

SNEŽANA B. BULAJIĆ
ZORA M. MIJAČEVIĆ

Univerzitet u Beogradu, Fakultet
veterinarske medicine

NAUČNI RAD

UDK: 637.047+637.05:615.33

BIOLOŠKI HAZARD – REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE MIKROORGANIZAMA IZOLOVANIH IZ NAMIRNICA

UVOD

Literaturni podaci u poslednjih nekoliko godina osiguravaju dokaz o visokoj prevalenci sojeva mikroorganizama rezistentnih na antibiotike, kako kod populacije farmakskih životinja, tako i u namirnicama animalnog porekla. Molekularne analize, u situacijama kada su moguće, pokazuju da se mikroflora namirnica animalnog porekla, sa aspekta profila antibiotske rezistencije i utvrđene genetske baze rezistencije, ne razlikuje od sojeva mikroorganizama poreklom od ljudi.

Sve ovo ukazuje da je antibiotska rezistencija problem globalnih dimenzija, kao i na činjenicu da se ne može rešiti ukoliko postoji konstantni priliv gena rezistencije u humanu mikrofloru putem lanca hrane.

Iz tog razloga, Evropska agencija za bezbednost hrane („European Food Safety Authority -EFSA“) je zatražila od Panela zaduženog za karakterizaciju biološkog hazarda da, sa perspektive zaštite zdravlja ljudi, identifikuje u kojoj meri hrana služi kao izvor rezistentnih mikroorganizama, odnosno gena rezistencije, pritom izvrši kategorizaciju identifikovanog rizika kao i da označi kontrolne mere za smanjenje rizika. U radu je dat sažet prikaz definicije i karakterizacije hazarda, procene rizika kao i mogućih preventivnih i kontrolnih mera u minimizaciji te vrste hazarda.

Ključne reči: antibiotska rezistencija • namirnice

Kada su antibiotici prvi put predstavljani 50-tih godina prošlog veka u praksi, pri lečenju mikrobnih infekcija, genetičari toga vremena su smatrali malo verovatnim razvoj antibiotske rezistencije usled veoma niske frekvencije mutacija koje bi vodile ka uspostavljanju fenotipa rezistencije. Ipak, nekoliko godina po primeni penicilina u kliničkoj praksi, Abraham i Chain (1940) identifikuju bakterijski enzim koji katalizuje hidrolizu β-laktamskog prstena antibiotika i time eliminiše antibakterijsku aktivnost. Njihovo predviđanje se obistinilo u meri koju niko, u to vreme, nije mogao predvideti; enzim penicilinaza, i njegovi mnogi izozimi, od tog vremena, uspešno inhibiraju akciju β-laktamskih antibiotika, i još uvek su glavni uzrok rezistencije na ovu klasu antibiotika.

Isto tako, nije se očekivalo da bakterije u našem prirodnom okruženju mogu prikupljati i pritom izmenjivati genetsku informaciju sa tako izvanrednom lakoćom i nepostojanjem specifičnosti u odnosu na vrstu. Zahvaljujući horizontalnom transferu gena rezistencije, sve više smo u prilici da u centar problema stavljamo pojavu epidemije gena rezistencije, mada je prisutna i epidemija visoko i multiplo rezistentnih klonova mikroorganizama (*Salmonella typhimurium* DT104). Širenje rezistencije, u ovom slučaju, ne poštuje filogenetske, geografske ili ekološke barijere. Rezistencija na antibiotike odavno više ne predstavlja isključivo problem kliničara, već se sagledava globalni aspekt ove pojave, a o samom fenomenu rezistencije diskutuje kao o ekološkom problemu.

Iako su predložene razumne hipoteze o poretku determinanti rezisten-

cije na antibiotike, kao i postavke o njihovoj inkorporaciji u stabilne replikativne i prenosive genetske forme mikroorganizama, demonstracija u smislu *FLAGRANTE DELICTO* nije, bar za sada, moguća (Amabile-Cuevas, 1993). Rešavanje ove problematike predstavlja veoma težak, ako ne i nemoguć zadatak ukoliko uzmemo u obzir diverzitet mikrobnog sveta. Do danas, mikrobiolozi su identifikovali manje od 5% populacije mikroorganizama u prirodi. Geni rezistencije na antibiotike bivaju predstavljeni od strane, nama danas nepoznatih bakterijskih vrsta. Pasaža gena rezistencije kroz mikrobn svet do patogene bakterije, kao odgovor na selektivni pritisak globalne primene antibiotika, uključuje kaskadni sled transfera gena između velikog broja nama nepoznatih i različitih mikrobnih vrsta. Kompletna karakterizacija ovog scenarija bi predstavljala neku vrstu eksperimentalnog košmara, kako postoje brojni, do danas neidentifikovani, izvori determinanti rezistencije, kao i veliki broj različitih mehanizama njihove diseminacije.

Antibiotska rezistencija kod mikroorganizama, uzročnika alimentarnih oboljenja, predstavlja realnost, mada postoje značajne kvantitativne i kvalitativne razlike. Rezistencija na antibiotike kod pojedinih vrsta dostiže nivo od 100%. Na primer, rezistencija na tetracikline, hloramfenikol, streptomycin i sulfonamide kod sojeva *S. typhimurium* DT104, odnosno 80% za iste antibiotike kod sojeva *E. coli*, i 50% za ampicilin i penicilin kod sojeva *Staphylococcus aureus*. Utvrđeni su identični geni rezistencije i mehanizmi molekularnog transfera gena rezistencije na antibiotike kod mikroorganizama izolovanih iz namirnica te patogenih

Adresa autora:

Doc. dr Snežana Bulajić, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Bulevar oslobođenja 18, 11 000 Beograd
tel.: +381 11 2685 653,
e-mail: snezab@vet.bg.ac.rs

bakterija poreklom ljudi i životinja (Teuber i sar., 1996; Teuber i sar., 1999).

U današnje vreme mnogi istraživači ističu hipotezu o tome da komenzalne bakterije, pre svega bakterije mlečne kiseline, mogu predstavljati rezervoar gena rezistencije na antibiotike (Perreten i sar., 1997; Levy i Salyers, 2002). Upravo iz ovog razloga, populacija komenzala je veoma značajna u spoznavanju mehanizama perzistencije i širenja gena rezistencije u svetu mikroorganizama. Takvi mikroorganizmi koji se označavaju kao „rezervoari“ mogu se naći u različitim namirnicama, pre svega fermentisanim proizvodima od mleka i mesa, koji su u velikom broju opterećeni nepatogenim bakterijama kao rezultat njihovog prirodnog procesa proizvodnje. Prema ovoj teoriji, lanac hrane se može smatrati jednim od glavnih puteva transmisije rezistentnih bakterija između populacije ljudi i životinja (Witte, 1997).

Neosporno je da prisustvo rezistentnih sojeva mikroorganizama izolovanih iz namirnica, bilo uzročnika alimentarnih oboljenja, ili pak komenzalnih bakterija, kao i potencijal prenosa determinanti rezistencije na daleko patogenije vrste, predstavlja hazard. Iz tog razloga, Evropska agencija za bezbednost hrane („European Food Safety Authority -EFSA“) zatražila je od Panela zaduženog za karakterizaciju biološkog hazarda da, sa perspektive zaštite zdravlja ljudi, identifikuje u kojoj meri hrana služi kao izvor rezistentnih mikroorganizama, odnosno gena rezistencije, pritom izvrši kategorizaciju identifikovanog rizika kao i da označi kontrolne mere za smanjenje rizika (EFSA, 2008).

Definicija rezistencije

Identifikacija i procena rizika, u ovom slučaju, odnosi se isključivo na mikrobiološku rezistenciju. Sojevi mikroorganizama koji raspolažu stečenim mehanizmima rezistencije (transfer gena ili mutacija), mogu tolerisati više koncentracije antibiotika nego većina osetljive tzv. „wild-type“ populacije, i definišu se kao mikrobiološki rezistentni sojevi. Posledično, rezistentni sojevi mikroorganizama pokazuju veće vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK). Mikrobiološke granične vrednosti, o kojima Evropski komitet za testiranje antimikrobne osetljivosti (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST) izveštava kao o epidemio-

loškim „cut-off“ vrednostima, koriste se za razlikovanje populacije mikroorganizama sa stečenim genima rezistencije od populacije koja nije opskrbljena istim genima (White i sar., 2001). Ovakva kategorizacija je specifična za svaku kombinaciju određene vrste mikroorganizama i primenjenog antibiotika i zasniva se na distribuciji MIK vrednosti za reprezentativan broj sojeva; 300 – 600 sojeva prema White i sar. (2001). Teoretski, uniformna MIK distribucija pri nižim koncentracijama antibiotika ukazuje da su svi sojevi ispitivane vrste mikroorganizama osetljivi; uniformna distribucija sa višim MIK vrednostima za sve sojeve ispitivane vrste mikroorganizama smatra se intrinzičnim svojstvom rezistencije. Kao zadnja mogućnost, bimodalna MIK distribucija ukazuje da pojedini sojevi sa visokom, atipičnom MIK vrednosti mogu raspolagati mehanizmima stečene rezistencije. Primena epidemioloških „cut-off“ vrednosti daje odgovarajući nivo osetljivosti pri merenju razvoja rezistencije i time se može koristiti u predviđanju trenda ove pojave. Pri ovakvoj proceni rezistencije, kriterijumi su harmonizovani između zemalja članica Evropske unije. Stoga, EUCAST i EFSA predlažu primenu istih kriterijuma u monitoringu rezistencije mikroorganizama od značaja za humanu i veterinarsku medicinu (Kahlmeter i sar., 2003; EFSA, 2006).

Neophodno je praviti razliku između prirodne («intrinzič») i stečene (prenosive) rezistencije. Rezistencija na dati antibiotik može biti intrinzična u odnosu na bakterijsku vrstu ili rod (prirodna rezistencija), a karakteriše se sposobnošću jednog organizma da preživi u prisustvu određenog antimikrobnog agensa, usled urođene karakteristike rezistencije. Intrinzična rezistencija se ne prenosi horizontalno. Suprotno ovom tipu, stečena rezistencija je karakteristika pojedinih sojeva unutar vrste obično osetljive na primenjeni antibiotik, i može se horizontalnim putem prenositi među bakterijama. Stečena rezistencija na određeni antimikrobni agens proizlazi bilo iz mutacije u genomu bakterije ili usled sticanja dodatnih gena koji kodiraju mehanizam rezistencije. Ovakve genetske promene pojačavaju odbrambenu sposobnost bakterija. Geni koji kodiraju enzime odgovorne za modifikaciju strukture antibiotika obično su prenosiive prirode (lokalizovani na mobilnim genetskim elementima), kao što su penicilinaze i cefalospori-

naze, acetil-transferaze, ili pak geni koji kodiraju modifikaciju ciljnog mesta delovanja antibiotika i time uspostavljaju rezistenciju na eritromicin, meticilin i glikopeptide.

Antimikrobni agensi predstavljaju heterogenu grupu molekula, a u odnosu na sličnost u strukturi i načinu delovanja grupišu se u klase. Unutar klase, ciljno mesto delovanja antibiotika u bakterijskoj ćeliji i mehanizam delovanja su isti ili slični, tako da pojedini mehanizmi podrazumevaju rezistenciju na većinu ili pak sve članove jedne klase antibiotika, u kom slučaju govorimo o unakrsnoj rezistenciji. Unakrsna rezistencija se može javiti i u slučaju nesrodnih klasa antibiotika ukoliko im se poklapaju ciljna mesta delovanja (makrolidi i linkozamidi) ili se radi o mehanizmu rezistencije niske specifičnosti (npr. utiče se na aktivnost „efflux“ pumpi).

Geni koji uslovljavaju rezistenciju na antibiotike su često lokalizovani na velikim genetskim elementima kao što su integroni, transpozomi i plazmidi, i kao takvi mogu biti „vezani“ na druge, nesrodne determinante rezistencije. U takvim slučajevima, multipli geni rezistencije mogu biti preneti u jednom, pojedinačnom transferu. Kada su dva ili više različitih gena rezistencije fizički vezani, takvu rezistenciju definišemo kao korezistenciju. Multipla rezistencija predstavlja fenomen rezistencije sojeva mikroorganizama na nekoliko različitih antimikrobnih agenasa ili antimikrobnih klasa.

Identifikacija hazarda

Direktni hazard, u ovom slučaju, predstavlja namirnica kontaminirana rezistentnim sojevima patogenih mikroorganizama koji kolonizuju ili inficiraju organizam čoveka po ingestiji hrane, ili pak ukoliko se osoba inficira rukujući sa kontaminiranom hranom. Indirektni transfer se tumači kao mogućnost transfera gena rezistencije pri komunikaciji rezistentnih sojeva komenzala sa patogenim mikroorganizmima, bilo direktno ili putem druge komenzalne bakterije. U ovom slučaju, determinante (geni) rezistencije se smatraju hazardom.

Transfer gena rezistencije se može realizovati u bilo kom delu lanca hrane, unutar organizma ljudi (intestinum) ili između sistema (sa intestinalnih bakterija na saprofitsku populaciju kože). Kod horizontalnog transfera gena identifikovana su tri mehanizma (Davies, 1994); prirodna transfor-

macija sa preuzimanjem i ugradnjom («inkorporacijom») slobodne DNA iz ekstracelularnog medijuma; konjugacija – mehanizam DNA transfera zavisen od ćelijskog kontakta koji kao takav postoji kod većine bakterijskih rodova; i transdukcija-transfer posredovan bakteriofagima. Veruje se da konjugacija predstavlja glavni način transfera gena (Salyers, 1995).

Tehnologije primenjive u industriji hrane i mogućnost razvoja antibiot-ske rezistencije

Većina tehnoloških rešenja u industriji hrane postavljena je tako da redukuje ukupan broj mikroorganizama kontaminiranih, uz sigurnu eliminaciju patogena, uzročnika alimentarnih oboljenja, uključujući i rezistentne sojeve. Nove tehnologije konzervisanja namirnica koje se ne zasnivaju na termičkom tretmanu (procesiranje visokim pritiskom, primena jonizujućeg i UV zračenja, kao i primena pulzacija električnih polja), dizajnirane su sa osnovnim ciljem proizvodnje bezbedne hrane uz održavanje nutritivne vrednosti i senzornih karakteristika namirnice. Eksperimentalne studije pokazuju da, usled oštećenja ćelijske membrane, enzima ili DNK, takve alternativne tehnologije mogu promovisati rezistenciju ili transfer determinanti rezistencije (Zenz i sar., 1998; Ceremonie i sar., 2004, 2006; Rodrigo i sar., 2005, 2007; McMahon i sar., 2007). Rezultati ovakvih studija su ipak spekulativne prirode, kako ostaju na nivou laboratorijskih ispitivanja, te ostaje da se ispita njihov značaj.

Povezanost rezistencije i virulencije kao hazard

Virulencija bakterija je generalno kodirana brojnim pojedinačnim genima ili pak klasterom gena, koji međusobno interferiraju pri različitim nivoima mehanizma patogeneze. U slučaju delecije pojedinih gena, od suštinske važnosti za patogenezu, virulencija može biti u potpunosti isključena. Veoma često, geni virulencije su kodirani na mobilnim genetskim elementima. U mehanizmu patogeneze učestvuju i drugi elementi, tzv. „ostrva patogenosti“, od kojih je dvanaest identifikovano kod sojeva *Salmonella enterica* (Hensel, 2004). Faktori virulencije kod pojedinih serovarova i fag tipova *Salmonella* spp. uključeni su u sistem sekvenciranja gvožđa, i time domaćinu omogućuju preživljavanje u

sredinama gde gvožđe nije na raspolaganju bakterijama (krv). Na ovaj način, povećana je invazivnost sojeva *Salmonella* spp. i dodatno se radi na virulenciji istih. Pored toga, genomska ostrva, kao što je SGI1 kod *S. Enterica*, mogu istovremeno nositi gene virulencije i gene koji kodiraju rezistenciju na antibiotike (Golding i sar., 2007). Kako o prisustvu gena virulencije i gena rezistencije na istim mobilnim genetskim elementima postoje izveštaji (Carlson i sar., 2007), transfer rezistencije i pritom simultani transfer korezidentnih gena virulencije, može opskrbiti bakteriju, pored svojstva rezistencije, i dodatnim mehanizmima virulencije.

Hazard – mikroorganizam kao nosač gena rezistencije

Sa aspekta antibiot-ske rezistencije mikroorganizama prisutnih u namirnicama, naučna javnost definiše tri različite grupe rezistentnih entiteta:

1. Uzročnici zoonoza i alimentarnih oboljenja – predstavljaju direktan hazard, budući da u određenim uslovima uzrokuju klinički manifestna oboljenja, a u slučaju njihove rezistencije, ne postoji mogućnost uspešnog antibiot-skog tretmana. Pored toga, u pojedinim slučajevima kolonizuju i perzistiraju u intestinalnom traktu ljudi, gde u komunikaciji sa drugim prisutnim mikroorganizmima mogu izmenjivati gene rezistencije (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. *Shigella* spp., *Listeria* spp. verotoksična *E. coli* *E. coli* O157H7, meticilin rezistentni sojevi *Staphylococcus aureus*).
2. Komenzalne bakterije – ispoljavaju hazarda, u ovom slučaju, velikim delom zavisi od kapaciteta komenzalnih mikroorganizama ingestiranih hranom da ostvare kontakt sa populacijom komenzala i patogena poreklom ljudi (*E. coli*, enterokoke).
3. Industrijski, ili tzv. tehnološki sojevi, najvećim delom bakterije mlečne kiseline, koje se sa namerom dodaju sistemu namirnica kao starteri kako bi vodile proces fermentacije ili kao probiotski dodaci. Primena takvih sojeva isključuje mogućnost da isti sojevi nose prenosive determinante rezistencije (FAO/WHO, 2001; EFSA, 2005; EFSA, 2007).

Primer hazarda

- **Mikroorganizmi koji se sa namerom dodaju kao starter, pomoćne, zaštitne ili probiotske kulture ili pak predstavljaju integralni deo namirnice (autohtona mikroflora)**

Mikrofloru fermentisanih proizvoda uglavnom predstavljaju bakterije mlečne kiseline, pre svega rodovi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus*. U sastav mnogih kultura ulazi i *Streptococcus thermophilus*, dok su enterokoke, kod velikog broja autohtonih proizvoda prisutne u značajnom broju. Pojedine vrste stafilokoka i mikrokoka (*S. carnosus*, *S. xylosus*, *M. varians*) primenjuju se u procesima fermentacije mesa kao producenti boje i arome. U probiotskim proizvodima, zastupljene su bakterije mlečne kiseline intestinalnog porekla, najvećim delom laktobacili i bifidobakterije, dok se enterokoke koriste kao probioci u ishrani životinja (Ouwehand i sar., 2002).

- **Identifikacija i karakterizacija hazarda**

U pojedinim izolovanim slučajevima, isključivo kod imunokompromitovanih osoba, laktobacili su utvrđeni kao uzročnici oportunističkih infekcija (Salminen i sar., 2006). Klinička oboljenja prouzrokovana sojevima laktobacila za industrijsku primenu, nisu zabeležena. Nekoliko slučajeva infekcija ljudi je etiološki dovedeno u vezu sa probiotskim sojevima *Lactobacillus rhamnosus* (Rautio i sar., 1999; de Groote i sar., 2005). Takve infekcije se ipak smatraju izolovanim incidentima, a pored toga nema indikacija neuspešne terapije usled antibiot-ske rezistencije ovih sojeva. Postoji svega nekoliko naučnih studija o prevalenci markera antibiot-ske rezistencije kod startera, ili sojeva bakterija mlečne kiseline izolovanih iz fermentisanih namirnica. U okviru projekta ACE-ART Šestog Framework Programa EU, približno 1400 izolata bakterija mlečne kiseline i bifidobakterija ispitano je na prisustvo markera tipične i atipične antibiot-ske rezistencije. Pojedini rezultati ove opsežne studije već su objavljeni (Florez i sar., 2006, 2007; Korhonen i sar., 2007; Matto i sar., 2007; Tosi i sar., 2007; Egervarn i sar., 2008). Generalni zaključak jeste da su slučajevi prenosive rezistencije u populaciji bakterija mlečne kiseline retki,

dok je najčešće zastupljen profil anti-biotske rezistencije, rezistencija na tetraciklin.

- **Izloženost riziku konzumacijom namirnica**

U radu Teuber i sar. (1999) navedeni su brojni primeri stečene rezistencije kod bakterija mlečne kiseline izolovanih iz namirnica. Najčešće su takvi mehanizmi zastupljeni kod enterokoka, koji, pored rezistencije na vankomicin, mogu preuzeti i akumulirati i druge determinante rezistencije, ali opet najčešće gene rezistencije na tetraciklin, eritromicin i hloramfenikol. Ove determinante rezistencije često se lokalizovane na konjugativnim plazmidima, što čini mogućim transfer istih, kako između enterokoka, tako i između različitih vrsta i rodova mikroorganizama. Pored enterokoka, sojevi laktokoka i laktobacila, koji nose multi-rezistentne plazmide, izolovani su iz proizvoda od mleka (Gfeller i sar., 2003; Teuber i sar., 1999). Utvrđena je visoka incidenca determinanti rezistencije na eritromicin i tetraciklin kod laktobacila izolovanih iz zanatski proizvedenih sireva sa područja Turske (Cataloluk i Gogebakan, 2004).

Klare i sar. (2007) ispitali su 473 soja bakterija mlečne kiseline, uključujući probiotske sojeve, poreklom ljudi i životinja, na prisustvo determinanti antibiotske rezistencije. Svojevremeno multirezistencije je utvrđeno kod šest probiotskih sojeva, koji su posedovali *tet(W)*, *tet(M)* ili *erm(B)* determinantu. U studiji sprovedenoj u Americi (Wang i sar., 2006), zapažena je visoka incidenca antimikrobne rezistencije, pre svega prisustvo *tet(S)/(M)* i *erm(B)* markera kod sojeva laktokoka i *St. thermophilus*, izolovanih iz proizvoda zastupljenih na tržištu. Frekvencija rezistentnih sojeva kretala se u opsegu 10^2 - 10^7 CFU/g proizvoda. Rezultati Bulajić (2007) potvrđuju prisustvo determinanti *tet(M)* i *erm(B)* kod rezistentnih sojeva enterokoka izolovanih iz sireva sa područja Srbije.

- **Rezistentni sojevi starter kultura i probiotskih mikroorganizama i infekcije ljudi**

Bakterije mlečne kiseline, rezistentne ili ne (sa izuzetkom enterokoka), ne predstavljaju klinički problem. Ono što predstavlja hazard u ovom slučaju, jeste činjenica da rezistentni sojevi mogu poslužiti kao rezervoar prenosivih determinanti antibiotske rezistencije. Takav scenario

ne isključuje mogućnost prenosa determinanti rezistencije na daleko patogenije vrste, i kompromitovanje tretmana infekcije, mada je dosta teško proceniti verovatnoću dešavanja i krajnji ishod sa kliničkim posledicama. Bez obzira na faktor nesigurnosti pri evaluaciji rizika u dotičnoj situaciji, izbegavanje primene sojeva sa prenosivim determinantama rezistencije u procesima fermentacija, ili kao probiotika, predstavlja opravdanu predostrožnost (von Wright, 2005). Takvi kriterijumi su prihvaćeni i u zakonskoj regulativi (SCAN, 2003; EFSA, 2005).

Tabela 1. PRIMER KATEGORIZACIJE HRANE NA OSNOVU RAZMATRANJA PROIZVODNIH USLOVA I FAKTORA PRERADE
Table 1. AN EXAMPLE OF CATEGORISATION OF FOOD INCLUDING PRODUCTION AND PROCESSING FACTORS

AMR (AntiMicrobial Resistance) kategorija Category concerning AMR (AMR Category)
Kategorija i subkategorija hrane Category and Subcategory of food
1. Mleko i proizvodi od mleka /kravlje, ovčije, kozije i bivolje mleko/ Milk and dairy products/cows, goats, sheep, buffalo/
1.1. Mleko Milk
1.2. Proizvodi od mleka (izuzev sireva) Dairy products (other than cheeses)
1.3. Sir Cheese

Kategorizacija namirnica u odnosu na rizik prisustva mikroorganizama rezistentnih na antibiotike

Fenomen antimikrobne rezistencije uslovljen je prisutnošću živih mikroorganizama i transferom gena rezistencije. Stoga, svaki korak u procesu proizvodnje i prerade hrane koji redukuje ili povećava kontaminaciju namirnica ima uticaja na rizik izloženosti rezistentnim sojevima mikroorganizama. Prepoznajući ovu uslovljenost, kategorizacija namirnica je izvršena na osnovu toga da li matriks namirnice podržava rast i omogućava preživljavanje mikroorganizama. Sledeći faktori se uzimaju u razmatranje: tretman od strane proizvođača (termički tretman i ostale procedure stabilizacije, primena konzervansa, fermentacija); mogućnost rekontaminacije posle navedenih tretmana i tip pakovanja koji se koristi; preporučeni period održivosti proizvoda; nameravana upotreba (konzumacija od strane definisanih grupa potrošača kao što je slučaj kod dijetalne hrane ili infant formula); kao i matriks namirnice definisan intrinzič i ekstrinzič faktorima uključujući pH vrednost, sadržaj NaCl, a_w vrednost, redoks potencijal, temperaturu i us-

love čuvanja. Prilikom subkategorizacije namirnica potrebno je uzeti u obzir i druge parametre, pre svega log redukciju populacije mikroorganizama od značaja, ukoliko do toga dolazi primenom odgovarajućih tehnoloških zahvata kroz proces proizvodnje. U tabeli 1 dat je skraćeni prikaz kategorizacije hrane, ograničavajući se samo na kategoriju mleka i proizvoda od mleka.

Procena rizika na području antimikrobne rezistencije

Procena rizika predstavlja mehanizam prosuđivanja, alat u rukama naučnika. Primenjuje se u procenivanju nivoa izloženosti određenom hazardu i posledičnom riziku po zdravlje ljudi, a usled prisustva specifičnog mikroorganizma ili posebnog tipa rezistencije. Podjednako dobro služe i kvantitativni i kvalitativni model procene rizika, pri čemu nam na raspolaganju stoje mnoge pisane smernice i prihvaćene procedure (Codex Alimentarius Commission, 1999) za procenu rizika u odnosu na mikrobiološki profil namirnice sa aspekta bezbednosti hrane, odnosno za procenu rizika koji, po zdravlje ljudi, nosi rezistentna populacija mikroorganizama (OIE, 2007). Evaluacija rizika je moguća jedino u slučaju dobre baze podataka, što situaciju na ovom području čini izuzetno kompleksnom. Dosta je nedostataka i nejasnoća koji otežavaju prikupljanje potrebnih informacija. Pre svega, nedostaje jedinstvena metodologija određivanja profila antibiotske rezistencije, uvek postoji pitanje prikladnosti fenotipskih metoda ili pak neophodnosti molekularnih, potom

harmonizacije MIC vrednosti, odnosno graničnih vrednosti pri izvođenju disk difuzionog testa. Veliko pitanje jeste i veličina uzorka, a svakako da problem predstavlja i nedovoljno podataka o primeni antimikrobnih agenasa u sektoru veterinarske i humane medicine.

Preventiva i kontrolne mere

Za mikrobiologe namirnica je van svake sumnje da se distribucija bakterija sa prenosivim determinantama rezistencije treba izbeći. Pažljiva i opravdana upotreba antibiotika, kako u veterini, poljoprivrednom sektoru i humanoj medicini, uz pasterizaciju ili drugi termički tretman sirovih supstrata (mleka ili mesa) predstavlja neophodne mere u rešavanju problema rezistencije na antibiotike. Neophodnim se smatra i zabrana korišćenja antibiotika, promotora rasta u uzgoju životinja, pre svega onih koji se klinički primenjuju, kako u veterinarskoj, tako i u humanoj medicini. Od posebnog značaja je i kontinuirana upotreba antibiotika u formi masovne medikacije pri tretmanu infektivnih bolesti kod životinja koje se drže u intenzivnim sistemima produkcije.

Sistematičan pristup problemu podrazumeva i primenu dobre proizvodnjačke i higijenske prakse. Program monitoringa antimikrobne rezistencije, kao i podaci o kvantumu upotrebe antimikrobnih materija u humanoj medicini i sektoru animalne proizvodnje mogu dati značajne informacije u definisanju trenda antimikrobne rezistencije i prevalencije rezistencije kod relevantnih bakterija, uključujući patogene, ali i komenzale.

ZAKLJUČAK

Mikroorganizmi poreklom iz namirnica, uključujući poznate patogene, uzročnike alimentarnih oboljenja, ali i komenzale, pokazuju rastući trend antibiotske rezistencije uz veliki diverzitet utvrđenih profila rezistencije.

Fenomen antibiotske rezistencije u namirnicama egzistira kao direktni i indirektni hazard usled mogućnosti transfera rezistencije.

Procena rizika u mnogim slučajevima je otežana kako nedostaju relevantni podaci.

Preventivne i kontrolne mere u cilju redukcije rizika neizostavno se sagledavaju u kontekstu kritičke i nezamenjive uloge kontinuirane administracije antimikrobnih materija u glo-

balnom sistemu proizvodnje. Posledica toga jeste selektivni pritisak koji favorizuje preživljavanje rezistentnih sojeva, diseminaciju determinanti rezistencije i aktivaciju prastarih mehanizama zaštite zapisanih u genomu.

LITERATURA

- Amabile-Cuevas, C. F.: Origin, Evolution and Spread of Antibiotic Resistance Genes. Landes, Austin, TX (1993).
- Bulajić, S.: Mogućnost primene enterokoka u proizvodnji sireva i njihov potencijal u prenošenju gena rezistencije na antibiotike. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2007.
- Carlson, S. S., Sharma, V. K., McCuddin, Z. P., Rasmussen, M. A. and Franklin, S. K.: Involvement of an SGI1 gene in the rumen protozoa-mediated enhancement of invasion for multiple antibiotic resistant *Salmonella*. *Infect. Immun.*, 75 (2007) 792-800.
- Cataloluk, O. and Gogebakan, B.: Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey. *FEMS Microbiol. Lett.*, 236 (2004) 7-12.
- Ceremonie, H., Buret, F., Simonet, P. and Vogel, T. M.: Isolation of lightning-competent soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (2004) 6342-6346.
- Ceremonie, H., Buret, F., Simonet, P. and Vogel, T. M.: Natural electrotransformation of lightning-competent *Pseudomonas* sp. Strain N3 in artificial soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (2006) 2385-2389.
- Codex Alimentarius Commission, Principles and Guidelines for the Conduct of a Microbiological Risk Assessment. FAO, Rome. CAC/GL-30 (1999).
- Davies, J.: Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes., *Science*, 64 (1994) 375-382.
- De Groote, M. A., Frank, D. N., Dowell, E., Glode, M. P. and Pace, N. R.: *Lactobacillus rhamnosus* GG bacteremia associated with the probiotic use in a child with short gut syndrome. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 24 (2005) 278-80.
- Abraham, E. P. and Chain, E.: *Nature* 146, 837 (1940).
- EFSA: Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA Journal*, 223 (2005) 1-12.
- EFSA: Report of the Task Force of Zoonoses Data Collection including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in *Salmonella* in fowl (*Gallus gallus*), turkey and pigs and *Campylobacter jejuni* i *C. coli* in broilers. *The EFSA Journal*, 493 (2006) 1-16.
- EFSA: Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA Journal*, 187 (2007) 1-16.
- EFSA: Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazard on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard, *The EFSA Journal*, 765 (2008) 1-87.
- Egervarn, M., Danielsen, M., Roos, S., Lindmark, H. and Lindgren, S.: Antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*. *J. Food Protect.*, 70 (2008) 412-418.
- FAO/WHO: Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, 2001. www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.
- Florez, A. B., Danielsen, M., Korhonen, J., Zycka, J., von Wright, A., Bardowski, J., and Mayo, B.: Antibiotic survey of *Lactococcus lactis* strains to six antibiotics by Etest, and establishment of susceptibility-resistance cut-off values. *J. Dairy Res.*, 74 (2007) 1-7.
- Florez, A. B., Egervarn, M., Danielsen, M., Tosi, L., Morelli, L., Lindgren, S. and Mayo, B.: Susceptibility of *Lactobacillus plantarum* strains to six antibiotics and definition of new susceptibility-resistance cut off values. *Microbiol. Drug Resist.*, 12 (2006) 252-256.
- Gfeller, K. Y., Roth, M., Meile, L. and Teuber, M.: Sequence and genetic organization of the 19.3-kb erythromycin and dalbapristin resistance plasmid pLME300 from *Lactobacillus fermentum* ROT1. *Plasmid*, 50 (2003) 190-201.
- Golding, G. R., Olson, A. B., Doublet, B., Cloeckert, A., Christianson, S., Graham, M. R. and Mulvey, M. R.: The effect of the *Salmonella* genomic island 1 on in vitro global gene expression in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2. *Microbes Infect.*, 9 (2007) 21-27.
- Kahlmeter, G., Brown, D. F. J., Goldstein, F. W., MacGowan, A. P., Mouton, J. W., Osterlund, A., Rodloff, A., Steinbakk, M., Urbaskova, P., Vatopoulos, A.: European harmonisation of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 52 (2003) 145-148.
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Muller-Bertling, S., Witte, W., and Goossens, H.: Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pedococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J. Antimicrob. Chemother.*, 59 (2007) 900-912.
- Korhonen, J.M., Scivagnotis, J. and von Wright, A.: Characterization of dominant cultivable lactobacilli and their antibiotic resistance profiles from fecal samples of weaning piglets. *J. Appl. Bacteriol.*, 103 (2007) 2496-2503.
- Levy, S. B., Salyers, A. A.: Reservoirs of antibiotic resistance (ROAR) Network, 2002. www.healthsci.tufts.edu/apua/Roar/roarhome.htm.
- Matto, J., van Hoek, A. H. A. M., Domig, K. J., Saarela, M., Florez, A. B., Brockmann, E., Amtmann, E., Mayo, B., Aarts, H. J. M. and Danielsen, M.: Susceptibility of human and probiotic *Bifidobacterium* ssp. to selected antibiotics as determined by the E-test methods. *Int. Dairy J.*, 17 (2007) 1123-1131.
- McMahon, M. A. S., Blair, I. S., Moore, J. E. and Mc Dowell, D. A.: The rate of horizontal transmission of antibiotic resistance plasmids in increased in food preservation-stressed bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 103 (2007) 1883-88.
- OIE: Terrestrial animal health code. Guidelines for the responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine (2007).
- Ouweland, A. C., Salminen, S. and Isolauri, E.: Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Leeuwenhoek*, 82 (2002) 279-289.
- Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G., Teuber, M.: Antibiotic resistance spread in food. *Nature*, 389 (1997) 801-802.
- Rautio, M., Jousemies-Somer, H., Kauma, H., Pietarinen, I., Saxelin, M., Tynkynen, S. and Koskela, M.: Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from

- L. rhamnosus* strain GG., Clin. Infect. Dis. 28 (1999) 1159-1160.
- Rodrigo, D., Zuniga, M., Rivas, A., Martinez, A. and Notermans, S.: Microbiological aspects: adaptation potential. Food preservation by pulsed electric fields: from research to application. ISBN: 1-84569-058-3 Lelieveld, H. L. M., Notermans, S. And De Haan, S. W. H. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge.UK (2007).
- Rodrigo, D., Zuniga, M., Rivas, A., Polain, V., Perez Martinez, G., Rodrigo, M. and Martinez, A.: Assessment of the risk of transformation by pulsed electric field of *E. Coli* in as a model organisms. IFT annual meeting. New Orleans, USA (2005).
- Salminen, M. K., Rautelin, H., Tynkkyen, S., Poussa, T., Saxelin, M., Valtonen, V. and Jarvinen, A.: *Lactobacillus* bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. Clin. Infect. Dis., 42 (2006) e35-44.
- Salyers, A. A.: Antibiotic Resistance Transfer in the Mammalian Intestinal Tract: Implications from Human Health, Food Safety and Biotechnology. Springer-Verlag (1995).
- SCAN (Scientific Committee on Animal Nutrition): Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance, adopted on 3 July 2001, revised on 24 January 2003.
- Teuber, M., Meile, L., Schwarz, F.: Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie van Leeuwenhoek, 76 (1999) 115-137.
- Teuber, M., Parreten, V., Wirsching, F.: Antibiotikumresistente Bakterien: Eine neue Dimension in der Lebensmittelmikrobiologie. Lebensmitteltechnologie, 29 (1996) 182-199.
- Tosi, L., Berrut, G., Danielsen, M., Wind, A., Huys, G. and Morelli, L.: Susceptibility of *Streptococcus thermophilus* to antibiotics. Antonie van Leeuwenhoek, 92 (2007) 21-28.
- Von Wright, A.: Regulating the safety of probiotics – the European approach. Current. Pharm. Design., 11 (2005) 17-23.
- Wang, H. H., Manuzon, M., Lehman, M., Wan, K., Luo, H., Wittum, T. E., Yousef, A. and Bakaletz, L.: Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. FEMS Microbiol. Lett., 254 (2006) 226-231.
- Witte, W.: Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans. In: Chadwick, D.J., Goode, J. (Eds.), Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread, Ciba Foundation Symposium 207. Wiley, Chichester, pp. 61, 1997, www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_3.9.3.htm.
- Zenz, K. I., Neve, H., Geis, A. and Heller, K. J.: *Bacillus subtilis* develops competence for uptake of plasmid DNA when growing in milk products. Syst. Appl. Microbiol., 21 (1998) 28-32.

SUMMARY

BIOLOGICAL HAZARD – ANTIBIOTIC RESISTANCE OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM FOOD

Snežana B. Bulajić, Zora M. Mijačević

University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine

References from the last few years provide evidence that antibiotic resistance traits have entered the microflora of farm animals and the food produced from them. Molecular analysis of the resistance genes, where available, shows that the food microflora is not separated from its human counterpart and conjugative transfer of resistance genes has been demonstrated *in vitro* and in a few cases *in vivo*.

This situation reveals the antibiotic resistance problem of global dimensions, highlighting the fact that the resistance problem will not be solved if there is a constant influx of resistance genes into the human microflora via the food chain.

Therefore, the European Food Safety Authority (EFSA) asked its Panel on Biological Hazards to identify, from a public health perspective, the extent to which food serves as a source for the acquisition, by humans, of antimicrobial-resistant (AMR) bacteria or bacteria-borne antimicrobial resistance genes, to rank the identified risks and to identify potential control options for reducing exposure.

In this paper, following the aforementioned instructions, we summarized the identification and characterization of biological hazard, risk assessment and recommended preventive and control measures in order to minimize the risk.

Key words: antibiotic resistance • food