je rezistencija na streptomycin utvrđena kod 21,88% izolata bakterija mlečne kiseline. Prevalencija ostalih fenotipova rezistencije je bila sledeća: tetraciklin (13,55%), klindamicin (11,28%), gentamicin (8,39%), hloramfenikol (7,74%), eritromicin (5,81%) i ampicilin (0,65%).

5. Prisustvo *tet(M)* gena utvrđeno je kod 2,58% izolata bakterija mlečne kiseline. Kod jednog izolata *Enterococcus faecalis* dokazano je prisustvo *tet(M)* i *tet(L)* gena.
6. Potvrđen je prenos *tet(M)* gena sa izolata *Enterococcus faecalis* 202 na *Enterococcus faecalis* JH2-2 u uslovima *in vitro*. Frekvencija prenosa gena je bila niska.
7. Izolati bakterija mlečne kiseline poreklom iz tradicionalnih sireva Srbije ne predstavljaju rezervoar gena rezistencije na tetraciklin

## 8. LITERATURA

1. Aarestrup F.M., Seyfarth A.M., Emborg H.D., Pedersen K., Hendriksen R.S., Bager F. 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(7):2054-2059.
2. Abriouel H., Martín-Platero A., Maqueda M., Valdivia E., Martínez-Bueno M. 2008. Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 127:200–208.
3. Agencija za lekove i medicinska sredstva, ALIMS. 2014.  
<https://www.alims.gov.rs/ciril/files/2015/12/vet-promet2014.pdf>
4. Agencija za lekove i medicinska sredstva, ALIMS. 2015.  
<https://www.alims.gov.rs/ciril/files/2017/06/promet-vet-2015.pdf>
5. Agencija za lekove i medicinska sredstva, ALIMS. 2016.  
<https://www.alims.gov.rs/ciril/files/2018/02/vet-promet2016.pdf>
6. Alekshun M. N., Levy S. B. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128:1037–1050.
7. Allen H. K. 2014. Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals. *Current Opinion in Microbiology*, 19:25–29.
8. Allen H. K., Donato J., Wang H. H., Cloud-Hansen K. A., Davies J., Handelsman J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8:251–259.
9. Amabile-Cuevas C.F., Chicurel M.E. 1992. Bacterial plasmids and gene flux. *Cell*, 70:189-199.
10. Aminov R. I., Mackie R. I. 2007. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 271:147–161.



11. Andremont A., How A., Flora C. 2003. Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance. *Asm News*, 69:601–607.
12. Andrighetto C., Knijff E., Lombardi A., Torriani S., Vancanneyt M., Kersters K., Swings J., Dellaglio F. 2001. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research* 68:303–316.
13. Angelakis E., Million M., Henry M., Raoult D. 2011. Rapid and accurate bacterial identification in probiotics and yoghurts by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of Food Science*, 76:M568–M572.
14. Ayad E. H. E., Nashat S., El-Sadek N., Metwaly H., El-Soda M. 2004. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology*, 21:715–725.
15. Bachmann H.P., Frohlich-Wyder M.T., Jakob E., Roth E., Wechsler D., Beuvier E., Buchin S., 2011. Raw milk cheeses, In: Fuquay J.W., Fox P.F., Mc Sweeney P.L.H. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd ed., vol. 1. Academic Press, Elsevier Ltd, San Diego, 652–660.
16. Bager F., Emborg H. D., Heuer O. E. 2002. DANMAP – Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Statens Serum Institut, Danish Veterinary and Food administration, Danish Medicines Agency Danish Veterinary Institute, Copenhagen, Denmark.
17. Baltz R.H. 2007. Antimicrobials from actinomycetes: back to the future. *Microbe*, 2:125–131.
18. Banjara N., Suhr M. J., Hallen-Adams H. E. 2015. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Current Microbiology*, 70:792–800.
19. Begovic J., Brandsma J. B., Jovcic B., Tolinacki M., Veljovic K., Meijer W. C., Topisirovic L. 2011. Analysis of dominant lactic acid bacteria from artisanal raw milk cheeses produced on the mountain Stara planina, Serbia. *Archives of Biological Sciences*, 63(1):11-20.

20. Belletti N., Gatti M., Bottari B., Neviani E., Tabanelli G., Gardini, F., 2009. Antibiotic resistance of lactobacilli isolated from two Italian hard cheeses. *Journal of Food Protection*, 72:2162-2169.
21. Beresford T. P., Fitzsimons N. A., Brennan N. L., Cogan T. M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11:259–274.
22. Beuvier E., Buchin S., Fox P., McSweeney P., Cogan T., Guinee T. 2004. Raw milk cheeses, In: Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T. M., Guinee T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics & Microbiology*, 3rd ed., vol. 1. Elsevier Ltd., London, 319–345.
23. Blandino G., Milazzo I., Fazio D. 2008. Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products available in Italy. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 20:199–203.
24. Böhme K., Morandi S., Cremonesi P., Fernández No I. C., Barros-Velázquez J., Castiglioni B., Brasca M., Cañas B., Calo-Mata P. 2012. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Italian dairy products by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 33(15):2355-2364.
25. Breuer U., Harms H. 2006. *Debaryomyces hansenii* - An extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23:415–437.
26. Bryan L.E., Kwan S. 1981. Mechanisms of aminoglycoside resistance of anaerobic bacteria and facultative bacteria grown anaerobically. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 8:SD1–SD8.
27. Bulajić S., Mijačević Z., Ledina T., Golić B. 2015. Safety evaluation of sjenica cheese with regard to coagulase-positive staphylococci and antibiotic resistance of lactic acid bacteria and staphylococci. *Acta Veterinaria*, 65:518–537.
28. Callon C., Picque D., Corrieu G., Montel M. C. 2011. Ripening conditions: A tool for the control of *Listeria monocytogenes* in uncooked pressed type cheese. *Food Control*, 22:1911–1919.
29. Caridi A., Micari P., Caparra P., Cufari A., Sarullo V. 2003. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal*, 13:191–200.

30. Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli M., Collins J.K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection* 61:1636–1643.
31. Chebeňová-Turcovská V., Ženišová K., Kuchta T., Pangallo D., Brežná B. 2011. Culture-independent detection of microorganisms in traditional Slovakian bryndza cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 150:73–78.
32. Chopra I., Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics : Mode of action , applications , molecular biology , and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65:232–260.
33. Çitak S., Yucel N., Orhan S. 2004. Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57:27–31.
34. Clewell D. B., Flannagan S. E., Jaworski D. D. 1995. Unconstrained bacterial promiscuity: the *Tn916-Tn1545* family of conjugative transposons. *Trends in Microbiology*, 3:229–236.
35. Codex Alimentarius Commission, CAC. 2011. Guidelines for Risk Analysis of Foodborne Antimicrobial Resistance. [www.codexalimentarius.net/download/standards/11776/CXG\\_077e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/11776/CXG_077e.pdf)
36. Cogliani C., Goossens H., Greko C. 2011. Restricting antimicrobial use in food animals: Lessons from Europe. *Microbe*, 6:274–279.
37. Comunian R., Daga E., Dupré I., Paba A., Devirgiliis C., Piccioni V., Perozzi G., Zonenschain D., Rebecchi A., Morelli L., De Lorentiis A., Giraffa G. 2010. Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 138:151–156.
38. Coppola R., Succi M., Tremonte P., Reale A., Salzano G., Sorrentino E. 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*, 85:193-204.

39. Cosentino S., Pisano M.B., Corda A., Fadda M.E., Piras C., 2004. Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Journal of Dairy Research* 71:444–450.
40. Curragh H.J., Collins M.A., 1992. High levels of spontaneous drug resistance in *Lactobacillus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 73:31–36.
41. Čanžek Majhenič A. Č., Rogelj I., Perko B. 2005. Enterococci from Tolminc cheese: Population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2):239-244.
42. Danielsen M., Simpson P. J., O'Connor E. B., Ross R. P., Stanton C. 2007. Susceptibility of *Pediococcus* spp. to antimicrobial agents. *Journal of Applied Microbiology*, 102:384–389.
43. Danielsen M., Wind A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82:1–11.
44. Danish Technical University, DTU, National Food Institute, EU Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance External Quality Assurance System (EQAS). 2017. Protocol For antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli*, enterococci and staphylococci.
45. Davies J. E. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264 (5157): 375-382.
46. Davies J. E. 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants, *Ciba Found Symposium*, 207:15-27. Discussion 27-35.
47. De Fátima M., Lopes S., Ribeiro T., Martins M. P., Tenreiro R., Teresa M., Crespo B. 2003. Gentamicin resistance in dairy and clinical enterococcal isolates and in reference strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52:214–219.
48. Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E., Hols, P. 1999. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76:159–184.

49. Delgado S., Flórez A. B., Mayo B. 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Current Microbiology*, 50:202–207.
50. Devirgiliis C., Barile S., Caravelli A., Coppola D., Perozzi G. 2010. Identification of tetracycline- and erythromycin-resistant Gram-positive cocci within the fermenting microflora of an Italian dairy food product. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 313–323.
51. Devirgiliis C., Barile S., Perozzi G. 2011. Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota. *Genes and Nutrition*, 6:275–284.
52. Devirgiliis C., Caravelli A., Coppola D., Barile S., Perozzi G. 2008. Antibiotic resistance and microbial composition along the manufacturing process of Mozzarella di Bufala Campana. *International Journal of Food Microbiology*, 128:378–384.
53. Devirgiliis C., Zinno P., Perozzi G. 2013. Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Frontiers in Microbiology*, 4:1–13.
54. Donnelly, C. 2016. *The Oxford companion to cheese*. Oxford University Press: New York, USA.
55. Dušková M., Karpíšková R. 2013. Antimicrobial resistance of Lactobacilli isolated from food. *Czech Journal of Food Science*, 31:27–32.
56. Egervärn M., Danielsen M., Roos S., Lindmark H., Lindgren S. 2007. Antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Food Protection*, 70(2): 412-418.
57. Egervärn M., Roos S., Lindmark H., 2009. Identification and characterization of antibiotic resistance genes in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 107:1658–1668.
58. Elkins C. A., Mullis L. B. 2004. Bile-mediated aminoglycoside sensitivity in *Lactobacillus* species likely results from increased membrane permeability attributable to cholic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:7200–7209.

59. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST. 2018. <https://mic.eucast.org/Eucast2/regShow.jsp?Id=8146>
60. European Food Safety Authority. 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal, 10:1–10.
61. Fernández E., Alegría Á., Delgado S., Martín M. C., Mayo B. 2011. Comparative phenotypic and molecular genetic profiling of wild *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains of the *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* genotypes, isolated from starter-free cheeses made of raw milk. Applied and Environmental Microbiology, 77:5324–5335.
62. Fernández E., Alegría Á., Delgado S., Mayo B. 2010. Phenotypic, genetic and technological characterization of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese. International Dairy Journal, 20:142–148.
63. Flórez A. B., Alegría Á., Rossi F., Delgado S., Felis G. E., Torriani S., Mayo B. 2014. Molecular identification and quantification of tetracycline and erythromycin resistance genes in Spanish and Italian retail cheeses. BioMed Research International, Article ID 746859.
64. Flórez A. B., Delgado S., Mayo B. 2005. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. Canadian Journal of Microbiology, 51:51–58.
65. Flórez A. B., Mayo B. 2015. Diversity and dynamics of antibiotic-resistant bacteria in cheese as determined by PCR denaturing gradient gel electrophoresis. International Journal of Food Microbiology, 214:63–69.
66. Flórez A.B., Campedelli I., Delgado S., Alegría Á., Salvetti E., Felis G.E., Mayo B., Torriani S. 2016. Antibiotic susceptibility profiles of dairy leuconostoc, analysis of the genetic basis of atypical resistances and transfer of genes in vitro and in a food matrix. PLoS ONE 11(1): e0145203.
67. Food and Drug Administration. 2014. 2012 Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals. FDA, Washington, DC.

- <http://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/AnimalDrugUserFeeActADUFA/UCM416983.pdf>.
68. Franz C. M. A. P., Muscholl-Silberhorn A. B., Yousif N. M. K., Vancanneyt M., Swings J., Holzapfel W. H. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and environmental Microbiology*, 67:4385–4389.
  69. Frech G., Schwarz S. 2000. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: Construction and application of specific gene probes. *Journal of Applied Microbiology*, 89:633–641.
  70. Frölich-Wyder, M. T. 2003. In: Boekhout T., Robert V. (Eds.). *Yeasts in food, beneficial and detrimental aspects*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
  71. Gaglio R., Couto N., Marques C., de Fatima Silva Lopes M., Moschetti G., Pomba C., Settanni L. 2016. Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 236:107–114.
  72. Garabal J.I. 2007. Biodiversity and the survival of autochthonous fermented products. *International Microbiology*, 10:1–3.
  73. Ge B., Jiang P., Han F., Saleh N. K., Dhiman N., Fedorko D. P., Nelson N. A., Meng J. 2007. Identification and antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria from retail fermented foods. *Journal of Food Protection*. 70:2606–2612.
  74. Gevers D. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205:31–36.
  75. Gevers D. 2003. Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages, Dissertation, Faculty of Sciences, department of biochemistry, physiology and microbiology laboratory of microbiology, University of Ghent.

76. Gevers D., Huys G., Swings J. 2003. *In vitro* conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus isolates* to other Gram-positive bacteria. FEMS Microbiology Letters, 225:125–130.
77. Giraffa G. 2002. Enterococci from foods. FEMS Microbiology Reviews, 26:163-171.
78. Giraffa G., Neviani E. 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. International Journal of Food Microbiology, 67:19–34.
79. Global Agricultural Information Network. 2011. Stricter Control on Antibiotics in Animal Husbandry. Available at [https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Stricter%20Control%20On%20Antibiotics%20In%20Animal%20Husbandry\\_Berlin\\_Germany\\_11-9-2011.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Stricter%20Control%20On%20Antibiotics%20In%20Animal%20Husbandry_Berlin_Germany_11-9-2011.pdf)
80. Goerges S., Mounier J., Rea M. C., Gelsomino R., Heise V., Beduhn R., Cogan T. M., Vancanneyt M., Scherer S. 2008. Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a south german red smear cheese. Applied and Environmental Microbiology, 74:2210–2217.
81. Golić N., Čadež N., Terzić-Vidojević A., Šuranská H., Beganović J., Lozo J., Kos B., Šuškić J., Raspor P., Topisirović L. 2013. Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. International Journal of Food Microbiology, 166:294–300.
82. Gori K., Sørensen L. M., Petersen M. A., Jespersen L., Arneborg N. 2012. *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese-surface model. MicrobiologyOpen, 1:161–168.
83. Gueimonde M., Sánchez B., de los Reyes-Gavilán C. G., Margolles A. 2013. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. Frontiers in Microbiology, 4:1–6.
84. Guerrero L., Guardia M.D., Xicola J., Verbeke W., Vanhonacker F., Zakowska-Biemans S., Sajdakowska M., Sulmont-Rosse C., Issanchou S., Contel M., Scalvedi M.L., Granli



- B.S., Hersleth M. 2009. Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative cross-cultural study. *Appetite*, 52:345–354.
85. Hammad A.M., Hassan H.A., Shimamoto T. 2015. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. *Food Control*, 50: 815-820.
86. Hansen L., Blanchard P., Hirsh D. 1996. Distribution of *tet(H)* among *Pasteurella* isolates from the United States and Canada. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 40:1558–1560.
87. Hayes J. R., English L. L., Carter P. J., Lee K. Y., Wagner D. D., David G., Proescholdt T., White D. G. 2003. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:7153–7160.
88. Hemme D., Foucaud-Scheunemann C. 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14:467–494.
89. Henke J. M., Bassler B. L. 2004. Bacterial social engagements. *Trends in Cell Biology*, 14(11): 648-656.
90. Hopwood D. A. 2007. How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? *Molecular Microbiology*, 63:937–940.
91. Hummel A. S., Hertel C., Holzapfel W. H., Franz C. M. A. P. 2007. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:730–739.
92. Huys G., D 'haene K., Collard J.M., Swings J. 2004. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Applied and environmental microbiology*, 70:1555–1562.

93. Huys G., D'Haene K., Danielsen M., Mättö J., Egervärn M., Vandamme P. 2008. Phenotypic and molecular assessment of antimicrobial resistance in *Lactobacillus paracasei* strains of food origin. *Journal of Food Protection*, 71:339–344.
94. Institute of Medicine, National Research Council. 1999. The use of drugs in food animals – benefits and risks. IOM-NRC, 5.22. National Academy Press, Washington, DC, USA.
95. International Organization for Standardization, ISO. 2010. ISO 10932:2010 Milk and milk products - Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB).
96. Irlinger F., Mounier J. 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20:142–148.
97. Ishihara K., Nakajima K., Kishimoto S., Atarashi A., Muramatsu Y., Hotta A., Ishii S., Takeda Y., Kikuchi M., Tamura, Y. 2013. Distribution of antimicrobial-resistant lactic acid bacteria in natural cheese in Japan. *Microbiology and Immunology*, 57: 684–691.
98. Jamet E., Akary E., Poisson M. A., Chamba J. F., Bertrand X., Serror P. 2012. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. *Food Microbiology*, 31:191–198.
99. Kaçmaz B., Aksoy A. 2005. Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25:535–538.
100. Katla A. K., Kruse H., Johnsen G., Herikstad H. 2001. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 67:147–152.
101. Klare I., Konstabel C., Werner G., Huys G., Vankerckhoven V., Kahlmeter G., Hildebrandt B., Müller-Bertling S., Witte W., Goossens H. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(5): 900-912.

102. Korhonen J. 2010, Antibiotic resistance of Lactic Acid Bacteria, Publications of the University of Eastern Finland, Doctoral dissertation, Department of Biosciences University of Eastern Finland, Kuopio.
103. Leclercq R., Derlot E., Duval J., Courvalin P. 1989. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33:10–15.
104. Levy S. B., Miller R. V. 1989. Horizontal gene transfer in relation to environmental release of genetically engineered microorganisms. In: Levy S. B., and Miller R. V. (Eds.). *Gene Transfer in the Environment*. McGraw-Hill Publishing Company, New York, USA, 405-420.
105. Levy S.B. 1997. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. *Ciba Found Symposium*, 207:1-9. Discussion 9-14.
106. Levy, S.B. 2002. *The antibiotic paradox: How the misuse of antibiotics destroys their curative powers*. Perseus Publishing, New York, USA.
107. Li X. H., Li Y. L., Alvarez A., Harper W.J. Wang H.H. 2011. Antibiotic resistance mitigation in dairy fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (20):7093-7095.
108. Li X., Wang H. H. 2010. Tetracycline resistance associated with commensal bacteria from representative ready-to-consume deli and restaurant foods. *Journal of Food Protection*, 73(10): 1841-1848.
109. Lopes M.F.S., Pereira C. I., Rodrigues F.M.S., Martins M.P., Mimoso M.C., Barros T.C., Figueiredo Marques J.J., Tenreiro R.P., Almeida J.S., Barreto Crespo M.T. 1999. Registered designation of origin areas of fermented food products defined by microbial phenotypes and artificial neural networks. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:4484-4489.
110. López S., Mayo B. 1997. Identification and characterization of homofermentative mesophilic *Lactobacillus* strains isolated from artisan starter-free cheeses. *Letters in Applied Microbiology*, 25:233–8.

111. Luo H., Wan K., Wang H. H. 2005. High-frequency conjugation system facilitates biofilm formation and  $\text{pam } \beta 1$  transmission by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:2970–2978.
112. Maietti L., Bonvini B., Huys G., Giraffa G. 2007. Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants among *Enterococcus italicus* isolates from dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 30:509–517.
113. Maron D. F., Smith T. J., Nachman K., E. 2013. Restriction on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey, *Globalization and Health*, 9:48.
114. Marshall B. M., Levy S. B. 2011. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24:718–733.
115. Marshall B. M., Ochieng D. J., Levy S. B. 2009. Commensals: Underappreciated reservoir of antibiotic resistance. *Microbe* 4(5): 231-238.
116. Martínez J. L. 2012. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, 3:1-3.
117. Mas M., Tabla R., Moriche J., Roa I., Gonzalez J., Rebollo J. E., Cáceres P. 2002. Ibore goat's milk cheese: Microbiological and physicochemical changes throughout ripening. *Lait*, 82:579-587.
118. Mathur S., Singh R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 105:281–295.
119. Matic I., Taddei F., Radman M. 1996. Genetic barriers among bacteria. *Trends in Microbiology*, 4: 69-73.
120. McSweeney P. L. H. 2004. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57:127-144.
121. Mellon M., Benbrook C., Benbrook K.L. 2001. Hogging it: Estimates of antimicrobial abuse in livestock. UCS Publishing, Cambridge, MA. [http://www.ucsusa.org/food\\_and\\_agriculture/our-failing-food-system/industrial-agriculture/hogging-it-estimates-of.html#.VbAHKbWebiw](http://www.ucsusa.org/food_and_agriculture/our-failing-food-system/industrial-agriculture/hogging-it-estimates-of.html#.VbAHKbWebiw)

122. Mijačević Z., Bulajić S. 2008. Sensory evaluation and microbiological characterization of autochthonous Sombor cheese. *Acta Veterinaria*, 58:531–541.
123. Montel M.C., Buchin S., Mallet A., Delbes-Paus C., Vuitton D. A., Desmasures N., Berthier F. 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177:136–154.
124. Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H. 2003. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, American Society for Microbiology.
125. Nacef M., Chevalier M., Chollet S., Drider D., Flahaut C. 2017. International Journal of Food Microbiology MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese : The Maroilles. *International Journal of Food Microbiology*, 247: 2–8.
126. NARMS 2000 Annual Report. 2000. Frequency of resistance and multidrug resistance among top 15 non-Typhi Salmonella serotypes, 2000. [https://www.cdc.gov/narms/annual/2000/tables/table\\_8.htm](https://www.cdc.gov/narms/annual/2000/tables/table_8.htm)
127. Nawaz M., Wang J., Zhou A., Ma C., Wu X., Moore J. E., Cherie Millar B., Xu J. 2011. Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Current Microbiology*, 62:1081–1089.
128. Ndoye B., Rasolofo E. A., LaPointe G., Roy D. 2011. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Science and Technology*, 91:495–524.
129. Nicolaou N., Xu Y., Goodacre R. 2012. Detection and quantification of bacterial spoilage in milk and pork meat using MALDI-TOF-MS and multivariate analysis. *Analytical Chemistry*, 84(14): 5951-5958.
130. Nieto-Arribas P., Seseña S., Poveda J. M., Chicón R., Cabezas L., Palop L. 2011. *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiology*, 28:891–899.
131. Nikolic M., Terzic-Vidojevic A., Jovcic B., Begovic J. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 122:162–170.

132. Ogier J.C., Serror P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126: 291-301.
133. Ouadghiri M., Amar M., Vancanneyt M., Swings J. 2005. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiology Letters*, 251:267-271.
134. Ouoba L. I. I., Lei V., Jensen L. B. 2008. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 121:217-224.
135. Palles T., Beresford T., Condon S., Cogan T. M. 1998. Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 85:147-154.
136. Pavlovic M., Huber I., Konrad R., Busch U. 2013. Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. *The Open Microbiology Journal*, 7:135-141.
137. Paxson H. 2008. Post-Pasteurian Cultures: The Microbiopolitics of Raw-Milk Cheese in the United States. *Cultural Anthropology*, 23:15-47.
138. Peters J., Mac K., Wichmann-Schauer H., Klein G., Ellerbroek L. 2003. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 88:311 - 314.
139. Phillips I., Casewell M., Cox T., de Groot B., Friis C., Jones R., Nightingale C., Preston R., Waddell J. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53:28-52.
140. Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56:20-51.
141. Quigley L., O'Sullivan O., Beresford T. P., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Cotter P. D. 2011. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 150:81-94.

142. Randazzo C. L., Caggia C., Neviani E. 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*, 78:1–9.
143. Rao Thumu S. C., Halami P. M. 2012. Presence of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria from fermented foods of Indian origin. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 102:541–551.
144. Rice, L. B. 1998. Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 1871–1877
145. Roberts M. C. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 245:195–203.
146. Roberts M. C., Schwarz S. 2016. Tetracycline and phenicol resistance genes and mechanisms: importance for agriculture, the environment, and humans. *Journal of Environment Quality*, 45(2):576-592.
147. Roe D. E., Braham P. H., Weinberg A., Roberts M. C. 1995. Characterization of tetracycline resistance in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiology and Immunology*, 10:227–232.
148. Rossi F., Rizzotti L., Felis G. E., Torriani S. 2014. Horizontal gene transfer among microorganisms in food: Current knowledge and future perspectives. *Food Microbiology*, 42:232–243.
149. Schjørring S., Krogfelt K. 2011. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. *International Journal of Microbiology*, 2011: Article ID number 312956
150. Scientific Committee on Animal Nutrition. 1996. Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition (SCAN) on the possible risk for humans of the use of avoparcin as feed additive. Opinion expressed 21 May 1996. Office for EC publications, Luxembourg.

151. Scientific Committee on Animal Nutrition. 1998. Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition (SCAN) on the the immediate and longer-term risk to the value of streptogramins in human medicine posed by the use of virginiamycin as an animal growth promoter. 10 July 1998. Office for EC publications, Luxembourg.
152. Settanni L., Moschetti G. 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27:691–697.
153. Singer R.S., Finch R., Wegener H.C., Bywater R., Walters J., Lipsitch M. 2003. Antibiotic resistance — the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infectious Diseases*, 3:47-51.
154. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P. K., Viridi J. S. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6:1–16.
155. Službeni Glasnik RS 18/2010. 2010. Zakon o oznakama geografskog porekla.
156. Službeni Glasnik RS 33/10. 2010. Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura.
157. Stanton T. B., Humphrey S. B., Stoffregen W. C. 2011. Chlortetracycline-resistant intestinal bacteria in organically raised and feral swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:7167–7170.
158. Stokes H. W., Gillings M. R., Stokes H. W. 2011. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 35:790–819.
159. Sundsfjord A., Simonsen G.S., Haldorsen B.C., Haaheim H., Hjelmevoll S.O., Littauer P., Dahl K.H., 2004. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *APMIS: Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 112:815–837.
160. Suzzi G., Caruso M., Gardini F., Lombardi A., Vannini L., Guerzoni M.E., Andrighetto C., Lanorte M.T., 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology* 89:267–274.



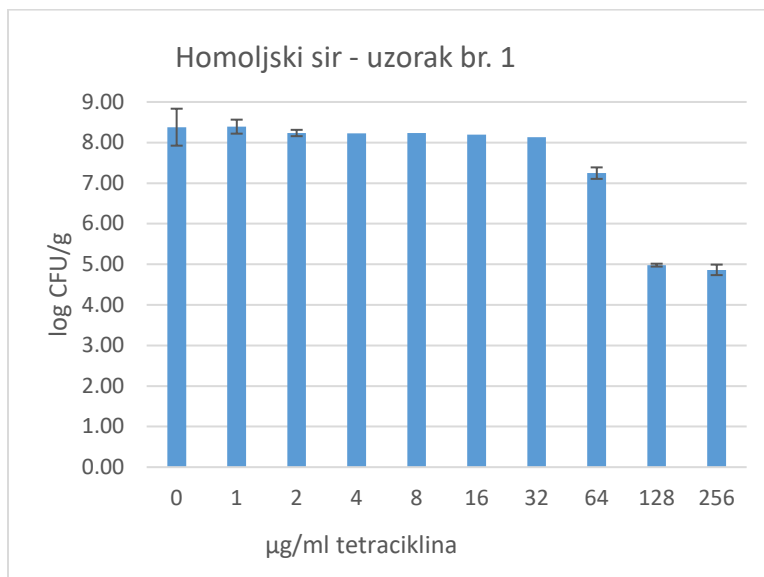
161. Temmerman R., Pot B., Huys G., Swings J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology* 81:1-10.
162. Tenorio C., Zarazaga M., Martinez C., Torres C. 2001. Bifunctional enzyme 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase-2''-O-aminoglycoside phosphotransferase in *Lactobacillus* and *Pediococcus* isolates of animal origin. *Journal of Clinical Microbiology* 39:824-825.
163. Terzic-Vidojevic A., Lozo J., Topisirovic L. 2009a. Dominant lactic acid bacteria in artisanal Pirot cheeses of different ripening period. *Genetika*, 41:341-352.
164. Terzić-Vidojević A., Mihajlović S., Uzelac G., Golić N., Fira Đ., Kojić M., Topisirović L. 2014. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal white brined Golija cows' milk cheeses. *Archives of Biological Sciences*, 66:179-192.
165. Terzic-Vidojevic A., Veljovic K., Tolinacki M., Nikolic M., Ostojic M., Topisirovic L. 2009b. Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Zlatar cheeses produced at two different geographical location. *Genetika*, 41:117-136.
166. Terzic-Vidojevic A., Vukasinovic M., Veljovic K., Ostojic M., Topisirovic L. 2007. Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlatar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 114:36-42.
167. Teuber M. 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4:493-499.
168. Teuber M., Meile L., Schwarz F. 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76:115-137.
169. Teuber M., Schwarz F., Perreten V. 2003. Molecular structure and evolution of the conjugative multiresistance plasmid pRE25 of *Enterococcus faecalis* isolated from a raw-fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 88:325-329.

170. Thaker M., Spanogiannopoulos P., Wright G. D. 2010. The tetracycline resistome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67:419–431.
171. Van Reenen C. A., Dicks L. M. T. 2011. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: What are the possibilities? A review. *Archives of Microbiology*, 193:157–168.
172. Veljovic K., Terzic-Vidojevic A., Vukasinovic M., Strahinic I., Begovic J., Lozo J., Ostojic M., Topisirovic L. 2007. Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 103:2142–2152.
173. Verdier-Metz I., Gagne G., Bornes S., Monsallier F., Veisseire P., Delbès-Paus C., Montel M. C. 2012. Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Applied and Environmental Microbiology*, 78:326–333.
174. Versalovic J., Schneider M., Bruijn F. J. de, Lupski J. R. 1994. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5:25–40.
175. Wang H. H., Manuzon M., Lehman M., Wan K., Luo H., Wittum T. E., Yousef A., Bakaletz L. O. 2006. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 254:226–231.
176. Wang H., McEntire J. C., Zhang L., Li X., Doyle M. 2012. The transfer of antibiotic resistance from food to humans: facts, implications and future directions. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 31:249–60.
177. Wang H.H., 2009, Commensal bacteria, microbial ecosystems and horizontal gene transmission: adjusting our focus for strategie breakthroughs against antibiotic resistance. In: Jaykus L., Wnag H.H., Schleisiner L.S. (Eds.). *Foodborne microbes: shaping the food ecosystems*. ASM Press, Washingotn, DC, 267-281.
178. Wegener H. C. 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology*, 6:439–445.
179. Welthagen J.J., Viljoen B.C. 1997. Comparison of ten media for the enumeration of yeasts in dairy products. *Food Research International*, 30:207-211.

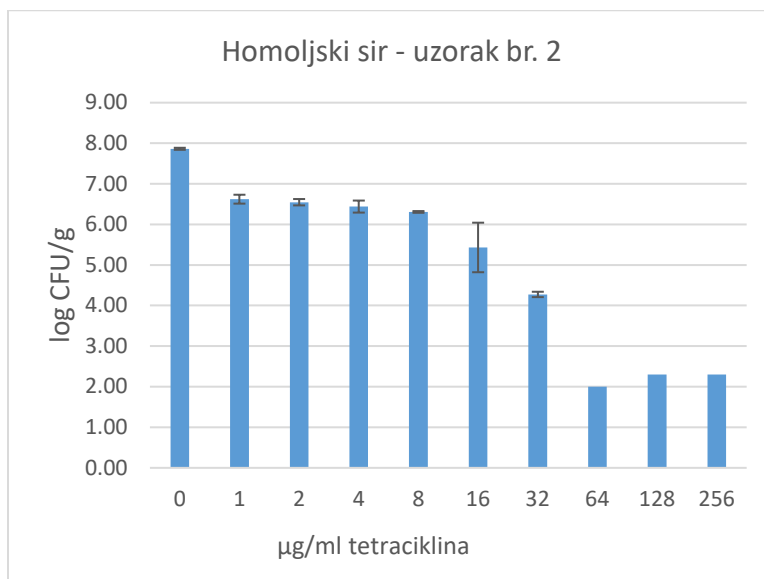
180. Wilcks A., Andersen S.R., Licht T.R. 2005. Characterization of transferable tetracycline resistance genes in *Enterococcus faecalis* isolated from raw food. FEMS Microbiology Letters, 243(1):15-19.
181. Witte W. 2000. Selective pressure by antibiotic use in livestock. International Journal of Antimicrobial Agents, 1:19-24.
182. Woodford N., Sundsfjord A., 2005. Molecular detection of antibiotic resistance: when and where? Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56:259–261.
183. Wouters J. T. M., Ayad E. H. E., Hugenholtz J., Smit G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. International Dairy Journal, 12:91–109.
184. Wozniak R. A. F., Waldor M. K. 2010. Integrative and conjugative elements: Mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. Nature Reviews Microbiology, 8:552–563.
185. Wright G.D. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. Nature Reviews Microbiology, 5(3): 175–186.
186. Zavod za intelektualnu svojinu Republike Srbije <http://www.zis.gov.rs/prava-is/oznake-geografskog-porekla/spisak-ogp.33.html>,
187. Zhou J.S., Pillidge C.J., Gopal P.K., Gill H.S. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. International Journal of Food Microbiology, 98:211–217.
188. Zhou N., Zhang J. X., Fan M. T., Wang J., Guo G., Wei X. Y. 2012. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Chinese yogurts. Journal of Dairy Science, 95: 4775–4783.
189. Zycka-Krzesinska J., Boguslawska J., Aleksandrak-Piekarczyk T., Jopek J., Bardowski J. K. 2015. Identification and characterization of tetracycline resistance in *Lactococcus lactis* isolated from Polish raw milk and fermented artisanal products. International Journal of Food Microbiology, 211:134–141.

## 9. PRILOG

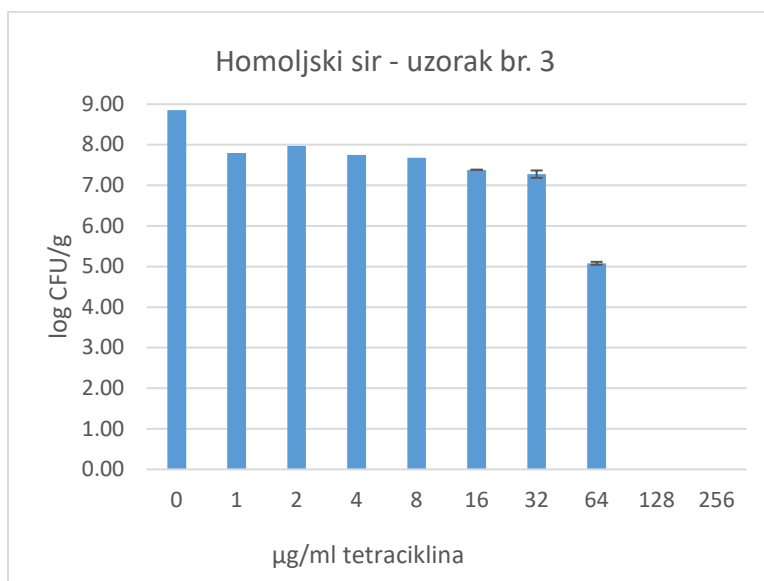
## Homoljski sir



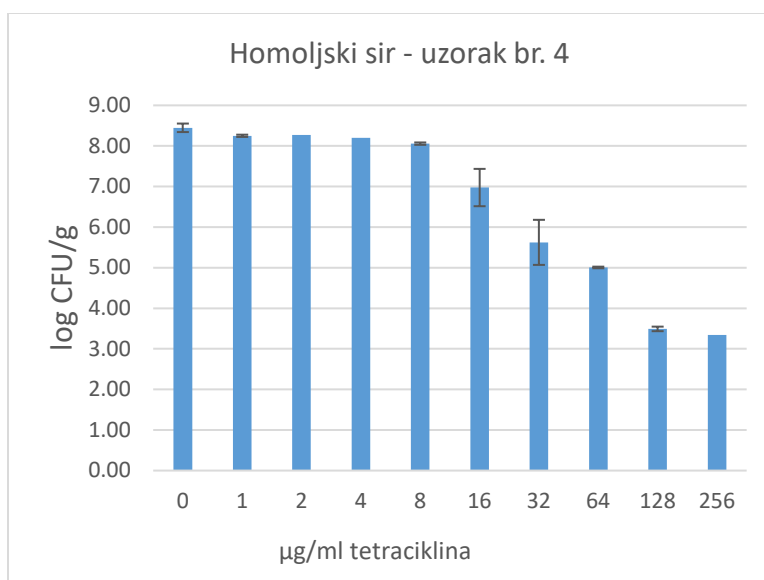
**Grafikon 1** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 1



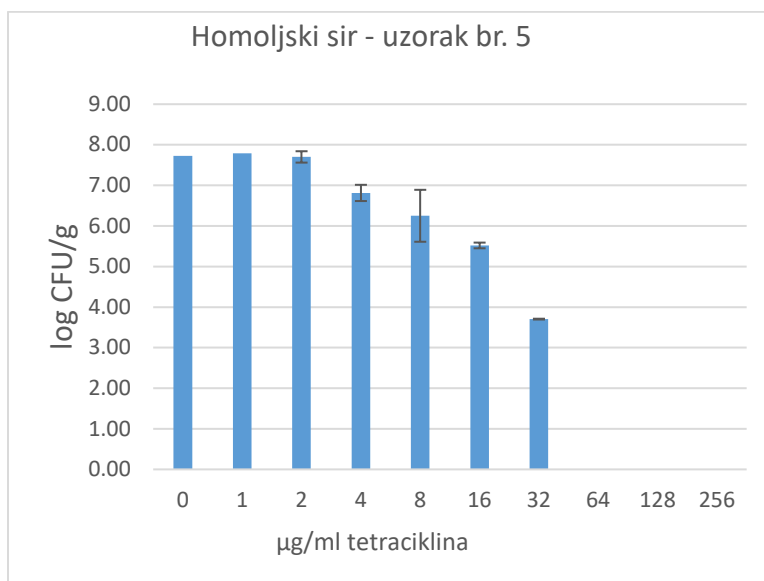
**Grafikon 2** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 2



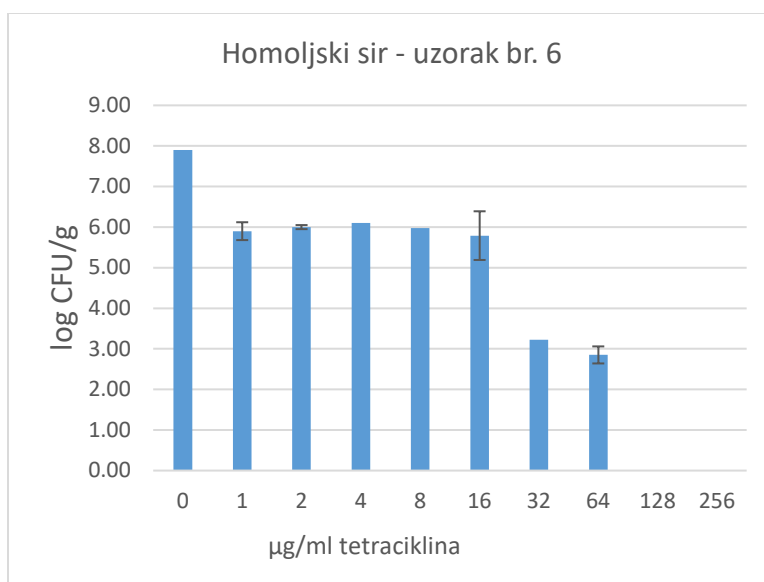
**Grafikon 3** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 3



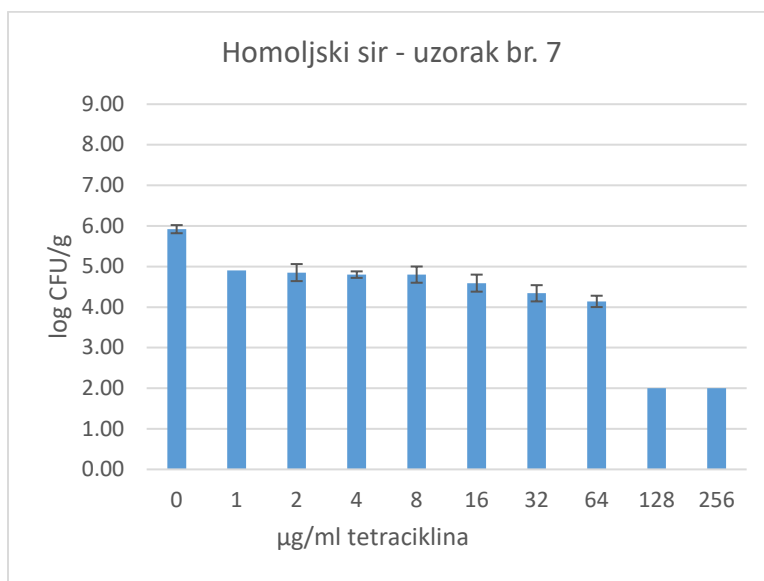
**Grafikon 4** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 4



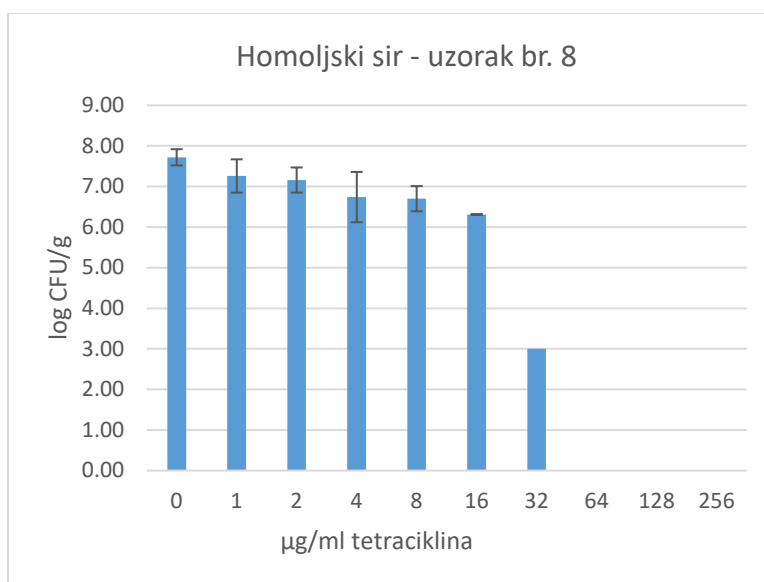
**Grafikon 5** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 5



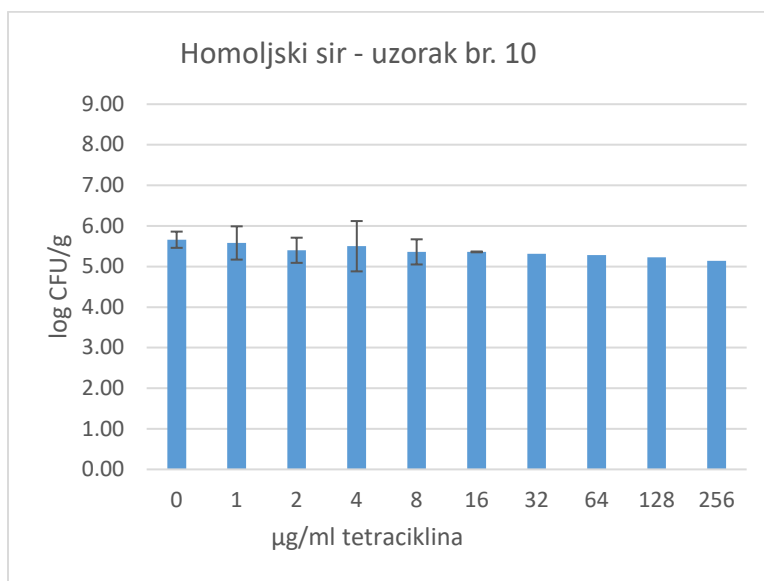
**Grafikon 6** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 6



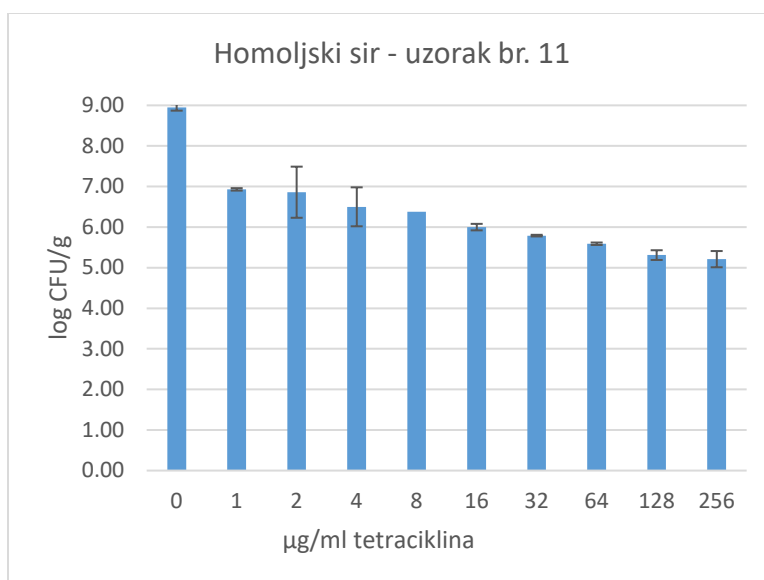
**Grafikon 7** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 7



**Grafikon 8** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 8

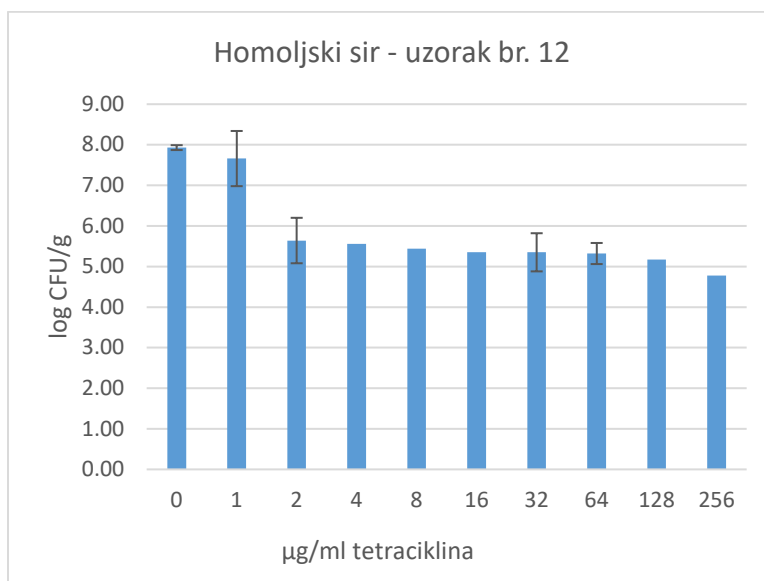


**Grafikon 9** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 10

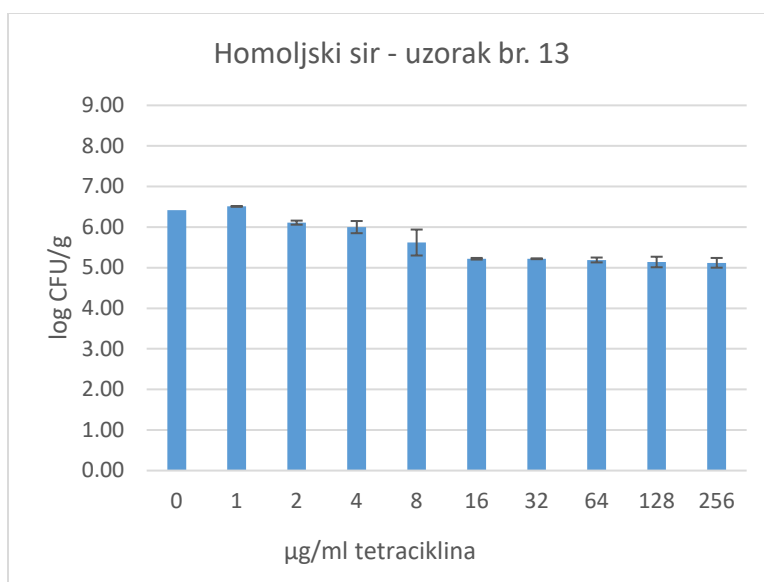


**Grafikon 10** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 11

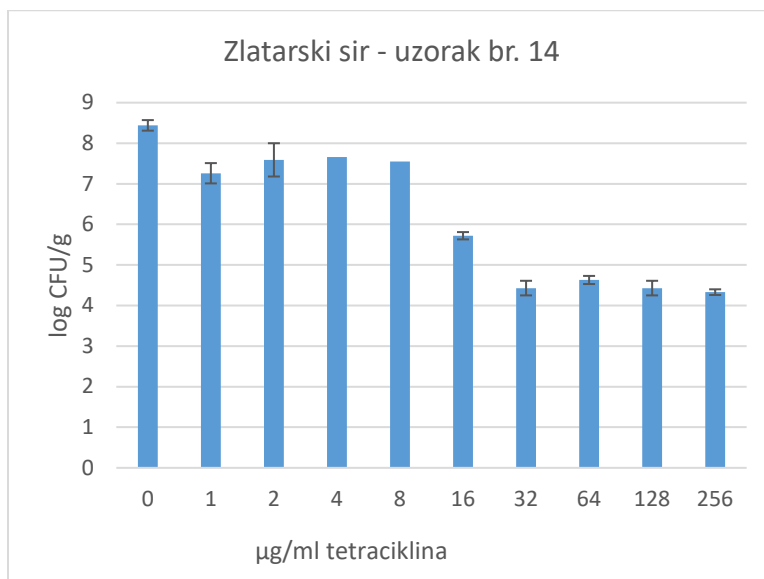




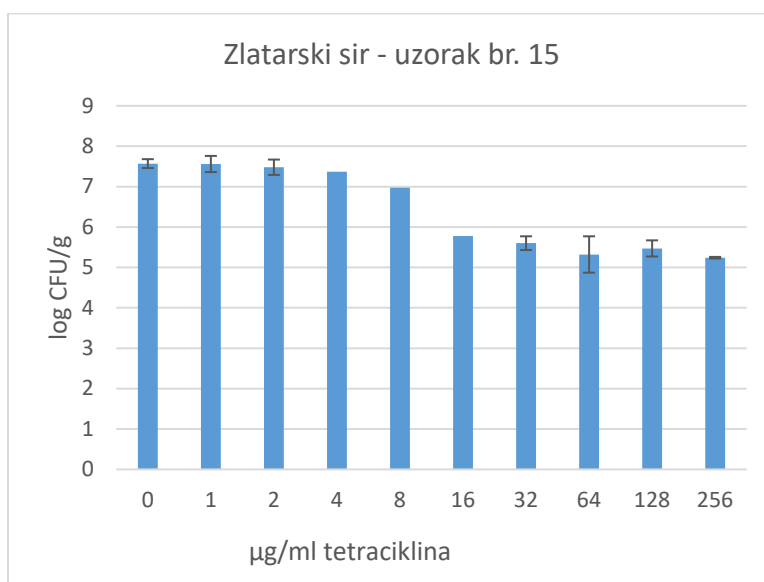
**Grafikon 11** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 12



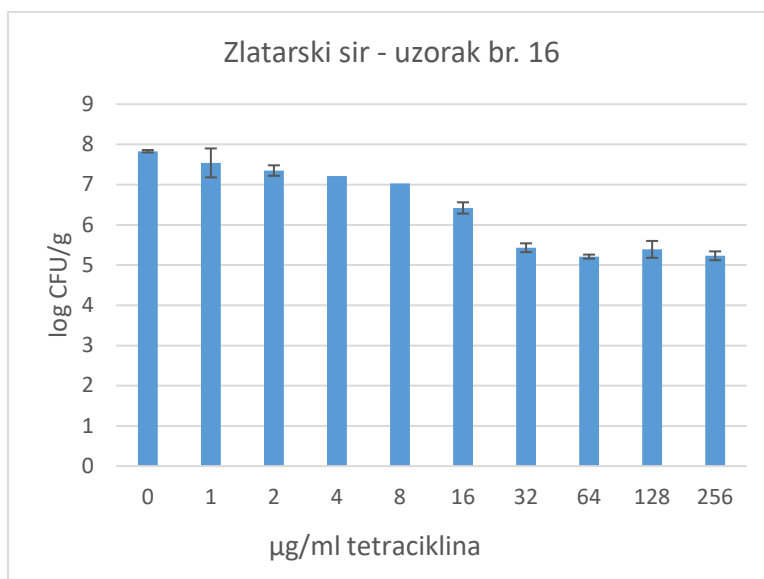
**Grafikon 12** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 13

**Zlatarski sir**

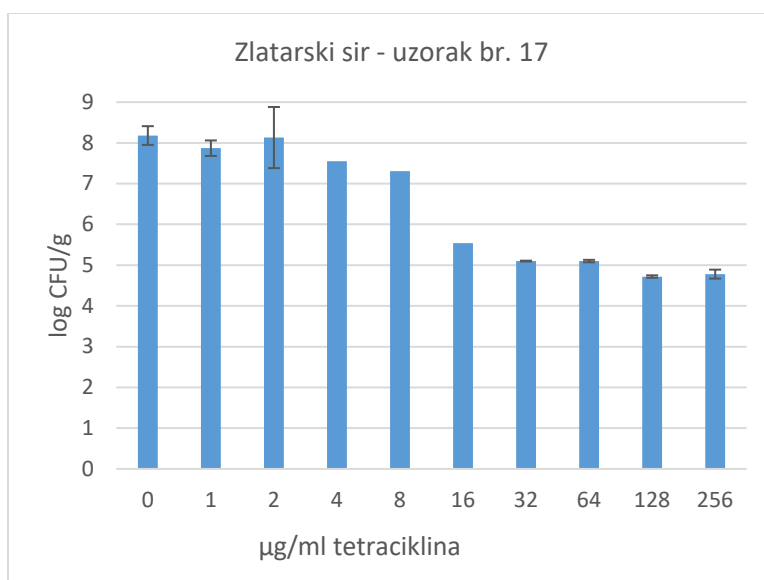
**Grafikon 13** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 14



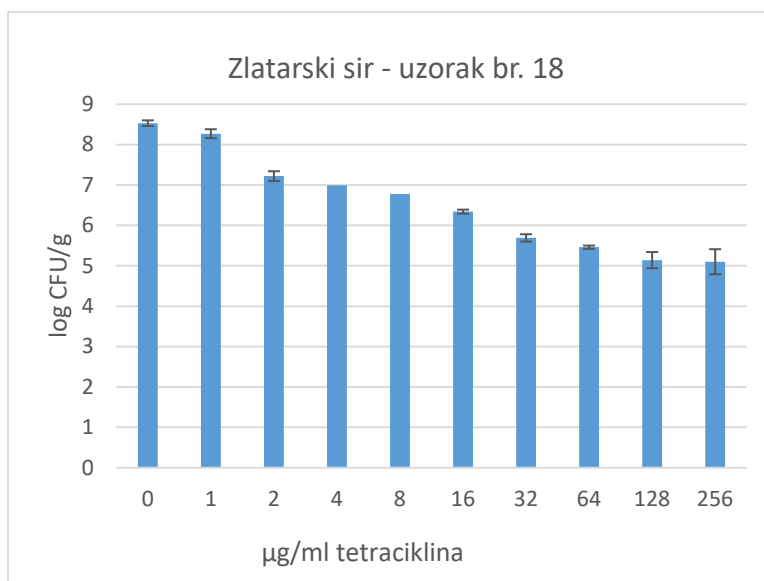
**Grafikon 14** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 15



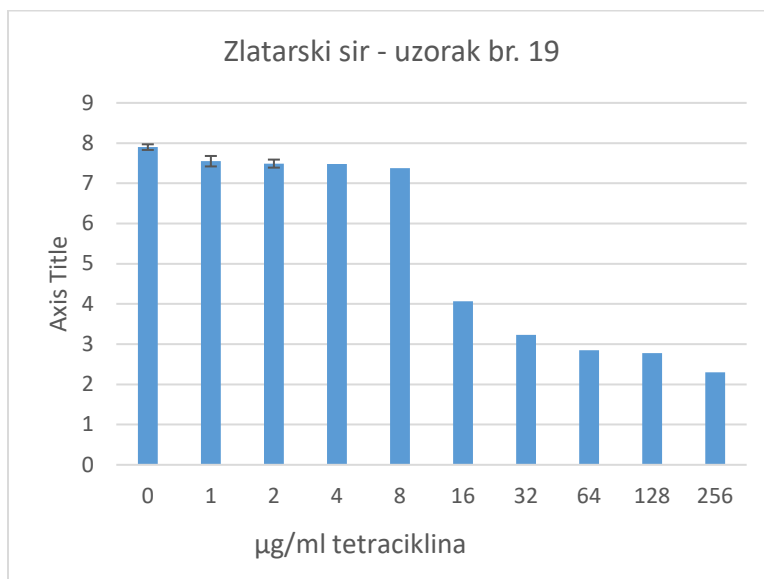
**Grafikon 15** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 16



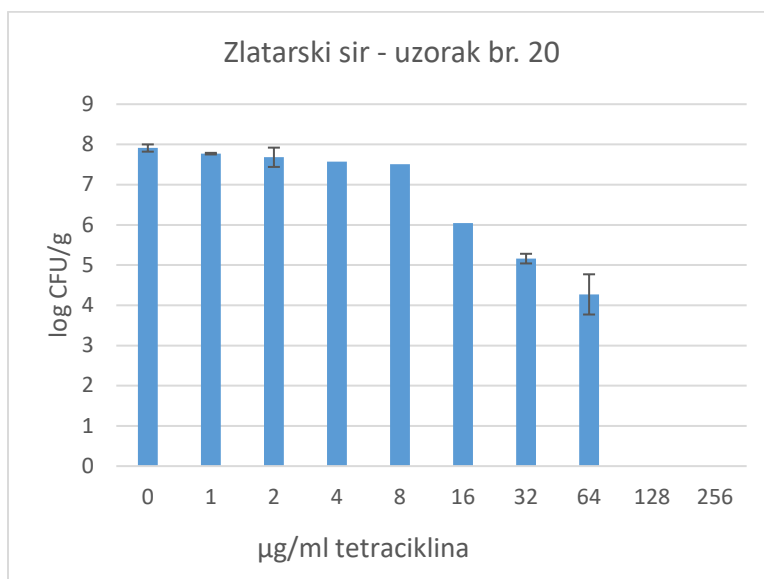
**Grafikon 16** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 17



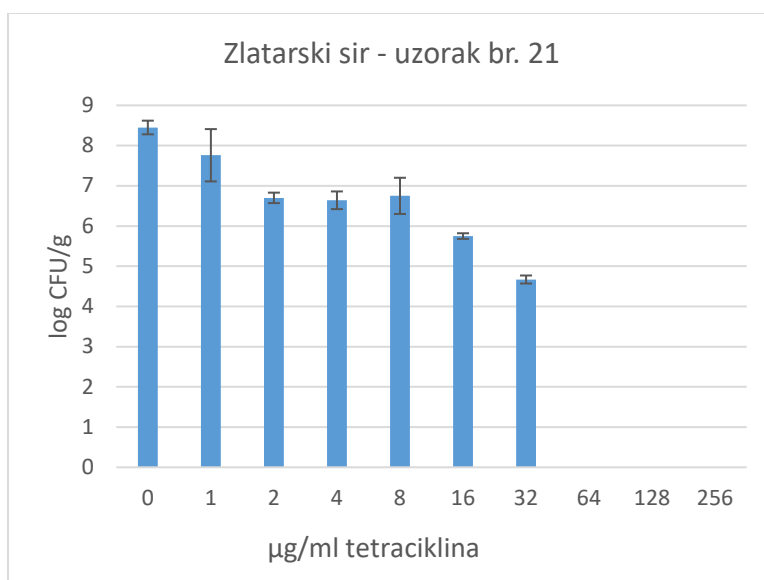
**Grafikon 17** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 18



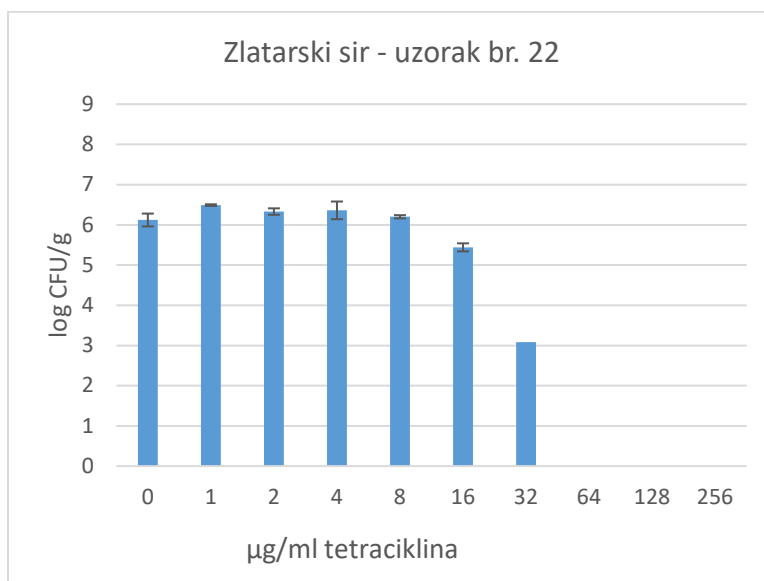
**Grafikon 18** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 19



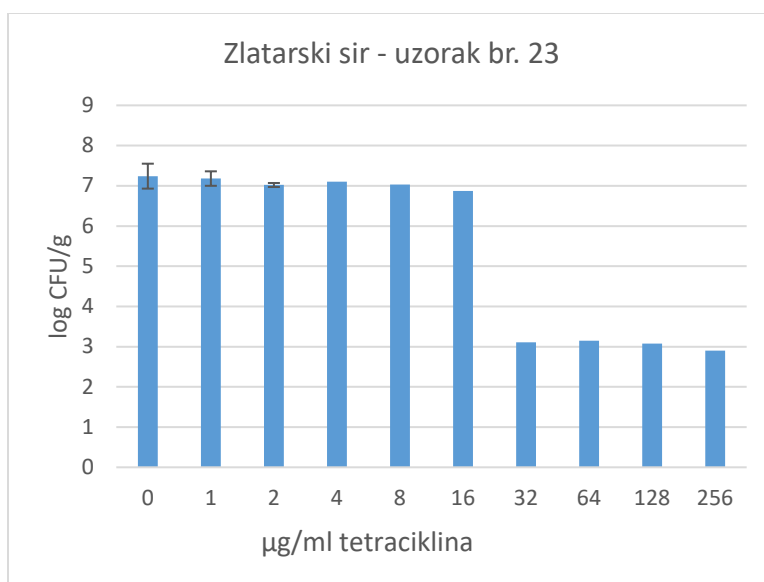
**Grafikon 19** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 20



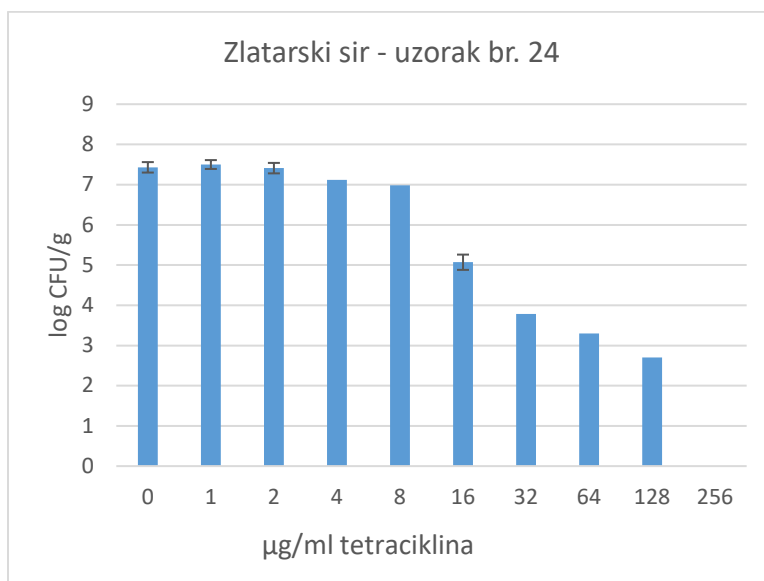
**Grafikon 20** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 21



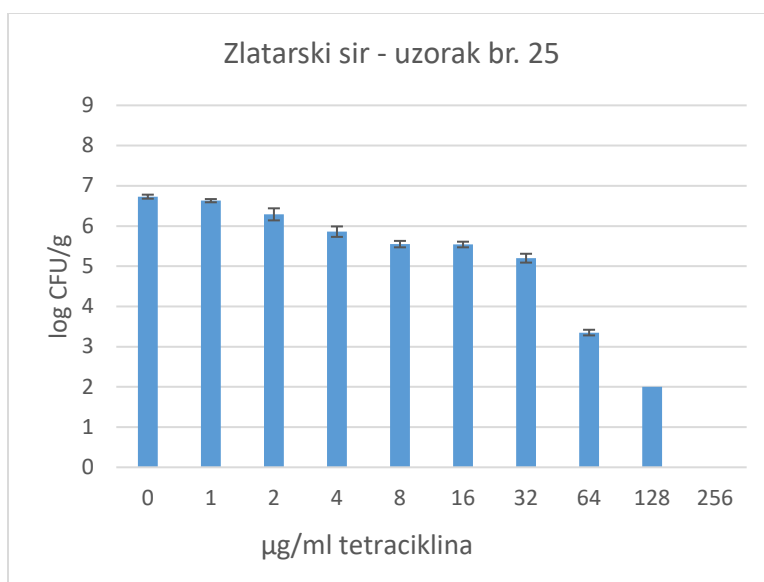
**Grafikon 21** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 22



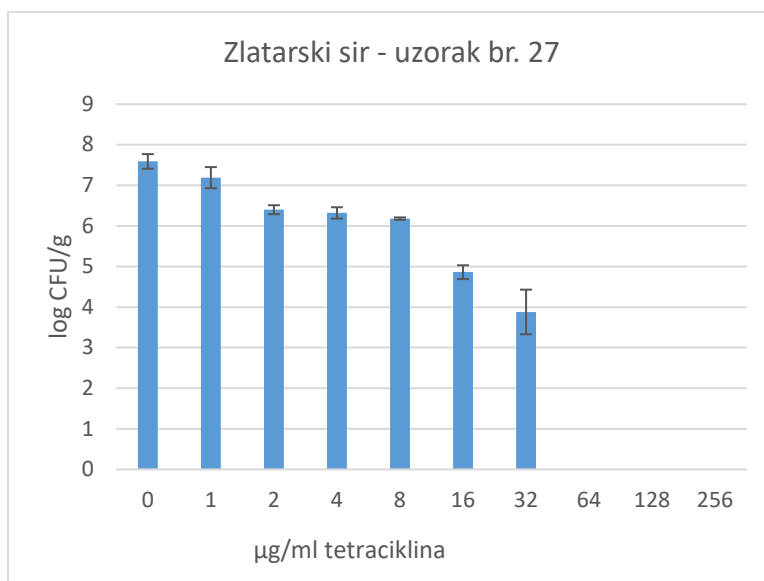
**Grafikon 22** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 23



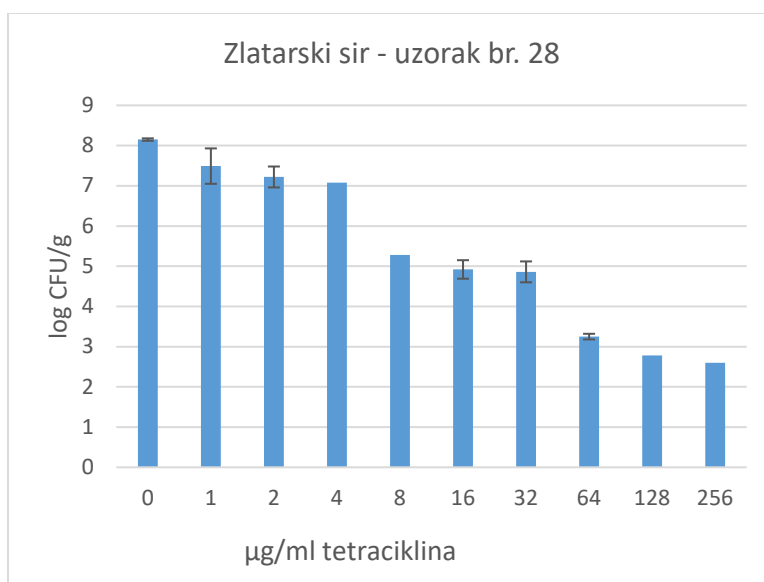
**Grafikon 23** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 24



**Grafikon 24** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 25

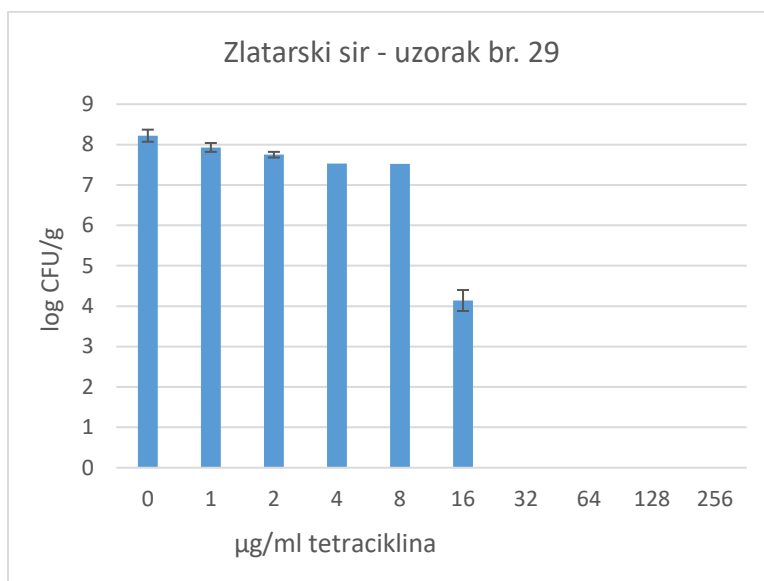


**Grafikon 25** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 27

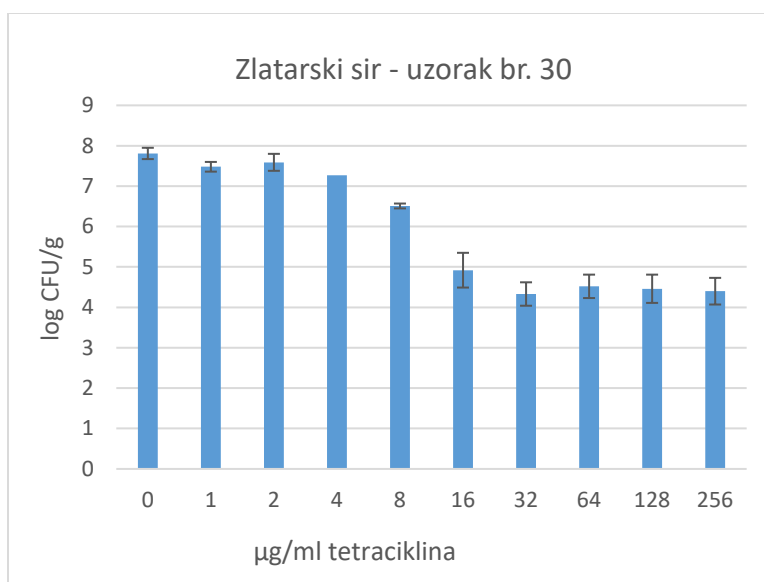


**Grafikon 26** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 28

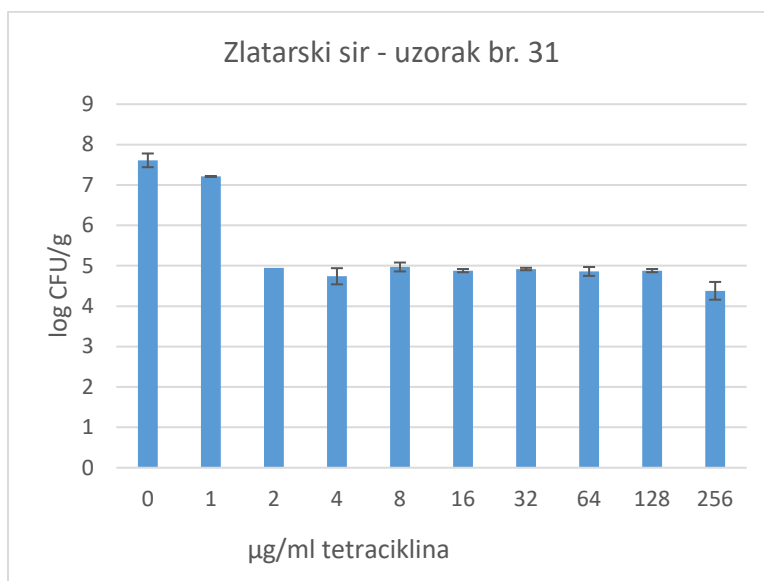




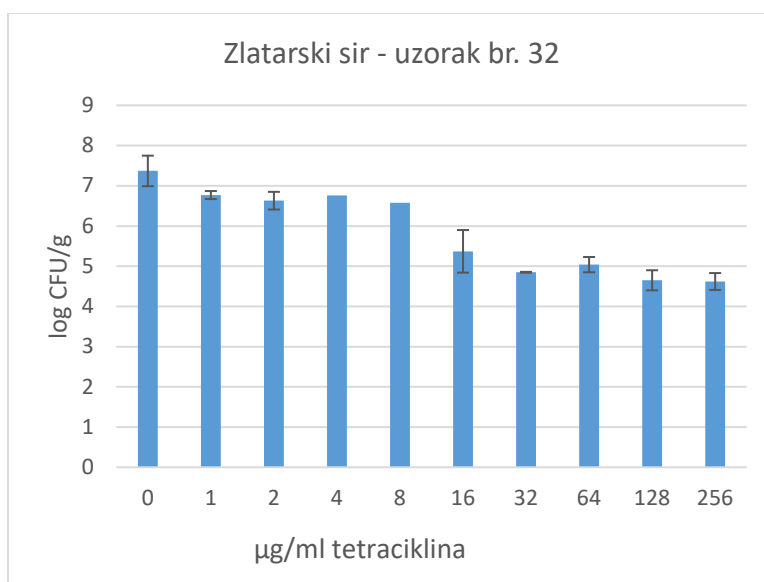
**Grafikon 27** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 29



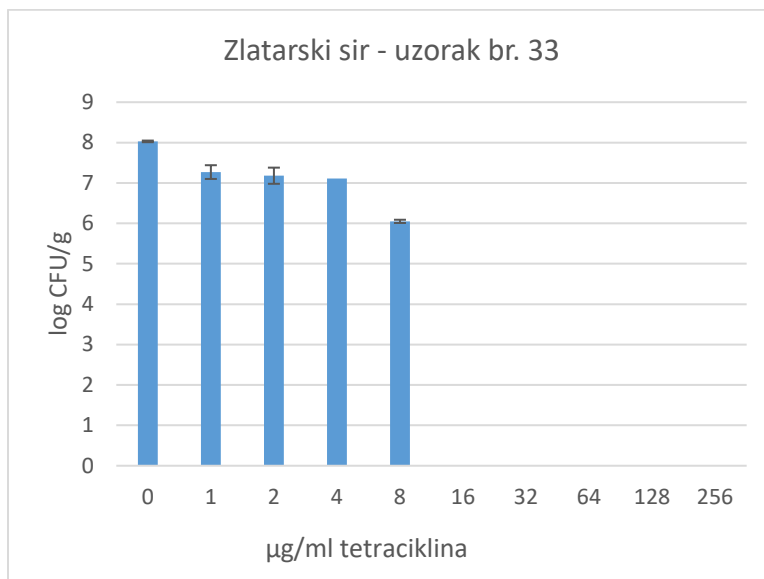
**Grafikon 28** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 30



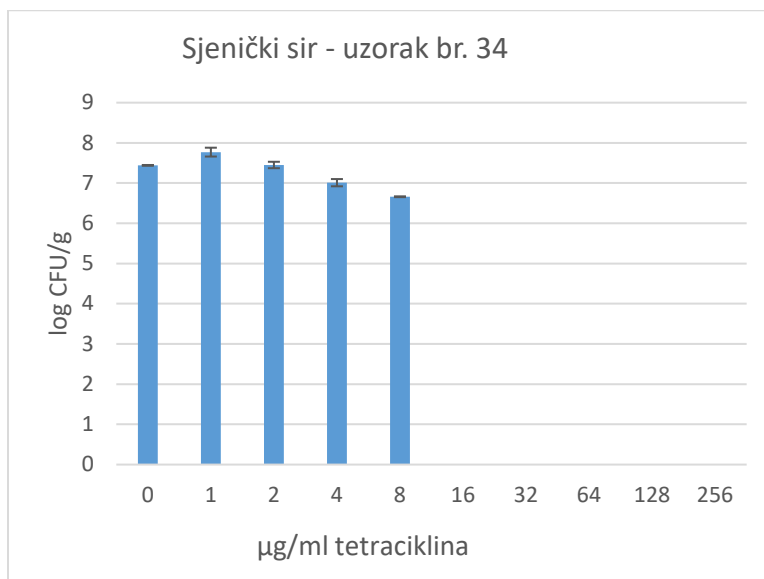
**Grafikon 29** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 31



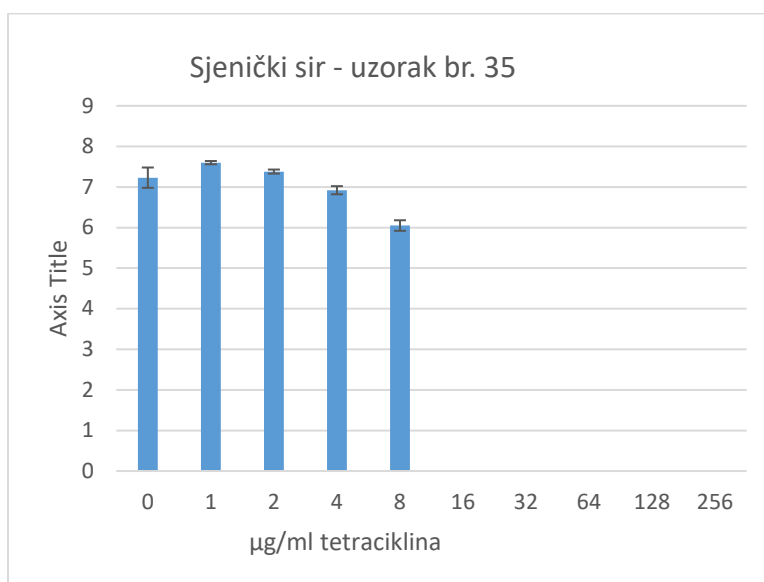
**Grafikon 30** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 33



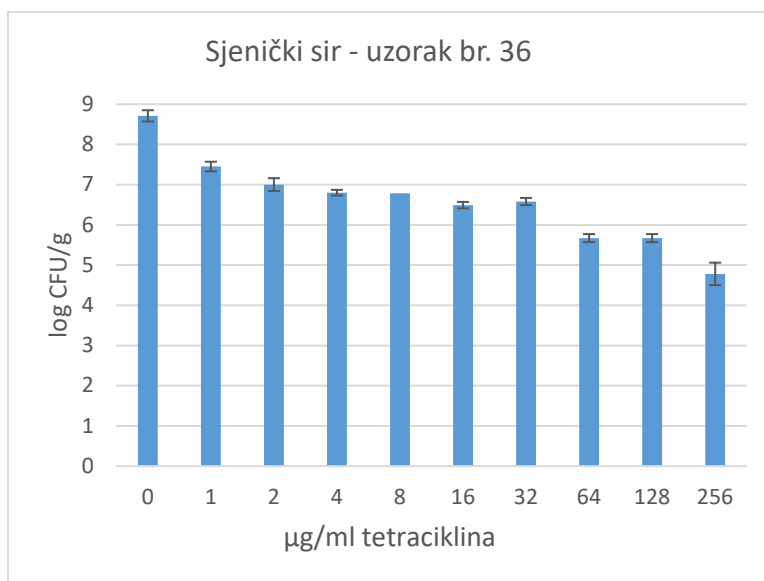
**Grafikon 31** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 33

**Sjenički sir**

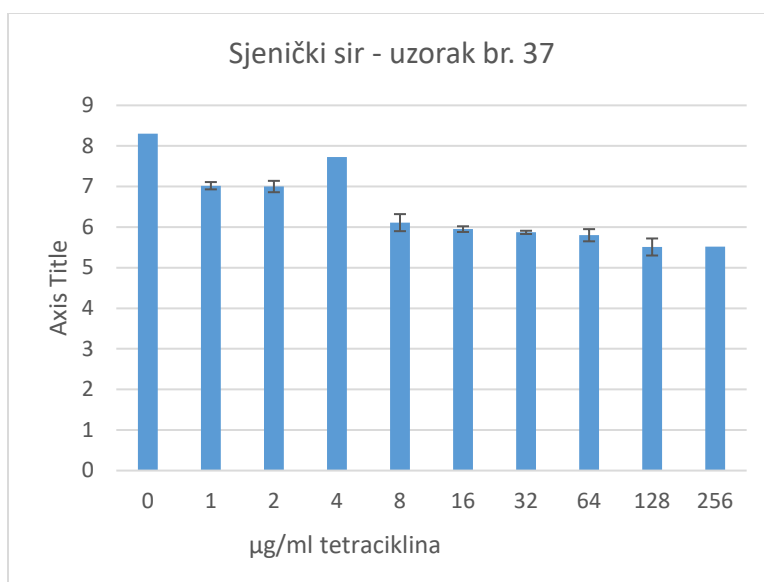
**Grafikon 32** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 34



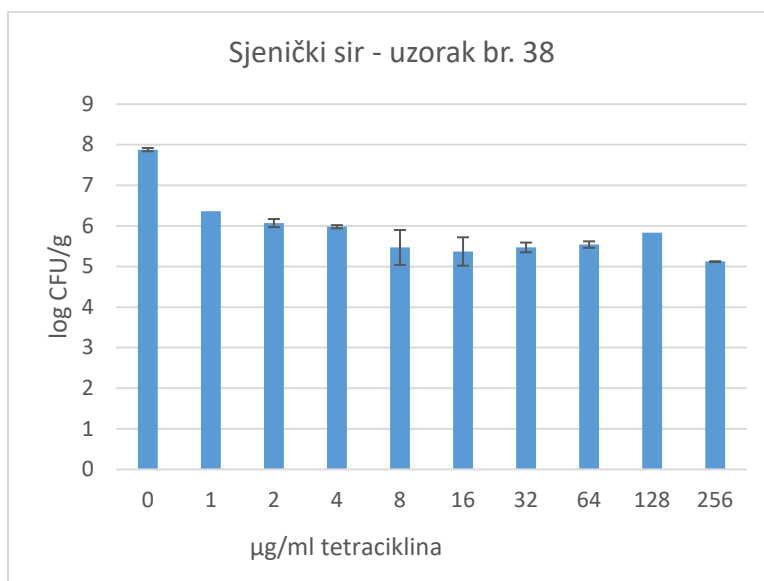
**Grafikon 33** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 35



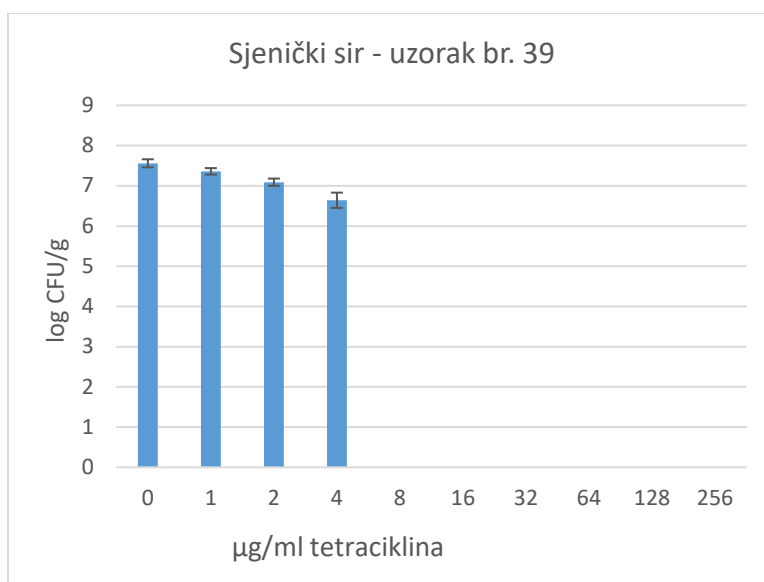
**Grafikon 34** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 36



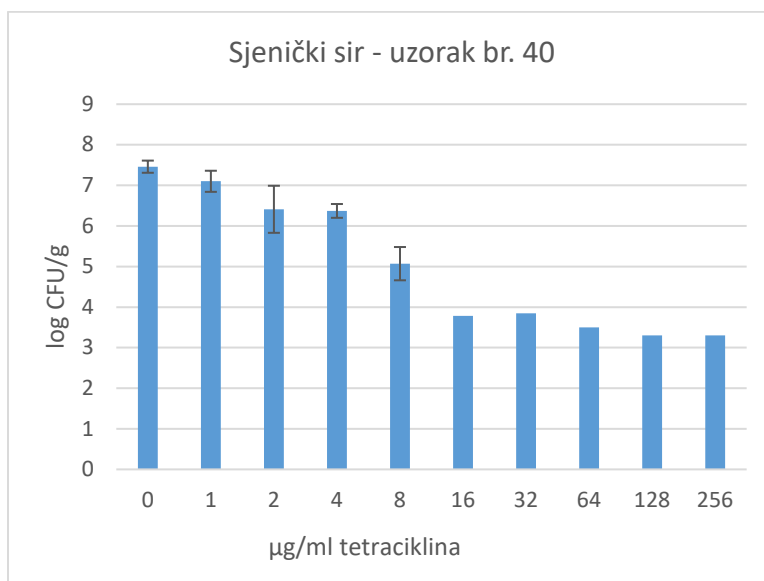
**Grafikon 35** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 37



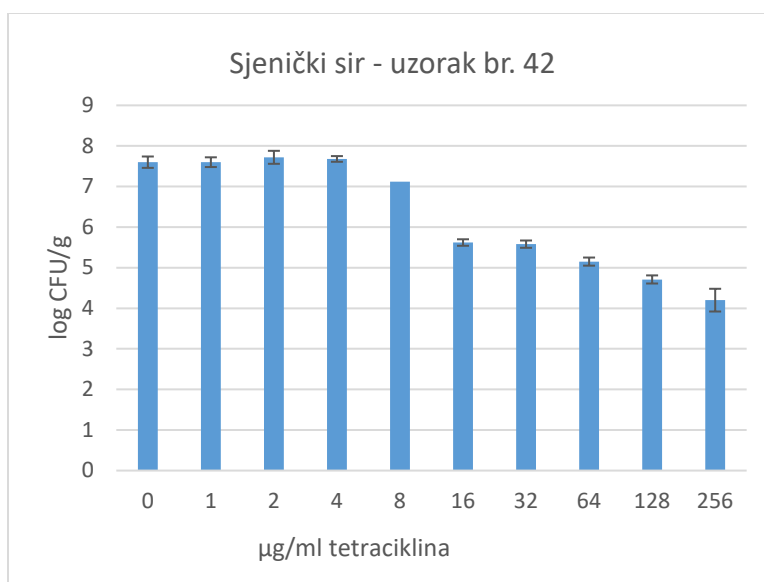
**Grafikon 36** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 38



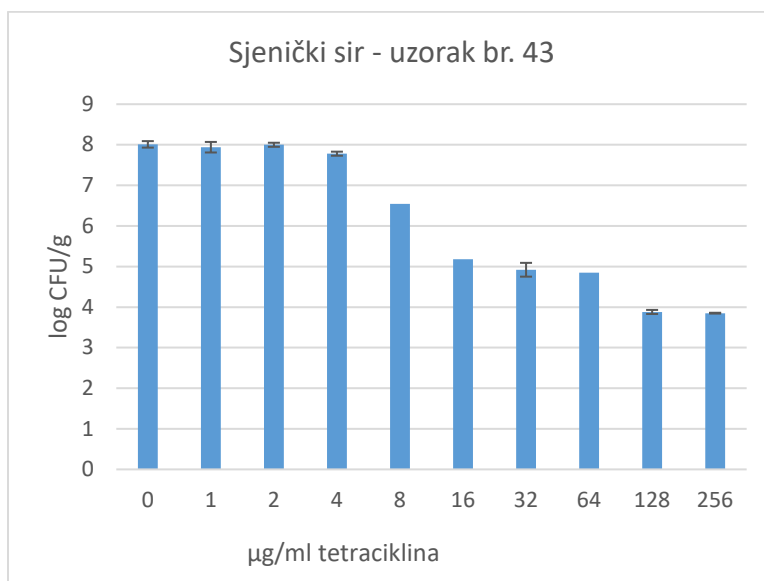
**Grafikon 37** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 39



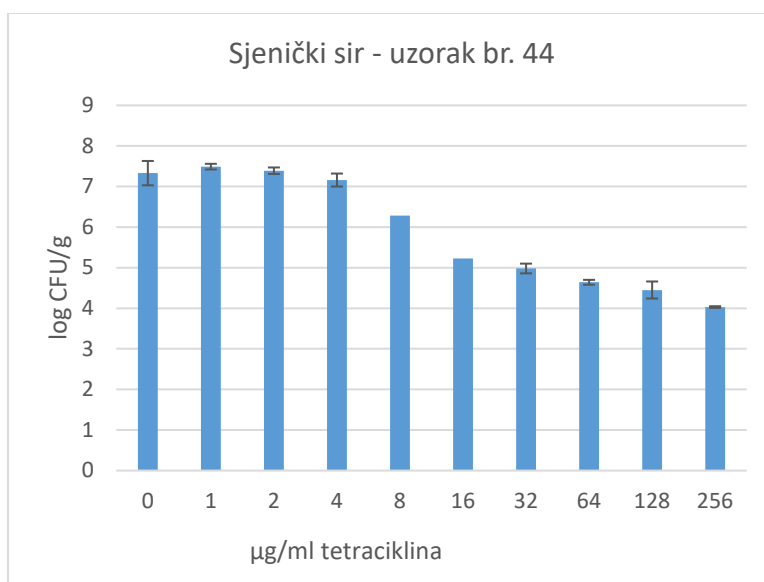
**Grafikon 38** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 40



**Grafikon 39** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 42

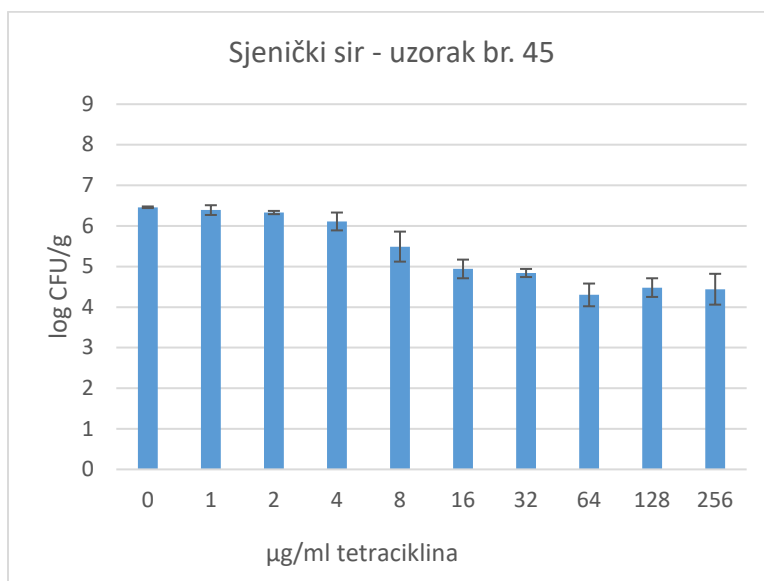


**Grafikon 40** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 43

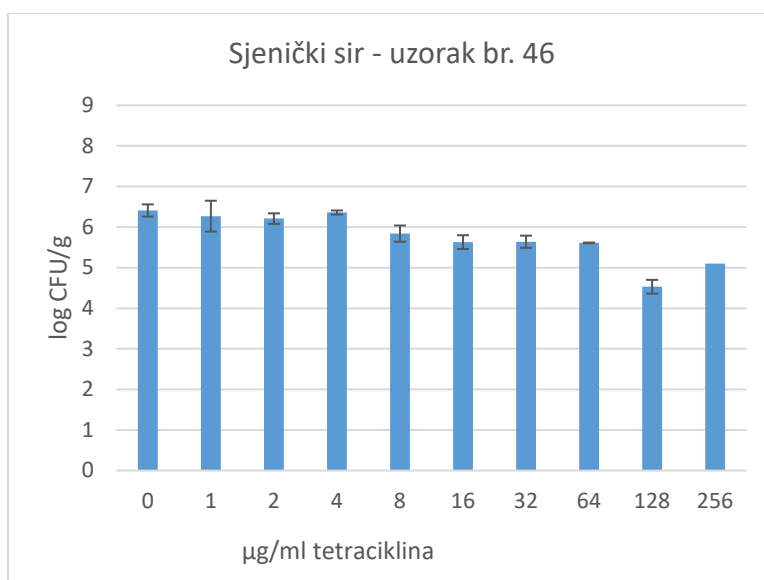


**Grafikon 41** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 44

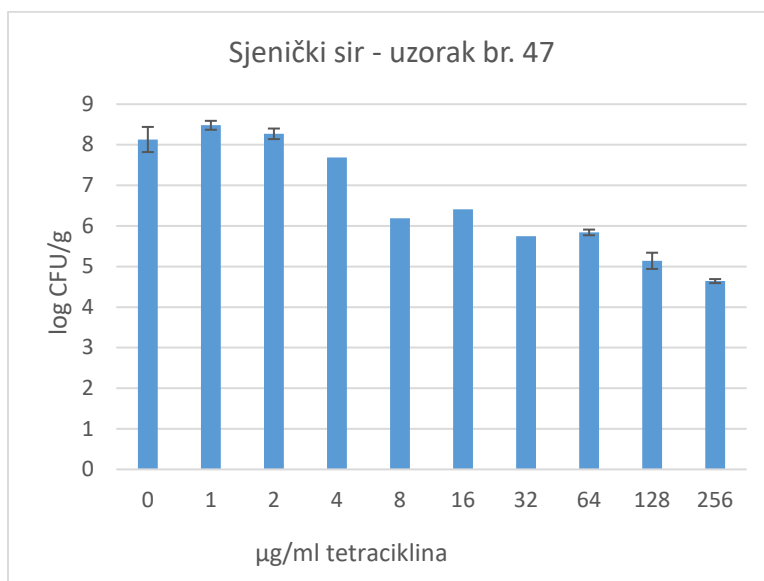




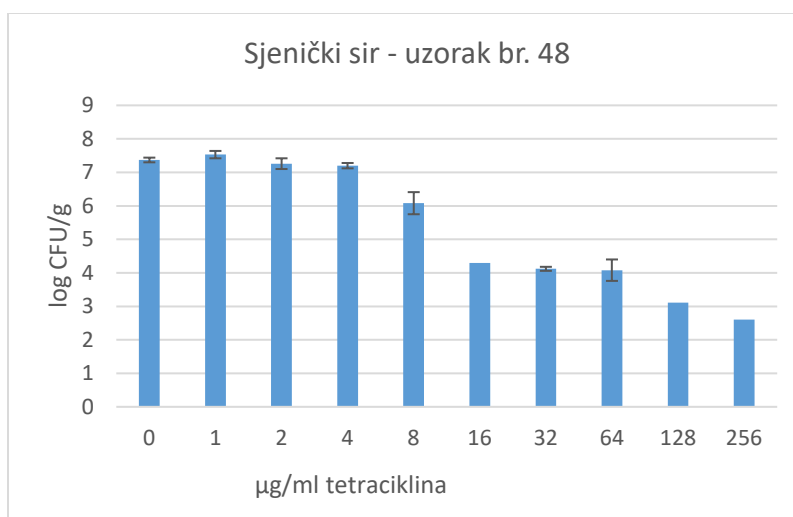
**Grafikon 42** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 39



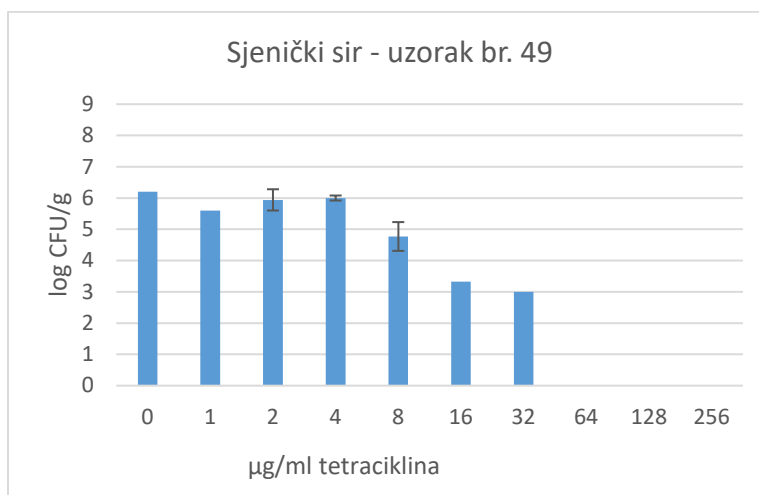
**Grafikon 43** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 47



**Grafikon 44** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 47



**Grafikon 45** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 48



**Grafikon 46** – Broj BMK na MRS-S agaru bez tetraciklina i sa dodatkom različitih koncentracija tetraciklina – uzorak broj 49

## BIOGRAFIJA

Tijana Ledina je rođena 05.01.1987. u Sokobanji gde je i završila osnovnu školu i gimnaziju. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2005/2006. godine. Tokom studija bila je stipendista Fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka Republike Srbije. Diplomirala je 06.12.2012. godine sa prosečnom ocenom 9,02 i time stekla zvanje doktora veterinarske medicine. Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine upisala je školske 2013/2014. godine. Položila je sve ispite u predviđenom roku sa prosečnom ocenom 9,73.

Kao asistent na užoj naučnoj oblasti Higijena i tehnologija mleka na Katedri za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla zaposlena je od 01.10.2014. Uključena je u izvođenje praktične nastave iz predmeta Higijena i tehnologija mleka, Osnove higijene namirnica animalnog porekla i Kontrola namirnica animalnog porekla.

Učesnik je na dva nacionalna projekta: projekat br. 46009 „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu“ i projekat br. 46010 „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti.“

Do sada je kao autor ili koautor objavila 4 rada u časopisima međunarodnog značaja (M22 i M23).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Тијана Ледина

број уписа 15/11

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Резистенција на тетрациклин бактерија млечне киселине изолованих из традиционалних сирева Србије

- 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.

У Београду, 04.04.2018.

Потпис докторанда

Тијана Ледина

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Тијана Ледина**

Број уписа **15/11**

Студијски програм **Докторске академске студије**

Наслов рада **Резистенција на тетрациклин бактерија млечне киселине  
изолованих из традиционалних сирева Србије**

Ментор **др Снежана Булајић, ванредни професор**

Потписани **Тијана Ледина**

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, 04.04.2018.



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**Резистенција на тетрациклин бактерија млечне киселине изолованих из традиционалних сирева Србије**

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).

У Београду, 04.04.2018.

Потпис докторанда

