

SNEŽANA BULAJIĆ
ZORA MIJAČEVIĆ

Fakultet veterinarske medicine,
Beograd

637.3:637.06:579.86

PROFIL REZISTENCIJE ENTEROKOKA IZOLOVANIH IZ SIREVA

Enterokoke su normalni stanovnici gastrointestinalnog trakta ljudi i životinja, te se redovno mogu izolovati iz namirnica animalnog porekla, kao i pojedinih proizvoda, posebno sireva i fermentisanih kobasica. U novije vreme, aktuelizira se značaj prisustva enterokoka u namirnicama usled prepoznavanja određenih faktora virulencije u njihovom biološkom entitetu, kao i ispoljavanja rezistencije na mnoge antibiotike. Fenomen antibiotske rezistencije se potencira sposobnošću enterokoka da izmenjuju determinante rezistencije putem prenosivih elemenata, plazmida i transpozoma, ne samo unutar svoje vrste, već i da ih predaju daleko patogenijim vrstama. Naučna javnost pokušava da uspostavi kriterijume na osnovu kojih će se sa sigurnošću moći proceniti bezbednost sojeva enterokoka primenljivih kao starter kulture ili probiotici, sa globalnim ciljem zaštite zdravlja potrošača. Kod enterokoka izolovanih iz različitih vrsta sireva, primenom disk-difuzione metode na Muller-Hinton agaru, utvrđen je profil rezistencije/osetljivosti na odabrane antibiotike.

Ključne reči: enterokoke • rezistencija na antibiotike

UVOD

Bakterije roda *Enterococcus* (prethodno „fekalna” ili Lancefield-ova grupa D streptokoka) su ubikvitarni mikro-

organizmi. Dominantni habitat enterokoka predstavlja gastrointestinalni trakt ljudi i životinja. Usled njihove tolerancije na visoke temperature i mogućnosti preživljavanja pod nepovoljnim uslovima sredine, enterokoke mogu kolonizovati različite niše. Dosada su se veoma često razmatrali kao indikatori fekalne kontaminacije namirnica, odnosno pokazatelji sanitarnih uslova proizvodnje. Enterokoke se u velikom broju uobičajeno javljaju u povrću, biljnom materijalu i namirnicama, posebno animalnog porekla, kao što su fermentisane kobasice i sirevi. Poznato je da enterokoke imaju ulogu u razvoju organoleptičkih karakteristika tokom procesa zrenja sireva, a koriste se i kao komponente starter kultura u proizvodnji sira (1). Pored toga, pojedine enterokoke izolovane iz namirnica poseduju brojne korisne biotehnoške karakteristike (produkcija bakteriocina, probiotska svojstva), čime se opravdava njihova primena u proizvodnji fermentisanih proizvoda.

Tokom poslednje dve dekade, enterokoke, na koje se prethodno gledalo kao na organizme sa minimalnim kliničkim značajem, javljaju se kao važni patogeni u bolničkim sredinama kod imunokompromitovanih osoba i u odeljenjima intenzivne njege. Virulentna svojstva enterokoka uključuju adherenciju na tkivo domaćina, invazivnost i formiranje apscesa, rezistenciju na i modulaciju odbrambenih mehanizama domaćina, sekreciju citolizina i drugih toksičnih produkata (2,3,4). Nedavno molekularno pretraživanje determinanti virulencije enterokoka pokazuju da klinički

izolati *E. faecalis* poseduju više determinanti virulencije nego izolati iz namirnica, koji opet u odnosu na starter sojeve imaju više faktora virulencije. Za mnoge od ovih svojstava virulencije, kao što su hemolizin-citolizin produkcija, sposobnost adhezije i antibiotska rezistencija, dokazano je da su prenosive putem mehanizama transfera gena (5,6,7,8). Takođe je demonstriran mehanizam transkonjugacije pomoću kojeg starter sojevi stiču determinante rezistencije od kliničkih sojeva (5).

Virulencija enterokoka je u velikoj meri osnažena njihovom čestom rezistencijom na uobičajeno primenjive antibiotike. Rezistencija na antibiotike, intrinzična ili stečena, čini enterokoke efektivnim oportunistima u slučaju nosokomijalnih infekcija.

Enterokoke pokazuju intrinzičnu rezistenciju na cefalosporine, linkozamide, mnoge β -laktame i aminoglikozide (9,10,11,12). Pored ove konstitutivne rezistencije, enterokoke imaju stečene genetske determinante na osnovu kojih ostvaruju rezistenciju na sve dosada poznate klase antibiotika, uključujući hloramfenikol, tetracikline i glikopeptide. Najveći rizik koji proizlazi iz stečene rezistencije jeste taj što je ona velikim delom prenosive prirode. Transfer gena je posredovan feromonima, ili se ostvaruje putem konjugativnih (često multirezistentnih) plazmida ili transpozoma. Takva izmena genetskog materijala se odigrava ne samo između enterokoka, već je transfer gena moguć i na daleko virulentnije patogene, kao što je *Staphylococcus aureus* (9,13). Ekstremno visok nivo rezistencije na antibiotike pri-

Adresa autora:
Snežana Bulajić, Fakultet veterinarske medicine,
Bulevar JA 18, 11000 Beograd

mećen kod enterokoka, kao i njihova široka zastupljenost u sirovoj hrani, predstavljaju ključne elemente na osnovu kojih se objašnjava čest nalaz antibiotički-rezistentnih enterokoka (antibiotic-resistant enterococci-ARE) u fermentisanim i nefermentisanim namirnicama. ARE su utvrđene u proizvodima od mesa, proizvodima od mleka, „ready-to-eat foods”, pa čak i među sojevima enterokoka koji se predlažu kao probiotici (14,15,16,17, 18,19). Ispitivanjem evropskih sireva utvrđene su enterokoke, prvenstveno *E. faecalis* i *E. faecium*, rezistentne u različitim nivoima na penicilin, tetraciklin, hloramfenikol, eritromicin, gentamicin, linkomicin, rifampicin, fusidoksičnu kiselinu i vankomicin, ujedno je primećena i multipla rezistencija na antibiotike (14). Sojevi sa visokim nivoom rezistencije na kanamicin i gentamicin su nedavno izolovani iz francuskih sireva proizvedenih od sirovog mleka i hospitalizovanih pacijenata (20).

Postojeći podaci o rezistenciji na antibiotike među enterokokama izolovanim iz namirnica, otvaraju pitanje njihovog ulaska u lanac hrane i time potencijalnu ugroženost ljudi. Postoji jasan i snažan epidemiološki dokaz o vezi između korišćenja antibiotika u humanoj medicini i stočarskoj proizvodnji, i pojave, širenja i perzistencije rezistentnih sojeva u namirnicama animalnog porekla (21, 22). Pored toga, namirnice koje su opterećene rezistentnim sojevima enterokoka mogu služiti kao rezervoar antibiotske rezistencije.

MATERIJAL I METODE

Mikrobiološka analiza

Materijal ispitivanja su predstavljali uzorci svežih i zrelih sireva, dobijenih postupkom kisele i slatke koagulacije iz sirovog i kuvanog mleka. Deset grama uzorka sira je homogenizovano dodatkom 90 ml 2% rastvora Na-citrata, a serijska decimalna razblaženja napravljena sa sterilnim fiziološkim rastvorom. 0,1 ml odgovarajućeg razblaženja je zasejano na površinu kanamicin esku-lin azid (KAA) agara i inkubisano pri 42°C/24h.

Izolacija i identifikacija sojeva

Po završenoj inkubaciji, selektovane su kolonije specifične morfologije i prečišćene dvostrukom subkultivacijom na KAA agaru. Nakon mikroskopskog

ispitivanja, bojenja po Gram-u i izvođenja katalaza testa, fenotipizacija sojeva je sprovedena primenom sledećih testova: rast pri 10 i 45°C, rast pri pH 9,6, rast u 6,5% NaCl bujonu, u 0,1% metilen plavom mleku, rezistencija pri 60°C/ 15 i 30min, Voges Proskauer reakcija i fermentacija riboze.

Ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva enterokoka izvršeno je primenom agar disk difuzione procedure (BD BBL Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility Test Discs, Becton Dickinson Company), prema instrukcijama proizvođača.

REZULTATI I DISKUSIJA

Utvrđeni broj enterokoka u ispitivanim uzorcima sira zavisio je od primenjenog tehnološkog procesa. Broj enterokoka u svežim, slatko koagulišućim sirevima dobijenim iz sirovog mleka kretao se $8,0 \times 10^4$ – $9,0 \times 10^6$ cfu/g. U uzorcima svežih, slatko koagulišućih sireva iz kuvanog mleka, enterokoke su utvrđene u broju od $4,0 \times 10^7$ do $4,4 \times 10^7$ cfu/g. Kod odzrelih sireva dobijenih slatkim koagulacijom iz sirovog mleka broj enterokoka se kretao $< 10^2$ – $5,0 \times 10^4$ cfu/g, dok kod odzrelih sireva dobijenih slatkim koagulacijom iz kuvanog mleka enterokoke su utvrđene u rasponu $2,5 \times 10^4$ – $1,5 \times 10^5$ cfu/g. Kod svežih, kiselu koagulišućih sireva dobijenih od sirovog mleka utvrđeni broj enterokoka je iznosio $2,4 \times 10^5$ – $2,12 \times 10^7$ cfu/g, dok kod istih sireva, ali dobijenih od kuvanog mleka, broj enterokoka je bio značajno niži i iznosio je od 5×10^4 do 6×10^4 cfu/g. Teuber i sar. (23) utvrđuju da se enterokoke mogu umnožiti do visokog broja, čak više od 10^7 cfu/g u svežim sirevima.

Sprovođenjem fenotipizacije, ukupno je izolovano 42 soja enterokoka, koji su potom primenom agar disk difuzione metode ispitani na rezistenciju na antibiotike. Izolovani sojevi enterokoka u 65,82% slučajeva pokazuju rezistenciju na penicilin, 62,02% sojeva pokazuje rezistenciju na tetraciklin, 68,35% sojeva je rezistentno na linkomicin, 27,84% sojeva na gentamicin. Rezistenciju na neomicin pokazuje 31,64% ispitivanih sojeva, na eritromicin 31,64% sojeva, dok je 65,82% ispitivanih sojeva rezistentno na hloramfenikol. Ispitivanja sprovedena od strane Teuber i sar. (24), analizom 53

uzorka tvrdih, polutvrdih i svežih sireva, utvrđuju sledeći nivo rezistencije kod izolovanih sojeva enterokoka: rezistencija na penicilin (18%), eritromicin (48%), gentamicin (80%), tetraciklin (59%), rifampicin (7%), kloramfenikol (32%) i vankomicin (4%). Uobičajena multipla rezistencija kod izolovanih sojeva enterokoka je podrazumevala rezistenciju na tetracikline, kloramfenikol, eritromicin i gentamicin, dok vankomicin rezistentni izolati nisu utvrđeni. U cilju procene potencijalne opasnosti koju namirnice opterećene rezistentnim sojevima enterokoka predstavljaju po zdravlje potrošača, neophodno je utvrditi da li zapažena rezistencija predstavlja prirodnu ili stečenu, što zahteva dalja ispitivanja.

LITERATURA

- Giraffa, G., Carminati, D. and Neviani, E. 1997. *Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use*. J. Food Prot. 60, 732–738
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. and Stiles, M.E. 1999. *Enterococci at the crossroads of food safety?* Int. J. Food Microbiol. 47, 1–24
- Jett, B.D., Huyke, M.M. and Gilmore, M.S. 1994. *Virulence of enterococci*. Clin. Microbiol. Rev. 7, 462–478
- Eaton, T.J., and Gasson, M.J. 2001. *Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1628–1635
- Chow, J.W., Thai, L.A., Peri, M.B., Vasquez, J.A., Donabedian, S.M., Clewell, D.B. and Zervos, M.Z. 1994. *Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis*. Antimicrob. Agents Chemother. 37, 2474–2477
- Gilmore, M.S., Segarra, R.A., Booth, M.C., Bogie, C.P., Hall, L.R. and Clewell, D.B. 1994. *Genetic structure of the Enterococcus faecalis plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants*. J. Bacteriol. 176, 7335–7344
- Kreft, B., Marre, R., Schramm, U. and Wirth, R. 1992. *Aggregation substance of Enterococcus faecalis adhesion to cultured renal tubular cells*. Infect. Immun. 60, 25–30
- Wirth, R. 1994. *The sex pheromone system of Enterococcus faecalis-more than just a plasmid-collection mechanism*. Eur. J. Biochem. 222, 235–246
- Morrison, D., Woodford, N. and Cookson, B. 1997. *Enterococci as emerging pathogens of humans*. J. Appl. Microbiol. Suppl. 83, 89–99
- Murray, B.E. 1990. *The life and times of the Enterococcus*. Clin. Microbiol. Rev. 3, 46–65

11. Moellering, R.C. 1990. *The enterococci: an enigma and a continuing therapeutic challenge*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.Dis. 9, 73–74
12. Leclercq, R. 1997. *Enterococci acquire new kind of resistance*. Clin. Infect. Dis. 24 (Suppl.1), S80-S84
13. Schwarz, F.V., Perreten, V. and Teuber, M. 2001. *Sequence of the 5-kb conjugative multiresistance plasmid pRE25 from Enterococcus faecalis RE25*. Plasmid 46, 170–178
14. Teuber, M., Meile, L. and Schwarz, F. 1999. *Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food*. Antonie van Leeuwenhoek 76, 115–137
15. Corpet, D.E. 1998. *Antibiotic resistant bacteria in human food*. Rev. Med. Vet. 149, 819–822
16. Quednau, M., Ahrne, S., Petersson, A.C. and Molin, G. 1998. *Antibiotic resistant strains of Enterococcus isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork*. J.Appl. Microbiol. 84, 1163–1170
17. Son, R., Nimita, F., Rusul, G., Nasreldin, E., Samuel, L. and Nishibuchi, M. 1999. *Isolation and molecular characterization of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in Malaysia*. Lett. Appl. Microbiol. 29, 118–122
18. Baumgartner, A., Kueffer, M. and Rohner, P. 2001. *Occurrence and antibiotic resistance of enterococci in various ready-to-eat foods*. Arch. Lebensm. hyg.52, 16–19
19. Giraffa, G., Olivari, A.M. and Neviani, E. 2000. *Isolation of vancomycin-resistant Enterococcus faecium from Italian cheeses*. Food Microbiol. 17, 671–677
20. Bertrand, X., Mulin, B., Viel, J.F., Thouvenez, M. and Talon, D. 2000. *Common PFGE patterns in antibiotic resistant Enterococcus faecalis from humans and cheeses*. Food Microbiol. 17, 543–551
21. Van den Bogaard, A.E. and Stobborghing, E.E. 2000. *Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans*. Int.J.Antimicrob.Agents 14, 327–335
22. Witte, W. 2000. *Selective pressure by antibiotic use in livestock*. Int. J. Antimicrob.Agents 16 (Suppl.1), S19-S24
23. Teuber, M., Perreten, V. and Wirsching, F. 1996. *Antibiotikumresistente Bakterien: eine neue Dimension in der Lebensmittelmikrobiologie*. Lebensm.-Technol. 29, 182–199
24. Teuber, M., Meile, L. and Schwarz, F. 1999. *Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food*. Antonie van Leeuwenhoek 76, 115–137

SUMMARY

THE RESISTANCE PROFILE OF ENTEROCOCCI ISOLATED FROM CHEESES

Snežana Bulajić, Zora Mijačević

Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade

Enterococci are ubiquitous microorganisms, but have a predominant habitat in the gastrointestinal tract of humans and animals. These bacteria are commonly found in foods especially those of animal origin such as fermented sausages and cheeses. Nowadays, enterococci have become a focus of attention and get a new dimension due to recognition of some putative virulence factors in their biological entity and also resemble their resistance to most antibiotics. The phenomenon of antibiotic resistance is emphasized by the ability of enterococci to exchange the resistance determinants through transferable elements like plasmids and transposons. The scientific public is making efforts trying to establish the criteria according to which safety evaluation of starter or probiotic strains might be possible. The examination of antibiotic resistance/sensitivity profiles was performed by applying disk-diffusion procedure on Muller-Hinton agar.

Key words: enterococci • antibiotic resistance