



**XII**

**KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE**

sa međunarodnim učešćem

**MIKROMED 2018 REGIO**

**BEOGRAD, 10-12. MAJ 2018.**

**Zbornik apstrakata / Book of Abstracts**



[www.micromedregio.com](http://www.micromedregio.com)

**ORGANIZATOR**

---

UDRUŽENJE MIKROBIOLOGA SRBIJE, Beograd

**ZBORNİK APSTRAKATA/ BOOK OF ABSTRACTS**

---

**Izdavač:** UDRUŽENJE MIKROBIOLOGA SRBIJE, Nemanjina 6, Beograd

**Za izdavača:** Dragojlo Obradović, predsednik Udruženja

**Urednici:**

Dragojlo Obradović

Lazar Ranin

**Štampa:**

Caligraft soft Kosovska 6 , 11080 Zemun, Beograd 2018.

**Tiraž:**

300 primeraka

CIP - Каталогизација у публикацији - Народна библиотека Србије, Београд

579.61(048)(0.034.2)

КОНГРЕС микробиолога Србије Микромед (12 ; 2018 ; Београд)

Zbornik apstrakata [Elektronski izvor] / XII Kongres mikrobiologa Srbije sa međunarodnim učešćem, Mikromed 2018 REGIO, Beograd, 10-12. maj 2018. = Book of Abstracts / [12th Congress of Serbian Microbiologists with International Participation MICROMED 2018 REGIO] ; [urednici Dragojlo Obradović, Lazar Ranin]. - Beograd : Udruženje mikrobiologa Srbije, 2018 (Zemun : Caligraft soft). - 1 USB fleš memorija : 1 x 2 x 4 cm

Sistemska zahtevi: Nisu navedeni. - Nasl. sa naslovne strane dokumenta. - Apstrakti na srp. i engl. jeziku. - Tiraž 300. - Bibliografija uz pojedine apstrakte.

ISBN 978-86-914897-5-5

a) Медицинска микробиологија - Апстракти COBISS.SR-ID 265049612

PLATINASTI SPONZOR

**ProMedia**  
Specialists In Laboratory Supplying

ZLATNI SPONZOR



SREBRNI SPONZOR



SPONZOR SIMPOZIJUMA



SPONZOR



PARTNERI / IZLAGAČI



## Sadržaj / Content

<b>PLENARNA SESIJA/ PLENARY SESSION:</b> .....	15
<b>ORAL MICROBIOTA IN HEALTH AND DISEASE</b> Lazarević Vladimir .....	16
<b>MENINGOKOK – STARI PATOGEN U NOVOM SVETLU     MENINGOCOCCUS – OLD PATHOGEN IN A NEW LIGHT</b> Delić Snežana .....	17
<b>ALTERNATIVNE METODE U KONTROLI LEGIONELOZA     AN ALTERNATIVE WAY TO CONTROL LEGIONELLA INFECTION</b> Gobin Ivana .....	19
<b>SESIJA: PARAZITOLOŠKO – MIKOLOŠKA SESSION: PARASITOLOGY- MYCOLOGY</b> .....	21
<b>PREDAVANJA PO POZIVU/ INVITED LECTURES</b> .....	21
<b>POJAVA REZISTENCIJE GLJIVA NA EHINGANDINE     EMERGENCY OF ECHINOCANDIN RESISTANCE IN FUNGI</b> Mitrović Sanja .....	22
<b>PCR U DIJAGNOSTICI SISTEMSKE ASPERGILOZE     PCR IN DIAGNOSIS OF SYSTEMIC ASPERGILLOSIS</b> Čolović Čalovski Ivana .....	24
<b>BLASTOCYSTIS HOMINIS: ZAGONETNI I JOŠ UVEK ZANEMARENI PARAZIT     BLASTOCYSTIS HOMINIS: PUZZLING AND STILL OVERLOOKED</b> Miladinović-Tasić Nataša .....	26
<b>NALAZ GLJIVA KOD PACIJENATA SA GLJIVIČNIM RINOSINUZITISIMA I     SINONAZALNOM POLIPOZOM – NAŠA ISKUSTVA     FINDING OF FUNGI IN PATIENTS WITH FUNGAL RHINOSINUSITIS AND SYNONAL     POLYPOSIS - OUR EXPERIENCES</b> Dubljanin Eleonora .....	28
<b>SESIJA: PARAZITOLOŠKO- MIKOLOŠKA SESSION: PARASITOLOGY- MYCOLOGY</b> .....	30
<b>USMENE PREZENTACIJE/ ORAL PRESENTATION</b> .....	30
<b>ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI IZOLATA CANDIDA SPP. IZ HEMOKULTURA NA DERIVATE     AZOLA I KASPOFUNGIN DISK DIFUZIONOM I BUJON MIKRODILUCIONOM METODOM     SUSCEPTIBILITY TESTING OF CANDIDA SPP. ISOLATES FROM HEMOCULTURES TO     AZOLES AND CASPOFUNGIN BY DISC DIFFUSION AND BROTH MICRODILUTION     METHODS</b> Mijatović Stefan .....	31
<b>LABORATORIJSKA I EPIDEMIOLOŠKA EVALUACIJA PACIJENATA SA OTOMIKOZOM     LABORATORY AND EPIDEMIOLOGICAL EVALUATION OF PATIENTS WITH     OTOMYCOSIS</b> Cvetković Milan .....	33

**SESIJA: ZNAČAJ PRIMENE SISTEMA VAKCINACIJE**

**SESSION: THE IMPORTANCE OF THE APPLICATION OF THE VACCINATION SYSTEM**..... 35

**PREDAVANJA PO POZIVU/ INVITED LECTURES**..... 35

**PERTUSIS – SVE STARO JE PONOVO NOVO**

**PERTUSSIS – NEW CHALLENGES**

Minić Predrag..... 36

**BCG VAKCINA**

**BCG VACCINE**

Vuković Dragana..... 46

**ERADIKACIJA POLIOMIJELITISA**

**POLIOMYELITIS ERADICATION**

Knežević Aleksandra..... 48

**ISPITIVANJE VARIJABILNOSTI GENA EPSTEIN-BARR VIRUSA U CILJU IDENTIFIKACIJE**

**POTENCIJALNIH PREDIKTORA KLINIČKOG TOKA EBV UDRUŽENIH OBOLJENJA**

**INVESTIGATION OF EPSTEIN-BARR VIRUS GENES VARIABILITY FOR IDENTIFICATION**

**OF POTENTIAL PREDICTORS OF CLINICAL COURSE OF EBV-RELATED DISEASES**

Banko Ana..... 52

**MORBILIVIRUS-UZROČNIK MALIH BOGINJA I GLOBALNOG ZDRAVSTVENOG**

**PROBLEMA**

**MEASLES VIRUS - CAUSATIVE AGENT OF MEASLES AND A GLOBAL HEALTH PROBLEM**

Ćupić Maja..... 54

**MORBILI – STARA BOLEST ILI NOVA PRETNJA?**..... 59

Stevanović Olja <sup>1</sup>..... 59

**SESIJA: ZNAČAJ PRIMENE VAKCINACIJE**

**SESSION: THE IMPORTANCE OF THE APPLICATION OF THE VACCINATION SYSTEM**..... 60

**USMENE PREZENTACIJE/ ORAL PRESENTATION**..... 60

**PREVALENCA REAKTIVACIJE HUMANOG CITOMEGALOVIRUSA (HCMV) I OKSIDATIVNI**

**STRES U NETRANSPLANTIRANIH BOLESNIKA SA HEMATOLOŠKIM MALIGNITETIMA**

**PREVALENCE OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS (HCMV) REACTIVATION AND**

**OXIDATIVE STRESS IN NON-TRANSPLANT PATIENTS WITH HAEMATOLOGIC**

**MALIGNANCIES**

Janković Marko..... 61

**POTENCA KAO POKAZATELJ KONZISTENTNOSTI PROIZVODNJE TOKSOIDNIH**

**VAKCINA U INSTITUTU "TORLAK"**

**POTENCY AS AN INDICATOR OF CONSISTENCY OF PRODUCTION OF TOXOID**

**VACCINES IN "TORLAK" INSTITUTE**

Radojević Katarina..... 63

**BCG VAKCINA U SRBIJI – DEVEDESET GODINA USPEŠNE IMUNIZACIJE**

**BCG VACCINE IN SERBIA – NINETY YEARS OF SUCCESSFUL IMMUNIZATION**

Janjušević Ana..... 65

**SESIJA: BAKTERIOLOGIJA**

**SESSION: BACTERIOLOGY**..... 67

**PREDAVANJA PO POZIVU/ INVITED LECTURES**..... 67

<b>NATIONAL LABORATORY SURVEILLANCE OF INVASIVE PNEUMOCOCCAL DISEASES BEFORE AND AFTER THE INTRODUCTION OF THE VACCINATION INTO THE NATIONAL IMMUNISATION PROGRAM IN SLOVENIA</b>	
Paragi Metka.....	68
<b>LABORATORIJSKI NADZOR NAD INVAZIVNOM PNEUMOKOKNOM BOLEŠĆU PRE UVOĐENJA PNEUMOKOKNE KONJUGOVANE VAKCINE U SRBIJI</b>	
<b>LABORATORY BASED SURVEILLANCE OF PNEUMOCOCCAL INVASIVE DISEASES BEFORE INTRODUCTION OF PNEUMOCOCCAL CONJUGATE VACCINE IN SERBIA</b>	
Opavski Nataša.....	69
<b>ULOGA BIOFILMA U NASTANKU SISTEMSKIH INFEKCIJA</b>	
Šmitran Aleksandra.....	73
<b>IZOLATI IZ KRV I CEREBROSPINALNE TEČNOSTI IZ UNIVERZITETSKOG KLINIČKOG CENTRA REPUBLIKE SRPSKE U 2016.GODINI</b>	
Travar Maja.....	75
<b>SESIJA: BAKTERIOLOGIJA</b>	
<b>SESSION: BACTERIOLOGY</b> .....	76
<b>USMENE PREZENTACIJE/ ORAL PRESENTATION</b> .....	76
<b>DISTRIBUCIJA KAPSULARNIH TIPOVA I REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE INVAZIVNIH I NEINVAZIVNIH SOJEVA GRUPE B STREPTOKOKA U SRBIJI 2017. GODINE</b>	
<b>CAPSULAR TYPE DISTRIBUTION AND RESISTANCE TO ANTIBIOTICS AMONG INVASIVE AND NONINVASIVE GROUP B STREPTOCOCCI STRAINS IN SERBIA IN 2017</b>	
Kekić Dušan.....	77
<b>DETEKCIJA IZVORA U NEŽIVOJ BOLNIČKOJ SREDINI SPORA C. DIFFICILE U INTENZIVNOJ JEDINICI KLINIKE ZA NEUROHIRURGIJU</b>	
<b>DETECTION OF ENVIRONMENTAL SOURCES OF CLOSTRIDIUM DIFICILE IN ICU ON CLINIC OF NEUROSURGERY</b>	
Popovska Katja.....	79
<b>EPIDEMIOLOGIJA I EMM TIPOVI INVAZIVNOG STREPTOKOKA GRUPE A U SRBIJI</b>	
<b>EPIDEMIOLOGY AND EMM TYPES OF INVASIVE GROUP A STREPTOCOCCAL INFECTIONS IN SERBIA</b>	
Popović Sunčica.....	81
<b>PREVALENCE OF THE MOST COMMON NON-FERMENTING GRAM-NEGATIVE BACTERIA ORIGINATED FROM PEDIATRIC INTENSIVE CARE UNITS IN R. MACEDONIA</b>	
Kakaraskoska Boceska Biljana.....	83
<b>SESIJA: ANTIMIKROBNA TERAPIJA I REZISTENCIJA</b>	
<b>SESSION: ANTIMICROBIAL THERAPY AND RESISTANCE</b> .....	84
<b>PREDAVANJA PO POZIVU/ INVITED LECTURES</b> .....	84
<b>REZISTENCIJA NA KOLISTIN - STARI LEK, NOVI PROBLEM</b>	
Mladenović-Antić Snežana.....	85
<b>OSETLJIVOST MULTIPLO REZISTENTNIH SOJEVA ACINETOBACTER BAUMANNII NA NEKONVENCIONALNE ANTIMIKROBNE AGENSE</b>	
<b>SENSITIVITY OF MULTYDRUG-RESISTANT ACINETOBACTER BAUMANNII STRAINS TO UNCONVENTIONAL ANTIMICROBIAL AGENTS</b>	
Aleksić Sabo Verica.....	89

<b>STAPHYLOCOCCAL SKIN AND SOFT TISSUE INFECTIONS. THERAPEUTICAL CHALLENGES</b>	
Nășcuțiu Alexandra-Maria .....	91
<b>ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND CONSUMPTION IN THE REPUBLIC OF MACEDONIA IN COMPARISON WITH BALKAN REGION AND EUROPE: RESULTS OF CAESAR NETWORK</b> .....	92
Panovski Nikola <sup>1</sup> , .....	92
<b>FIVE YEARS EXPERIENCE OF R. MACEDONIA IN THE CAESAR NETWORK</b> .....	93
Cekovska Zaklina .....	93
<b>PROFIL OSETLJIVOSTI IZOLATA IZ HEMOKULTURA U KLINIČKOM CENTRU SRBIJE BACTERIOLOGICAL PROFILE AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PATTERNS OF BLOOD CULTURE ISOLATES IN CLINICAL CENTER OF SERBIA</b>	
Jovanović Snežana .....	96
<b>METODOLOGIJA: Retrospektivna analiza mikrobioloških rezultata</b> .....	96
<b>KLJUČNE REČI: hemokulture, bakterijski izolati, rezistencija bakterija</b> .....	96
<b>BACTERIOLOGICAL PROFILE AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PATTERNS OF BLOOD CULTURE ISOLATES IN CLINICAL CENTER OF SERBIA</b> .....	96
<b>REZISTENCIJA PNEUMOKOKA NA MAKROLIDNE ANTIBIOTIKE U SRBIJI MACROLIDE RESISTANCE IN PNEUMOCOCCI IN SERBIA</b>	
Hadnađev Mirjana .....	97
<b>SESIJA: ANTIMIKROBNA TERAPIJA I REZISTENCIJA</b>	
<b>SESSION: ANTIMICROBIAL THERAPY AND RESISTANCE</b> .....	99
<b>USMENE PREZENTACIJE/ ORAL PRESENTATION</b> .....	99
<b>KRETANJE REZISTENCIJE NA ANTITUBERKULOZNE LEKOVE PRVE LINIJE ZA GRAD BEOGRAD</b>	
<b>TRENDS OF RESISTANCE TO THE FIRST-LINE ANTITUBERCULOUS DRUGS – CITY OF BELGRADE</b>	
Vitković Aleksandar .....	100
<b>GENETIČKA OSNOVA REZISTENCIJE MULTIREZISTENTNIH SOJEVA <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> IZOLOVANIH U SRBIJI</b>	
<b>GENETIC BASIS OF RESISTANCE IN MULTIDRUG-RESISTANT <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> STRAINS ISOLATED IN SERBIA</b>	
Arandžević Irena .....	102
<b>SKRINING REKTALNE FLORE NA FLUOROHINOLONSKU REZISTENCIJU PRE TRANSREKTALNE BIOPSIJE PROSTATE</b>	
<b>SKRINING OF RECTAL FLORA ON FLUOROQUINOLONE RESISTANCE BEFORE TRANSECTRAL PROSTATE BIOPSY</b>	
Kovačević-Jovanović Vesna .....	104
<b>ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI LOKALNIH IZOLATA <i>BORRELIA AFZELII</i> NA HUMANI SERUM, <i>IN VITRO</i></b>	
<b><i>IN VITRO</i> SENSITIVITY OF LOCAL ISOLATES OF <i>BORRELIA AFZELII</i> TO HUMAN SERUM</b>	
Veinović Gorana .....	108

<b>SESIJA: INTRAHOSPITALNE INFEKCIJE</b>	
<b>SESSION: INTRAHOSPITAL INFECTIONS</b> .....	110
<b>PREDAVANJA PO POZIVU/INVITED LECTURES</b> .....	110
<b>NADZOR NAD MULTIPOREZISTENTNIM BAKTERIJAMA U BOLNIČKOJ SREDINI</b>	
Tambić Andrašević Arjana .....	111
<b>ACINETOBACTER SPP, EPIDEMIOLOGIJA, ZNAČAJ IZOLACIJE U BOLNIČKOJ SREDINI I MERE PREVENCIJE</b>	
<b>ACINETOBACTER SPP, EPIDEMIOLOGY, SIGNIFICANCE OF ISOLATION IN THE HOSPITAL ENVIRONMENT AND PREVENTION MEASURES</b>	
Mioljević Vesna .....	112
<b>SESIJA: INTRAHOSPITALNE INFEKCIJE</b>	
<b>SESSION: INTRAHOSPITAL INFECTIONS</b> .....	114
<b>USMENE PREZENTACIJE/ORAL PRESENTATIONS</b> .....	114
<b>ANTIMICROBIAL USE AND INFECTIONS IN LONG-TERM CARE FACILITY</b>	
Petrovska Basovska Branka .....	115
<b>SESIJA: POSTER PREZENTACIJA MEDICINSKA MIKROBIOLOGIJA</b>	
<b>SESSION: POSTER PRESENTATION- MEDICAL MICROBIOLOGY</b> .....	116
<b>SINDROM PFAPA - PRIKAZ SLUČAJA- RACIONALNA PRIMENA ANTIBIOTIKA KAO IMPERATIV SAVREMENE KLINIČKE PRAKSE</b>	
<b>PFAPA SYNDROME-CASE REPORT – RATIONAL USE OF ANTIBIOTICS AS IMERATIVE OF MODERN CLINICAL PRACTISE</b>	
Jovanović Gordana .....	117
<b>IN VITRO DJELOTVORNOST FOSFOMICIN-GLUKOZA-6-FOSFATA U ODNOSU NA TRIMETOPRIM-SULFAMETOKSAZOL</b>	
<b>IN VITRO EFFECTIVNESS OF FOSFOMYCIN-GLUCOSE-6-PHOSPHATE COMPARED TO TRIMETHOPRIM-SULPHAMETOXAZOLE</b>	
Babić Demir .....	119
<b>IDENTIFIKACIJA CANDIDA SPP. IZOLATA U SLUČAJEVIMA VULVOVAGINALNE KANDIDOZE</b>	
<b>IDENTIFICATION OF CANDIDA SPP. ISOLATES IN CASES OF VULVOVAGINAL CANDIDOSIS</b>	
Kovačević-Jovanović Vesna .....	121
<b>MIKOTIČNI KERATITIS UZROKOVAN FEOHIFOMICETOM ALTERNARIA ALTERNATA</b>	
<b>MYCOTIC KERATITIS CAUSED BY FEOHIFOMYCETE ALTERNARIA ALTERNATA</b>	
Džamić M. Aleksandar .....	123
<b>OSJETLJIVOST URINARNIH IZOLATA ESCHERICHIA COLI I KLEBSIELLA SPP. NA ANTIMIKROBNE LIJEKOVE U VANBOLNIČKOJ POPULACIJI</b>	
<b>ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF ESCHERICHIA COLI AND KLEBSIELLA SPP. URINARY ISOLATES IN OUTPATIENTS</b>	
Đukarić Bojan .....	125
<b>OSETLJIVOST NA ANTIBIOTIKE GRAM NEGATIVNIH BAKTERIJA UZROČNIKA VANBOLNIČKIH INFEKCIJA URINARNOG TRAKTA U BEOGRADU</b>	
<b>ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF GRAM-NEGATIVE BACTERIAL STRAINS ISOLATED</b>	



<b>FROM OUTPATIENTS WITH URINARY TRACT INFECTIONS IN BELGRADE</b> Vuksanović Pavle.....	127
<b>REZISTENCIJA PSEUDOMONAS AERUGINOSA NA ANTIBIOTIKE, DVADESETOGODISNJI PRESEK</b> <b>RESPONSION OF PSEUDOMONAS AERUGINA ON ANTIBIOTICS, TWENTY-ANNUAL SURVIVOR</b> Stanković Nedeljković Natasa .....	129
<b>UPRAVLJANJE INFEKTIVNIM MEDICINSKIM OTPADOM U INSTITUTU ZA TRANSFUZIJU KRVI SRBIJE</b> <b>MEDICAL WASTE MENAGMENT IN BLOOD TRANSFUSION INSTITUTE</b> Milosavljević Slavica.....	131
<b>PRIMENA LOGISTIČKOG MODELOVANJA U ISTRAŽIVANJU HIV EPIDEMIJE U SRBIJI</b> <b>APPLICATION OF LOGISTIC MODELING IN ASSESINGHIV EPIDEMIC IN SERBIA</b> Jovanović Luka.....	133
<b>PRISUSTVO ACINETOBACTER SPP. U BOLESNIČKIM MARIJALIMA I REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE</b> <b>PRESENCE OF ACINETOBACTER SPP. IN PATIENT'S MATERIALS AND RESISTANCE ON ANTIBIOTICS</b> Bogdanović Tatjana .....	135
<b>VALIDACIJA METODE ODREĐIVANJA MIKROBIOLOŠKOG KVALITETA KARBOCISTEINA</b> <b>VALIDATION OF METHOD FOR MICROBIOLOGICAL QUALITY OF CARBOCISTEINE API</b> Popovska Ilna.....	137
<b>ANTI HBS TITAR KAO INDIKATOR PROCJEPLJENOSTI HEPATITIS B CIJEPVOM NA PODRUČJU GRADA ZAGREBA</b> <b>ANTI HBS TITRE AS INDICATOR OF VACCINATION WITH HEPATITIS B VACCINE IN THE CITY OF ZAGREB REGION</b> Ptiček Vjekoslav .....	139
<b>SESIJA: VETERINARSKA MIKROBIOLOGIJA</b> <b>SESSION: VETERINARY MICROBIOLOGY</b> .....	141
<b>PREDAVANJA PO POZIVU/ INVITED LECTURES</b> .....	141
<b>MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA I FILOGENETSKA ANALIZA SOJEVA GOVEĐEG HERPESVIRUSA 1 (BHV-1) IZOLOVANIH KOD GOVEDA NA TERITORIJI REPUBLIKE SRBIJE</b> <b>MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF BOVINE HERPESVIRUS 1 (BHV-1) STRAINS ISOLATED FROM CATTLE IN THE REPUBLIC OF SERBIA</b> Nišavić Jakov .....	142
<b>KUĆNI LJUBIMCI I ZOONOZE</b> <b>PETS AND ZOONOSES</b> Radojčić Marina .....	144
<b>OCENA I RANGIRANJE RIZIKA OD MIKROBIOLOŠKIH HAZARDA U KONTEKSTU REVIZIJE INSPEKCIJE MESA</b> <b>RISK ASSESSMENT AND RANKING OF MICROBIOLOGICAL HAZARDS IN THE CONTEXT OF MEAT INSPECTION REVISION</b> Blagojević Bojan.....	146

<b>FENOTIPIZACIJA, GENOTIPIZACIJA I OSETLJIVOST NA ANTIMIKROBNE LEKOVE SALMONELLA SPP. IZOLOVANIH SA TRUPOVA ZAKLANIH SVINJA SA ASPEKTA BEZBEDNOSTI HRANE</b> Kureljušić Jasna.....	148
<b>SESIJA: PRIMENJENA MIKROBIOLOGIJA U BIOTEHNOLOGIJI</b> <b>SESSION: APPLIED MICROBIOLOGY IN BIOTECHNOLOGY</b> .....	149
<b>PREDAVANJA PO POZIVU/ INVITED LECTURES</b> .....	149
<b>BIOLOŠKI POTENCIJAL ODABRANIH VRSTA MAKROMICETA OBOGAĆENIH SELENOM</b> Pantić Milena.....	150
<b>DISTRIBUCIJA UGLJOVODONIČNIH BIOMARKERA TOKOM MIKROBIOLOŠKE BIODEGRADACIJE NAFTNIH ZAGAĐUJUĆIH SUPSTANCI</b> <b>DISTRIBUTION OF HYDROCARBON BIOMARKERS DURING MICROBIOLOGICAL BIODEGRADATION OF OIL</b> Ilić V. Mila.....	153
<b>KAKO DO MIKROORGANIZAMA SA NAJVEĆIM POTENCIJALOM ZA BIOREMEDIJACIJU POLICIKLIČNIH AROMATIČNIH UGLJOVODONIKA?</b> <b>HOW TO ASSESS THE BIOREMEDIATION POTENTIAL OF MICROORGANISMS FOR POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS?</b> Milić Jelena .....	155
<b>BIOAKTIVNI PRINCIPI MAKROGLJIVA – PERSPEKTIVE U ALTERNATIVNOJ TERAPIJI</b> <b>BIOACTIVE PRINCIPLES OF MACROFUNGI – PERSPECTIVES IN ALTERNATIVE THERAPY</b> Karaman Maja.....	157
<b>SESIJA: BIOTEHNOLOGIJA</b> <b>SESSION: BIOTECHNOLOGY</b> .....	159
<b>POSTER PREZENTACIJE/ POSTER PRESENTATIONS</b> .....	159
<b>ISPITIVANJE MIKROBIOLOŠKIH KARAKTERISTIKA SEDIMENTA ZAGADJENOG UGLJOVODONICIMA NAFTE NA LOKALITETU TOPLANE NOVI BEOGRAD</b> <b>DETERMINATION OF MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SEDIMENT POLLUTED WITH PETROLEUM HYDROCARBONS AT THE SITE OF HEATING PLANT "NOVI BEOGRAD"</b> Žeradžanin Aleksandra .....	160
<b>ELEKTROHEMIJSKI SINTETIZOVANI BIOAKTIVNI KOMPOZITI ZA MEDICINSKE PRIMENE ELECTROCHEMICALLY SYNTHESIZED BIOACTIVE COMPOSITES AIMED FOR MEDICAL APPLICATIONS</b> Janković Ana .....	162
<b>INOVATIVNO GRANULISANO ORGANOMINERALNO MULTIKOMPOZITNO ĐUBRIVO NA BAZI VERMIKOMPOSTA ZA STIMULISANJE RESPIRACIJE ZEMLJIŠTA – STUDIJA NA MICRO-OXYMAX RESPIROMETRU</b> <b>INNOVATIVE GRANULATED MULTICOMPOSITE FERTILIZER BASED ON VERMICOMPOST FOR STIMULATING SOIL RESPIRATION DURING BIOREMEDIATION - A STUDY ON THE MICRO-OXYMAX RESPIROMETER</b> Joksimović Kristina.....	164
<b>SESIJA: EKOLOŠKA MIKROBIOLOGIJA</b> <b>SESSION: ECOLOGICAL MICROBIOLOGY</b> .....	166

<b>PREDAVANJA PO POZIVU/ INVITED LECTURES</b> .....	166
<b>INTEGRAZE MOBILNIH INTEGRONA KLASA 1 BAKTERIJA: OD KLINIKE DO ZAŠTITE ŽIVOTNE SREDINE</b> <b>INTEGRASES OF CLASS 1 MOBILE INTEGRONS: FROM CLINICS TO ENVIRONMENTAL PROTECTION</b> Jovčić Branko.....	167
<b>BIOAUTOGRAFSKA ANALIZA I DETEKCIJA ANTIMIKROBNIH JEDINJENJA POREKLOM IZ RAZLIČITIH PRIRODNIH IZVORA</b> <b>BIOAUTOGRAPHIC ANALYSIS AND DETECTION OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS FROM DIFFERENT NATURAL SOURCES</b> Dimkić Ivica .....	169
<b>CIJANOBAKTERIJE PRODUCENTI BIOLOŠKI AKTIVNIH JEDINJENJA</b> <b>CYANOBACTERIA PRODUCERS OF BIOLOGICAL ACTIVE COMPOUNDS</b> Simeunović Jelica .....	171
<b>PRIMENA BAKTERIJA U UKLANJANJU SOLI SA OBJEKATA KULTURNE BAŠTINE</b> <b>APPLICATION OF BACTERIA FOR SALT REMOVAL FROM CULTURAL HERITAGE OBJECTS</b> Markov Siniša.....	173
<b>POTENCIJALNO PATOGENI MIKROORGANIZMI U AGROEKOSISTEMU –FAKTOR RIZIKA U BEZBEDNOJ PROIZVODNJI POVRĆA</b> <b>POTENTIALLY HUMAN PATHOGEN MICROORGANISMS IN AGROECOSYSTEM–A RISK IN HEALTH SAFETY VEGETABLE PRODUCTION</b> Ključev Igor .....	175
<b>PRAĆENJE MIKROBIOLOŠKOG FEKALNOG ZAGAĐENJA DUŽ TOKA REKE DUNAV - THE JOINT DANUBE SURVEY 3</b> <b>MONITORING OF MICROBIAL FAECAL POLLUTION ALONG THE DANUBE RIVER – THE JOINT DANUBE SURVEY 3</b> Kolarević Stoimir .....	177
<b>INTERAKCIJE PROBIOTIČKIH BAKTERIJA SA IMUNSKIM SISTEMOM DOMAĆINA</b> <b>BENEFICIAL BACTERIA - HOST IMMUNE SYSTEM CROSS-TALK</b> Golić Nataša .....	179
<b>SESIJA: EKOLOŠKA MIKROBIOLOGIJA II , FITOPATOLOGIJA</b> <b>SESSION: ECOLOGICAL MICROBIOLOGY II, PHYTOPATHOLOGY</b> .....	181
<b>PREDAVANJA PO POZIVU/ INVITED LECTURES</b> .....	181
<b>PROBIOTICI KAO AGENSI POBOLJŠANJA KVALITETA ČOKOLADE</b> <b>PROBIOTIC AS AN AGENT OF ENHANCING CHOCOLATE QUALITY</b> Laličić-Petronijević Jovanka.....	182
<b>STREPTOMYCES SPP. U BOKATALIZI – NAPREDAK U OTKRIVANJU NOVIH BOKATALIZATORA I NJHOVOJ PRIMENI</b> <b>STREPTOMYCES SPP. IN BIOCATALYSIS TOOLBOX – ADVANCES IN NOVEL BIOCATALYST DISCOVERY AND APPLICATION</b> Đokić Lidija .....	184
<b>EVALUACIJA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI BILJNIH EKSTRAKATA; PRIMENOM IN VITRO METODA</b> <b>METHODS FOR IN VITRO EVALUATING ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HERBAL</b>	

<b>EXTRACTS</b>	
Antić Stanković Jelena .....	186
<b>POMOĆI FITOPATOGENIM BAKTERIJAMA DA DOBIJU GRIP? HELPING PLANT PATHOGENIC BACTERIA TO CATCH THE FLU?</b>	
Gašić Katarina .....	188
<b>SESIJA: EKOLOŠKA MIKROBIOLOGIJA II, FITOPATOLOGIJA SESSION: ECOLOGICAL MICROBIOLOGY II, PHYTOPATHOLOGY</b>	190
<b>USMENE PREZENTACIJE/ ORAL PRESENTATION</b>	190
<b>BIOLOŠKI MONITORING CIJANOBAKTERIJA U AKUMULACIJI VRUTCI BIOLOGICAL MONITORING OF CYANOBACTERIA IN VRUTCI ACCUMULATION</b>	
Knežević Goran.....	191
<b>SESIJA: EKOLOGIJA SESSION: ECOLOGY</b>	193
<b>POSTER PREZENTACIJE/ POSTER PRESENTATIONS</b>	193
<b>GENETIČKA KARAKTERIZACIJA XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS POREKLOM SA RAZLIČITIH DOMAĆINA UPOTREBOM PFGE I REP-PCR METODA GENETIC CHARACTERIZATION OF XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS ISOLATES FROM DIFFERENT HOSTS USING PFGE AND REP-PCR TECHNIQUES</b>	
Popović Tatjana.....	194
<b>BIODEGRADACIJA 2,6-DI-TERC-BUTILFENOLA POMOĆU OKSIGENAZA IZ PSEUDOMONAS AERUGINOSE SAN AI BIODEGRADATION OF 2,6-DI-TERT-BUTYLPHENOL BY OXYGENASES FROM PSEUDOMONAS AERUGINOSA SAN AI</b>	
Medić Ana .....	196
<b>MIKROBIOLOŠKA ISTRAŽIVANJA VODE LITORALNOG REGIONA OHRIDSKOG JEZERA MICROBIOLOGICAL INVESTIGATIONS OF THE WATER IN THE LITTORAL REGION OF LAKE OHRID</b>	
Lokoska Lenče .....	198
<b>MONITORING USEVA KROMPIRA NA PRISUSTVO RALSTONIA SOLANACEARUM MONITORING OF POTATO FIELDS TO PRESENCE OF RALSTONIA SOLANACEARUM</b>	
Marković Sanja .....	200
<b>ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ALCHEMILLA VULGARIS I FRANGULA ALNUS EKSTRAKATA NA ODABRANE BAKTERIJSKE SOJEVE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ALCHEMILLA VULGARIS AND FRANGULA ALNUS EXTRACTS ON SELECTED BACTERIAL STRAINS</b>	
Đukanović Stefana.....	202
<b>PSEUDOMONAS AERUGINOSA SAN AI METABOLIZAM U MIKROAEROBIM USLOVIMA U PRISUSTVU KADMIJUMA METABOLISM OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA SAN AI IN MICROAEROBIC CONDITIONS INDUCED BY CADMIUM PRESENCE</b>	
Rikalović G. Milena.....	204
<b>VARIJABILNOST PENICILLIUM GLABRUM PROUZROKOVAČA PLAVE TRULEŽI LUKOVICA CRNOG LUKA VARIABILITY OF PENICILLIUM GLABRUM CAUSAL AGENT OF BLUE MOLD OF ONION</b>	

<b>BULB</b>	
Duduk Nataša.....	206
<b>SESIJA: MIKROBIOLOGIJA HRANE</b>	
<b>SESSION: FOOD MICROBIOLOGY</b> .....	208
<b>PREDAVANJA PO POZIVU/ INVITED LECTURES</b> .....	208
<b>CLIMATE CHANGES AND FOODBORNE PATHOGENS</b>	
Najdenski M.Hristo .....	209
<b>OD KOMBUHE DO KAFE SA GLJIVAMA. ISPITIVANJE RAZLIČITIH VRSTA GLJIVA I NJIHOVA KORIST PO ZDRAVLJE</b>	
<b>FROM KOMBUCHA TO MUSHROOM COFFEE. INVESTIATION OF DIFFERENT MUSHROOMS AND THEIR BENEFIT FOR HEALTH</b>	
Nikšić Miomir.....	210
<b>ANALIZA REZULTATA ISPITIVANJA MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA NA PREHRAMBENIM PROIZVODIMA BILJNOG POREKLA, ISPITIVANIH U AKREDITOVANIM LABORATORIJAMA U PERIODU: 2010 - 2016. GODINA</b>	
<b>ANALYSIS OF THE RESULTS OF THE EXAMINATION OF MICROBIOLOGICAL PARAMETERS ON FOOD PRODUCTS OF VEGETABLE ORIGIN, EXAMINED IN ACCREDITED LABORATORIES IN THE PERIOD: 2010 - 2016</b>	
Vujovic Nenad.....	212
<b>KONTROLA VIRUSA KOJI SE PRENOSE HRANOM</b>	
<b>CONTROL OF FOODBORNE VIRUSES</b>	
Radin Dragoslava.....	214
<b>BIOLOŠKA ZAŠTITA HRANE (BIOPREZERVACIJA) - EKOLOŠKI PRISTUP POBOLJŠANJU BEZBEDNOSTI I PRODUŽENJU ROKA TRAJANJA HRANE</b>	
<b>BIOLOGICAL PROTECTION OF FOOD (BIOPRESERVATION) - ECOLOGICAL ACCESS TO FOOD SAFETY AND EXTENSION OF SHELF LIFE</b>	
Vesković Moračanin Slavica .....	216
<b>VIJABILNOST POTENCIJALNIH PROBIOTSKIH BAKTERIJA PRIMENJENIH U MLEČNIM I NEMLEČNIM PROIZVODIMA</b>	
<b>SURVIVAL OF POTENTIAL PROBIOTIC BACTERIA IMPLEMENTED IN DAIRY AND NON- DAIRY PRODUCTS</b>	
Radulović Zorica .....	218
<b>IN VITRO I IN VIVO PRIMENA PRIRODNIH ANTIMIKROBNIH AGENASA U KONTROLI RASTA MIKROORGANIZAMA U HRANI</b>	
<b>IN VITRO AND IN VIVO APPLICATION OF NATURAL ANTIMICROBAL AGENES IN THE CONTROL OF MICROORGANISM IN FOOD</b>	
Kocić- Tanackov Sunčica .....	220
<b>POTENTIAL IMPACT OF PROBIOTICS ON HUMAN HEALTH AND DISEASES</b>	
Taleski Vaso .....	222
<b>SESIJA: MIKROBIOLOGIJA HRANE II</b>	
<b>SESSION: FOOD MICROBIOLOGY II</b> .....	223
<b>USMENE PREZENTACIJE/ ORAL PRESENTATION</b> .....	223
<b>ANALIZA MIKROBIOLOŠKOG RIZIKA VAZDUHA U PREHRAMBENIM POGONIMA ATLANTIC GRUPE</b>	

<b>ANALYSIS OF MICROBIOLOGICAL RISK OF AIR IN FOOD PRODUCTION LINES IN PLANTS OF ATLANTIC GROUP</b> Petković Svetlana.....	224
<b>NALAZ PSEUDOMONAS SPP. U SIROVOM MLEKU OCCURRENCE OF PSEUDOMONAS SPP. IN RAW MILK</b> Savić Radovanović Radoslava .....	226
<b>INHIBICIJA RASTA BAKTERIJE ESCHERICHIA COLI DEJSTVOM BAKTERIJA MLEČNE KISELINE IZOLOVANIH IZ PETROVAČKE KOBASICE INHIBITION OF ESCHERICHIA COLI BY LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM PETROVAC SAUSAGE</b> Milićević Bojana .....	228
<b>AFLATOKSIN M1 U SIROVOM MLEKU SA PODRUČJA JUGOISTOČNOG DELA SRBIJE TOKOM 2017. GODINE AFLATOKSIN M1 IN RAW MILK IN THE AREA OF SOUTH EASTERN PART OF SERBIA DURING 2017</b> Manić Marija.....	230
<b>SESIJA: POSTER PREZENTACIJA INDUSTRIJSKA MIKROBIOLOGIJA SESSION:POSTER PRESENTATION INDUSTRY MICROBIOLOGY</b> .....	232
<b>ANTI-Campylobacter ACTIVITY OF PHYTOCHEMICAL FORMULATIONS FROM PLANTS, TRADITIONALLY USED AGAINST INTESTINAL DISORDERS</b> Šimunović Katarina .....	233
<b>ANTIMICROBIAL AND ANTIADHESION EFFECT OF SECONDARY PLANT METABOLITES AGAINST SPOILAGE STRAINS PSEUDOMONAS AND SHEWANELLA</b> Sterniša Meta.....	234
<b>ARE THEY AT RISK AND DO THEY KNOW? FOOD SAFETY KNOWLEDGE OF POULTRY MEAT CONSUMERS IN SLOVENIA</b> Sterniša Meta.....	235
<b>POREĐENJE ANTILISTERIJSKOG DEJSTVA KOMERCIJALNIH I AUTOHTONIH BAKTERIJA MLEČNE KISELINE U MODELU SIRA COMPARISON OF THE ANTILISTERIAL EFFECT OF COMMERCIAL AND AUTOCHTHONOUS LACTIC ACID BACTERIA IN THE CHEESE MODEL</b> Mirković Milica.....	236
<b>ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA KARANFILIĆA PREMA PATOGENIM BAKTERIJAMA U HRANI ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CLOVE ESSENTIAL OIL AGAINST FOOD-BORNE PATHOGENIC BACTERIA</b> Vukašinović Sekulić Maja.....	238
<b>PERZISTENTNOST HUMANOG NOROVIRUSA GENOGRUPE II U SIMULIRANIM GASTROINTESTINALNIM USLOVIMA I MODELU HRANE PERSISTENCE OF HUMAN NOROVIRUS GENOGROUP II UNDER SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS AND IN FOOD MODEL</b> Živković Ivana.....	240
<b>INDEX/INDEX AUTORA</b> .....	242

**PLENARNA SESIJA/**

**PLENARY SESSION:**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
sa međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO

## ORAL MICROBIOTA IN HEALTH AND DISEASE

Lazarević Vladimir

[vladimir.lazarevic@genomic.ch](mailto:vladimir.lazarevic@genomic.ch)

Genomic Research Laboratory, Service of Infectious Diseases, Geneva University Hospitals and Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland

**INTRODUCTION** Apical periodontitis is an inflammatory disease of the dental peri-radicular tissues caused by infected root canals. Primary apical periodontitis result from the microbial colonization of necrotic pulp tissues. Secondary apical periodontitis is caused by re-infected treated root canals.

**AIM** The aim of this study was to characterize the microbiota present in primary and secondary intra-radicular infections associated with apical periodontitis using 16S rRNA gene amplicon sequencing.

**METHODS USED** Extracted teeth exhibiting peri-radicular lesions and associated with either necrotic pulps or pre-existing radicular treatments were collected for microbial sampling. From each tooth, a dentin sample (control) and the intra-radicular content were subjected to DNA extraction. PCR amplicons of the V3-V4 region of the bacterial 16S rRNA gene were pooled and sequenced (2x300) on an Illumina MiSeq instrument. The bioinformatics analysis pipeline included quality filtering, merging of forward and reverse reads, clustering of reads into operational taxonomic units (OTUs), removal of putative contaminant OTUs and assigning taxonomy.

**RESULT** The most prevalent and abundant OTU in both dentin and root canal samples was assigned to anaerobic bacterium *Fusobacterium nucleatum*. Multivariate analysis showed clustering of microbiota by sample type (dentin vs intra-radicular content) and, in root canals, by pathology (primary vs secondary infection). The proportions of *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum* were respectively higher and lower when comparing secondary to primary infected root canals. Co-occurrence network analysis provided evidence of microbial interactions specific to the infection type.

**CONCLUSION** The identification of bacterial taxa differentially abundant in primary and secondary intra-radicular infections provides the basis for targeted therapeutic approaches aimed at reducing the risk of the secondary infection.

**KEYWORDS** periodontitis, oral bacteria, microbiome



**MENINGOKOK – STARI PATOGEN U NOVOM SVETLU**  
**MENINGOCOCCUS – OLD PATHOGEN IN A NEW LIGHT**

Delić Snežana  
[delic.snezana@gmail.com](mailto:delic.snezana@gmail.com)

Referentna laboratorija za meningokok i hemofilus, Zavod za javno zdravlje Sombor, Srbija

*Neisseria meningitidis* je striktno humani patogen koji kolonizuje nazofarinks 10-20% zdravih osoba. Invazivni sojevi izazivaju meningitis i/ili septikemiju sa smrtnim ishodom kod 5-10% lečenih pacijenata, a oko 20% preživelih ima ozbiljne posledice kao što su gubitak prstiju, ekstremiteta i neurološki deficit. Invazivna meningokokna bolest je značajan javno zdravstveni problem u celom svetu, sa oko 500.000 slučajeva i više od 50.000 smrtnih ishoda godišnje. Nakon prvih jasnih kliničkih opisa različitih epidemija meningitisa, u Ženevi 1805. i Nju Bedfordu, Masačusets, 1806. i njegove izolacije 1887. meningokok je danas prepoznat kao uzročnik bakterijskog meningitisa (endemski, klusterski, epidemijski i pandemijski), teške septikemije i ređe pneumonije, septičkog artritisa, perikarditisa, hronične bakterijemije i konjunktivitisa kod stotine hiljada osoba širom sveta svake godine.

Prema razlikama u građi kapsule, meningokok je podeljen na 13 serogrupa: A, B, C, D, H, I, K, L, W135, X, Y, Z, 29E.

Meningokokna bolest može pogoditi sve dobne grupe, ali su najviše stope bolesti u razvijenim zemljama zabeležene kod odojčadi i dece mlađe od 4 godine, adolescenata koji borave u zatvorenim kolektivima sa velikim brojem ljudi.

U odbrani od invazivne meningokone bolesti su ključni sistem komplementa, fagociti i humoralni imunitet.

Poznati faktori rizika za invazivnu meningokoknu bolest uključuju pušenje, boravak u sredini sa velikim brojem kliconoša, nedostatak terminalnih komponenti sistema komplementa, aspleniju, putovanja u epidemijska područja i deficijenciju manoza vezujućeg lektina.

*Neisseria meningitidis* poseduje brojne faktore virulencije, što je čini izrazito invazivnom bakterijom. Ove strukture su istovremeno i značajni antigeni koji se koriste u proizvodnji meningokokne vakcine. Trenutno su u upotrebi polisahardine, konjugovane i od skoro rekombinantne proteinske vakcine (za grupu B meningokoka). Engleska je prva zemlja u Evropi koja je u septembru 2015. godine uvela 4CMenB vakcinu u rutinski nacionalni program imunizacije dece.

U Srbiji je u periodu 2009-2017. godine, najzastupljenija serogrupa B (79.03%), zatim C (12.9%) i Y/W (8.06%). Apsolutni letalitet, CFR (case fatality ratio), za invazivnu meningokoknu bolest u posmatranom periodu je 6.45%. Predominantni PorA1 tipovi su 5-1 i 7.

Fenotipske i genotipske metode tipizacije meningokoknih izolata, kao i sojeva koji se ne mogu kultivisati od ključnog su značaja, kako za kvalitetan javno zdravstveni nadzor tako i kontrolu meningokokne bolesti. Evropsko udruženje za bolesti izazvane meningokokom i hemofilusom (The European Meningococcal and Haemophilus Disease Society, EMGM) je napravilo bazu (European Meningococcal Epidemiology in Real Time, EMERT) koja sadrži podatke o molekularnim tipovima (finetype, sequence types ST, klonalni kompleks, cc) invazivnih sojeva meningokoka koji cirkulišu u Evropi, u cilju razmene informacija između referentnih laboratorija (RL) u realnom vremenu.

## MENINGOCOCCUS – OLD PATHOGEN IN A NEW LIGHT

Delić Snežana

[delic.snezana@gmail.com](mailto:delic.snezana@gmail.com)

Center for Microbiology Reference Laboratory for Neisseria meningitidis and H. influenzae  
Public Health Institute Sombor, Serbia

*Neisseria meningitidis* is strictly a human pathogen, colonizing nasopharynx 10-20% of healthy individuals. Invasive strains cause meningitis and/or septicemia resulting in death in 5-10% of treated patients, and about 20% of the survivors have serious consequences such as loss of toes, limbs and neurologic deficit. Invasive meningococcal disease is a significant public health problem worldwide, with approximately 500,000 cases and over 50,000 deaths annually.

After the first clear clinical descriptions of the meningitis epidemic, Geneva in 1805, and New Bedford, MA, in 1806, and its isolation in 1887, meningococcus is today recognized as the causative agent of bacterial meningitis (endemic, cluster, epidemic and pandemic), severe septicemia and rarely pneumonia, septic arthritis, pericarditis, chronic conjunctivitis and bacteremia in hundreds of thousands of people worldwide every year.

Meningococcus is divided into 13 serogroups based on the difference in the construction of the capsule: A, B, C, D, H, I, K, L, W135, X, Y, Z, 29 E.

Meningococcal disease can affect all age groups, but the highest rates of the disease in developed countries are recorded in infants and children younger than 4 years, adolescents in closed collectives with a large number of people.

Antibody, complement and phagocytes are the main mechanisms of host defense needed to protect the organism from the invasive meningococcal disease.

Known risk factors for invasive meningococcal disease include smoking, staying in the middle of a large number of carriers, the lack of terminal complement components, asplenia, travelling to epidemic areas and mannose binding lectin deficiency.

*Neisseria meningitidis* possesses many virulence factors, which makes it an extremely invasive bacteria. These structures are also important antigens that are used in the manufacture of the meningococcal vaccine.

There are currently in use polysaccharide, conjugated and of nearly the recombinant protein vaccine (group B meningococcus). The United Kingdom introduced 4CMenB into its national routine childhood immunization programme in September 2015.

The most frequent meningococcal serogroup in Serbia, in the period 2009-2017 is B (79.03%), C (12.9%), and Y / W (8.06%). CFR (case fatality ratio), for invasive meningococcal disease in the reporting period is 6.45%. Predominant PorA1 types are 5-1 and 7.

Phenotypic and genotypic methods of typing meningococcal isolates or non-cultured samples are essential, both for the quality of public health surveillance and for the control of meningococcal disease.

EMGM (The European Meningococcal and Haemophilus Disease Society) developed EMERT-European Meningococcal Epidemiology and Real Time database in order to exchange information between reference laboratories (RL) in real time, about fine type, sequence type, ST and clonal complex, cc, of invasive meningococcal isolates circulating in Europe.

**ALTERNATIVNE METODE U KONTROLI LEGIONELOZA  
AN ALTERNATIVE WAY TO CONTROL LEGIONELLA INFECTION**

Gobin Ivana <sup>1</sup>

Begić Gabrijela <sup>1</sup>, Lesar Andrija <sup>1</sup>, Malatesti Nela <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Rijeka, Croatia

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, University of Rijeka, Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka, Croatia

*Legionella pneumophila* je sveprisutna u prirodnim i antropogenim vodenim sistemima, u kojima je sposobna da preživi dugoročno u okviru biofilma ili sa različitim slobodno živećim amebama. Kako bi se sprečio rast *L. pneumophila*, koriste se različiti tretmani vode (npr. fizički, termički i hemijski). Problem je u tome što ovaj oportunistički patogen vodenih sistema često preživi standardnu dezinfekciju i ne biva ispran iz cevi usled formiranja biofilma i usled preživljavanja slobodno živećih ameba. Zbog toga je neophodno istražiti nove metode uništavanja legionele u biofilmu, ali i u amebama. Cilj ovog rada je predložiti dva nova pristupa u kontroli legioneloza. Jedan pristup je korišćenje prirodnih supstanci kao što su etarska ulja (pojedinačno ili u kombinaciji), a drugi pristup je fotodinamička terapija (PDT) mikroorganizama korišćenjem sintetičkih boja i porfirina. U našem istraživanju testirana je interakcija različitih etarskih ulja iz primorskog regiona Hrvatske. Za različite kombinacije etarskih ulja pokazali smo sinergistički efekat na planktonske organizme, ali i na sesilne bakterije u biofilmu. Fotodinamička terapija (PDT), zasnovana na citotoksičnom dejstvu singlet kiseonika i drugih reaktivnih vrsta kiseonika (ROS), proizvedena nakon vidljive ekspresije fotosenzibilizatora (PS), pokazala je potpunu inaktivaciju legionele u sterilnoj vodovodskoj vodi u veoma niskoj koncentraciji od 0.024  $\mu\text{M}$ . Test vezivanja fotosenzibilizatora na bakterijsku ćeliju pokazao je da se ispitani PS vezuje za bakterijsku ćeliju već nakon 10 minuta inkubacije u mraku. U zaključku, etarska ulja i drugi prirodni anti-*Legionella* molekuli mogu da obezbede nove ekološke i alternativne načine u borbi protiv ovog važnog patogena vodovoda i mogu se koristiti u sistemima sa toplom vodom, poput kupatila, spa bazena, toplih kada ili čak u bazenima za negu stopala. Fotodinamička terapija pokazuje veoma dobar potencijal i može se koristiti u tretmanu tehnoloških i sistema otpadnih voda.

**KLJUČNE REČI:** *Legionella*, etarska ulja, fotodinamička terapija

## AN ALTERNATIVE WAY TO CONTROL LEGIONELLA INFECTION

Gobin Ivana <sup>1</sup>

Begić Gabrijela <sup>1</sup>, Lesar Andrija <sup>1</sup>, Malatesti Nela <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Rijeka, Croatia

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, University of Rijeka, Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka, Croatia

*Legionella pneumophila* is ubiquitous in natural and anthropogenic water systems, in which it is able to survive for long periods within biofilms or within various free-living amoebae. In order to restrain *L. pneumophila* growth, various water systems treatments are used (e.g., physical, thermal, and chemical). The problem is that this opportunistic premise plumbing pathogen often survive standard disinfection and is not washed out of pipes because of biofilm-formation and survival within free-living amoebae. It is therefore necessary to explore new methods for destroying *Legionella* in biofilm and within amoeba. The aim of this work is to propose two new approaches in controlling *Legionella* infections. One approach is the use of natural substances such as essential oils (individually or in combination) and another approach is photodynamic therapy (PDT) of microorganisms using synthetic dyes and porphyrins. In our research the interaction of different essential oils from the coastal region of Croatia were tested. For various combinations of essential oils, we have proved to have a synergistic effect on planktonic and sessile bacteria in biofilm. Photodynamic therapy (PDT), based on cytotoxic action of singlet oxygen and other reactive oxygen species (ROS), produced upon the visible light-excitation of a photosensitizer (PS), showed complete inactivation of *Legionella* in sterile tap water in very low concentration of 0.024  $\mu\text{M}$ . The photosensitizer uptake assay has shown that this PS binds to the bacterial cell, already after 10 minutes of incubation in the dark. To conclude, EO and other natural anti-*Legionella* molecules described could provide new eco-friendly and alternative ways to struggle against this important pathogen in plumbing and could be used in hot water systems like baths, spa pools, hot tubs, or even foot baths/whirlpools. Photodynamic therapy shows very good potential and could be used in treatment of technological and waste water systems.

**KEY WORDS:** *Legionella*, essential oils, photodynamic therapy

**SESIJA: PARAZITOLOŠKO -**

**MIKOLOŠKA**

**SESSION: PARASITOLOGY-**

**MYCOLOGY**

**PREDAVANJA PO POZIVU/**

**INVITED LECTURES**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
sa međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO

**POJAVA REZISTENCIJE GLJIVA NA EHINOKANDINE  
EMERGENCY OF ECHINOCANDIN RESISTANCE IN FUNGI**

Mitrović Sanja  
[sanja.mitrovic@med.bg.ac.rs](mailto:sanja.mitrovic@med.bg.ac.rs)

Čolović-Čalovski Ivana, Dubljanin Eleonora

Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**UVOD:** Ehinokandini pokazuju *in vitro* fungicidnu aktivnost u odnosu na većinu vrsta *Candida*. Pokazuju antimikotičnu aktivnost inhibirajući enzim glukon sintazu koju kodiraju tri odgovarajuća gena (*FKS1*, *FKS2* i *FKS3*). Niska toksičnost i dobre farmakokinetičke osobine su razlozi zbog čega su preporučeni kao lekovi prvog izbora za lečenje invazivne kandidijaze.

**CILJ:** Rezistencija na ehinokandine raste poslednjih godina, a cilj ovog predavanja je da prikaže epidemiologiju, mehanizme nastanka, metode za otkrivanje i kliničke posledice rezistencije.

Sadašnja saznanja – Rezistencija na ehinokandine je nađena kod većine klinički značajnih vrsta *Candida*. Neke od njih su urođeno manje osetljive usled urođenih polimorfizama ciljnih protein, a kod nekih je došlo do nastanka stečene rezistencije. Najčešće su rezistentni sojevi *C. glabrata*, čija rezistencija u pojedinim ustanovama prevazilazi 10%. Uglavnom se uočava posle 3–4 nedelje primene i povezana je sa lošim ishodom. Utvrđen je dugačak spisak mutacija u određenim regionima ciljnih gena povezanih sa smanjenom osetljivošću. Postoje standardizovane metode antimikograma kojima mogu da se detektuju rezistentni sojevi, kao i neke komercijalne metode (E-test, VITEK sistem, MALDI-TOF).

**ZAKLJUČAK :** Rezistencija na ehinokandine se javlja sve češće i zahteva primenu testova za ispitivanje osetljivosti, posebno za sojeve izolovane od pacijenata koji su prethodno bili lečeni ovim lekovima. Neophodan je dalji razvoj brzih i komercijalnih metoda antimikograma. Praćenje antifungalne osetljivosti je neophodno da bi se selektivni pritisak sveo na minimum. Naime, korišćenje ehinokandina u profilaksi i terapiji povećava selektivni pritisak za nastanak rezistencije i povezano je sa promenama u distribuciji vrsta, pre svega *C. glabrata*, izazivača invazivnih gljivičnih bolesti.

**KLJUČNE REČI:** ehinokandini, rezistencija, *Candida*

## EMERGENCY OF ECHINOCANDIN RESISTANCE IN FUNGI

Mitrović Sanja

[sanja.mitrovic@med.bg.ac.rs](mailto:sanja.mitrovic@med.bg.ac.rs)

Čolović-Čalovski Ivana, Dubljanin Eleonora

Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

**INTRODUCTION:** The echinocandins display *in vitro* fungicidal activity against most *Candida* species. They exhibit their antifungal activity via inhibition of the enzyme glucan synthase encoded by three genes (*FKS1*, *FKS2* and *FKS3*). Their attractive tolerability and pharmacokinetic profiles are reason because they have been recommended as first line agents for invasive candidiasis.

**PURPOSE OF REVIEW:** Echinocandin resistance has emerged over the recent years. The aim of this lecture to review epidemiology, mechanisms, methods for detection and their clinical implications.

Recent findings - Echinocandin resistance has been found in most clinically relevant *Candida* spp. Some of them are inherently less susceptible due to naturally occurring polymorphisms in the target protein and some of them have acquired resistance. The most common resistant are strains of *C. glabrata* with rates exceeding 10% at selected institutions. It is most commonly detected after 3–4 weeks of treatment and is associated with a dismal outcome. An large list of mutations in hot-spot regions of the target genes with loss of susceptibility has been characterized. The antifungal susceptibility testing reference methods identify echinocandin resistant isolates. Also, there are some commercial methods (E-test, VITEK system, MALDI-TOF).

**SUMMARY:** Echinocandin resistance is an increasingly encountered and requires susceptibility testing particularly in patients with prior exposure. The further development of rapid and commercially available susceptibility tests is important. Keeping up of antifungal susceptibility is necessary in order to minimize selection pressure. Namely, the use of the echinocandins for prophylaxis and treatment enhanced drug exposure and increased selection pressure for resistance and has been linked with altered species distribution, especially *C. glabrata*, in invasive infections.

**KEYWORDS:** echinocandins, resistance, *Candida*

**PCR U DIJAGNOSTICI SISTEMSKE ASPERGILOZE  
PCR IN DIAGNOSIS OF SYSTEMIC ASPERGILLOSIS**

Čolović Čalovski Ivana <sup>1</sup>

[ivana.colovic-calovski@med.bg.ac.rs](mailto:ivana.colovic-calovski@med.bg.ac.rs)

Mitrović Sanja<sup>1</sup>, Mijatović Stefan<sup>1</sup>, Džamić M Aleksandar<sup>1</sup>

Laboratorija za parazitologiju-mikologiju, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Sistemska, invazivna aspergiloza (IA) kao diseminovana bolest najčešće pogađa bolesnike na hemoterapiji sa prolongiranom granulocitopenijom. Uprkos napretku u dijagnostičkim metodama i terapiji, mortalitet ovog oboljenja je i dalje veliki, naročito kod imunokompromitovanih bolesnika.

Već godinama postoje jasni EORTC (European Organization for Research and Treatment Of Cancer) kriterijumi koji prepoznaju tri dijagnostičke kategorije IA. Za kategoriju dokazane IA neophodan je pozitivan histopatološki preparat i/ili izolacija kulture plesni. Jedan od osnovnih dijagnostičkih kriterijuma za verovatnu IA je dokaz prisustva antigena galaktomanana u uzorku. Kategorija moguće IA uključuje pacijente kod kojih postoje odgovarajući faktori domaćina kao i adekvatna klinička slika, ali nema mikološke potvrde aspergiloze.

S obzirom da je u kliničkoj praksi često teško dobiti odgovarajući bioptat na osnovu koga bi se postavila dijagnoza dokazane IA, kao i da kultivisanje ima nisku osetljivost, dokazivanje antigena u uzorku krvi je metoda koja se danas najčešće koristi u dijagnostičke svrhe. Osetljivost testa za detekciju antigena je različita u odnosu na ispitivanu grupu pacijenata i iznosi od 44-90%. Osetljivost ovakvih testova kod pacijenata sa hematološkim malignitetima je veća nego kod drugih vrsta imunosupresije, ali kod pacijenata na terapiji antimikoticima može da da lažno negativne rezultate. PCR kao metoda za dijagnozu IA još uvek nije u širokoj upotrebi, s obzirom da su testovi tek nedavno standardizovani za rutinsku laboratorijsku dijagnostiku. Za sada, prve preporuke pokazuju da je najbolje koristiti kombinaciju detekcije galaktomanana i PCR i da ovakvom kombinacijom testova osetljivost novootkrivenih obolelih iznosi 98%. Prednost Real-Time PCR testa je u tome što može da dijagnostikuje izazivača do nivoa vrste, tako što razlikuje četiri najčešća izazivača: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* i *A. terreus*, dok uzorci mogu da budu krv, plazma, serum, sputum, BAL i likvor.



## PCR IN DIAGNOSIS OF SYSTEMIC ASPERGILLOSIS

Čolović Čalovski Ivana<sup>1</sup>

[ivana.colovic-calovski@med.bg.ac.rs](mailto:ivana.colovic-calovski@med.bg.ac.rs)

Mitrović Sanja<sup>1</sup>, Mijatović Stefan<sup>1</sup>, Džamić M Aleksandar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Parasitology-Mycolology, Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

Systemic, invasive aspergillosis (IA) as disseminated disease is particularly common among patients with prolonged granulocytopenia following chemotherapy. Despite advances in the diagnosis and treatment, mortality rates remain high, especially among immunosuppressed host. More than decade EORTC (European Organization for Research and Treatment Of Cancer) define clear criteria for three diagnostic categories of IA. For category of proven IA, positive histopathological preparation and/or recovery of mold by culture is necessary. One of the basic diagnostic criteria for probable IA is detection of galactomannan antigen in specimen. The category of possible IA include cases with appropriate host factors and with sufficient clinical evidence, but for which there was no mycological support.

Given the challenges of obtaining tissue and the variable yield of cultures, antigen detection in blood sample is the most frequently used laboratory method nowadays. The sensitivity of antigen detection testing is variable, 44-90% and depends on the host. The sensitivity in patients with hematologic malignancy is higher than in those with lesser degrees of immunosuppression, and patients on antifungal therapy may have falsely negative galactomannan results.

To date, PCR testing has not been widely adopted due to a lack of standardization for routine laboratory use. However, data continue to emerge suggesting the usefulness of combined PCR and galctomannan testing and, in that combination sensitivity can reach 98%. Real-Time PCR test can diagnose cause of IA in species level, because it can distinguish four most common aspergilli: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* and *A. terreus*, while samples such as blood, plasma, sera, sputum, BAL and CSF can be used.

**BLASTOCYSTIS HOMINIS: ZAGONETNI I JOŠ UVEK ZANEMARENI PARAZIT**  
**BLASTOCYSTIS HOMINIS: PUZZLING AND STILL OVERLOOKED**

Miladinović-Tasić Nataša

[nmiltasic@yahoo.com](mailto:nmiltasic@yahoo.com)

Institut za javno zdravlje Niš, Srbija

Blastocistoza je oboljenje ljudi uzrokovano vrstom *Blastocystis hominis* (*B. hominis*). Ova anaerobna, jednoćelijska protozoa, često je prisutna u uzorcima stolice ljudi i/ili životinja, mada još uvek nije razjašnjeno da li je u pitanju komensal ili patogen. Stanovnici zemalja u razvoju imaju veću prevalenciju blastocistoze, ali od nje nisu pošteđene ni ekonomski razvijene zemlje. Zastupljenost ove parazitoze varira kako između samih država, tako i između pojedinih populacionih grupa unutar jedne države.

Taksonomija *B. hominis* je i dalje diskutabilna. Zbog genetske raznovrsnosti predlaže se da se naziv *B. hominis* zameni sa *Blastocystis species*. Do danas je objavljeno 17 subtipova i definitivna karakterizacija *Blastocystis spp.* moguća je jedino na molekularnom nivou.

Parazit se prenosi feko-oralnim putem. Ustanovljena je raznovrsnost domaćina i prenos sa životinje na čoveka i obrnuto. Najčešće manifestacije infekcije su od strane digestivnog trakta. Dovodi se u vezu sa sindromom razdražljivih creva (eng. *irritable bowel*, IBS), nespecifičnim kolitisom, hroničnom inflamatornom bolešću creva (eng. *chronic inflammatory bowel disease*, HIBD) i urtikarijom.

Dijagnoza se može postaviti primenom metode konvencionalne mikroskopije (KVM), fazno kontrastne i elektronske mikroskopije, kultivacije, serodijagnostike i primenom molekularnih metoda. Infekcija ovim parazitom ne zahteva uvek lečenje. Kod simptomatskih bolesnika lek prvog izbora je metronidazol.

Potrebna su dalja istraživanja da se razreše nedoumice u vezi ovog zagonetnog i još uvek zanemarenog parazita.

**KLJUČNE REČI:** *Blastocystis hominis*, dijagnostika, lečenje

## BLASTOCYSTIS HOMINIS: PUZZLING AND STILL OVERLOOKED

Miladinović-Tasić Nataša

[nmiltasic@yahoo.com](mailto:nmiltasic@yahoo.com)

Public Health Institute Niš, Serbia

Blastocystosis is a human disease caused by *Blastocystis hominis* (*B. hominis*) species. This anaerobic, single celled protozoan, is often present in human and/or animal stool samples, although it has not been elucidated yet whether it is a commensal or a pathogen. Blastocystosis is more prevalent in the populations of developing countries, but socioeconomically well developed countries are not spared either. The prevalence of this parasitosis varies both between different countries and between different populations within a country.

The taxonomy of *B. hominis* is still debated. Due to its genetic diversity it has been suggested that the term *B. hominis* should be replaced with *Blastocystis species*. So far, 17 subtypes have been described and a definitive characterization of *Blastocystis spp.* is possible only at the molecular level.

The parasite is transmitted by the fecal-oral route. Host diversity and animal-to-human and human-to-animal transmission have been established. The most common manifestations of the infection are gastrointestinal in nature. It is often associated with irritable bowel syndrome (IBS), non-specific colitis, chronic inflammatory bowel disease (HIBB) and urticaria.

The diagnosis can be established using the methods of conventional microscopy (CM), phase-contrast and electron microscopy, cultivation, serodiagnosis, and molecular methods. An infection with this parasite does not always require treatment. In symptomatic patients, metronidazole is the drug of first-choice.

Further studies are warranted to resolve the present dilemmas concerning this puzzling and still largely overlooked parasite.

**KEY WORDS:** *Blastocystis hominis*, diagnosis, therapy

**NALAZ GLJIVA KOD PACIJENATA SA GLJIVIČNIM RINOSINUZITISIMA I SINONAZALNOM  
POLIPOZOM – NAŠA ISKUSTVA  
FINDING OF FUNGI IN PATIENTS WITH FUNGAL RHINOSINUSITIS AND SYNONAL  
POLYPOSIS - OUR EXPERIENCES**

Dubljanin Eleonora <sup>1</sup>

[eleonoraratkov@yahoo.com](mailto:eleonoraratkov@yahoo.com)

Trivić A<sup>2</sup>, Cvetković M<sup>1</sup>, Mijatović S<sup>1</sup>, Džamić A<sup>1</sup>, Mitrović S<sup>1</sup>, Čolović Čalovski I<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta U Beogradu

<sup>2</sup>Klinika za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju, Klinički centar Srbije

**UVOD:** Gljivični rinosinuzitisi predstavljaju hroničnu inflamaciju sluzokože paranazalnih sinusa koja nastaje kao posledica gljivične infekcije. Smatra se da oko 4% odrasle populacije u svetu pati od značajnog pada kvaliteta života usled ove bolesti. Kao posledica hronične inflamacije kod ovih pacijenata mogu se javiti i nazalni polipi usled ozbiljne eozinofilne inflamacije. Najčešći izazivači su *Mucormycetes*, *Aspergillus* spp. mada mnoge duge gljive mogu biti izazivači.

**CILJ** našeg rada je bila laboratorijska dijagnoza gljiva u uzorcima sinonazalnih polipa nakon hirurškog odstranjivanja kod pacijenata sa hroničnim gljivičnim rinosinuzitisima.

**METOD:** Istraživanje je obuhvatilo 7 pacijenata sa hroničnim gljivičnim rinosinuzitisima kod kojih je ustanovljeno postojanje sinonazalne polipoze. Na osnovu kliničkog prapredla od strane specijaliste otorinolaringologije postavljena je sumnja na gljivičnu etiologiju. Kod svih pacijenata je izveden operativni zahvat i odstranjeno tkivo polipa je poslato na mikološki pregled. Uzorci su mehanički homogenizovani i zasejavani na SDA, PDA i tečni SDA i inkubirani tokom 5-7 dana na 25°C i 37°C. Posle porasta gljiva na mikološkim podlogama vršena je identifikacija na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika izolovanih gljiva.

**REZULTATI:** Od sedam pacijenata sa kliničkom sumnjom na hronični gljivični rinosinuzitis sa sinonazalnom polipozom, kod 3 pacijenta su izolovane gljive. Kod 2 pacijenata izolovane su gljive iz grupe mukormiceta (*Rhizopus* i *Mucor*), a kod jednog pacijenata *Scedosporium* spp. Kod jednog pacijenta koji je bio negativan na nalaz gljiva uočene su filamentozne bakterije *Actinomyces* spp.

**ZAKLJUČAK:** Hronični gljivični rinosinuzitis sa nazalnom polipozom zahtevaju ozbiljan dijagnostički pristup. Usled česte gljivične kolonizacije sinonazalnih šupljina uloga gljiva u nastanku ovog stanja je još uvek kontroverzna. Zbog mogućeg agresivnog toka bolesti i propagacije gljiva u okolne strukture neophodna je laboratorijska potvrda infekcije kao preduslov za pravilan izbor terapije i poboljšanje ishoda lečenja.

**KLJUČNE REČI:** sinonazalna polipoza, gljive, *Mucormycetes*, hronični gljivični rinosinuzitis

FINDING OF FUNGI IN PATIENTS WITH FUNGAL RHINOSINUSITIS AND SYNONAL  
POLYPOSIS - OUR EXPERIENCES

Dubljanin Eleonora <sup>1</sup>

[eleonoraratkov@yahoo.com](mailto:eleonoraratkov@yahoo.com)

Trivić A<sup>2</sup>, Cvetković M<sup>1</sup>, Mijatović S<sup>1</sup>, Džamić A<sup>1</sup>, Mitrović S<sup>1</sup>, Čolović Čalovski I<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade

<sup>2</sup>Clinic for otorhinolaryngology and maxillofacial surgery, Clinical Center of Serbia

**INTRODUCTION:** Fungal rhinosinusitis is a chronic inflammation of the mucous membrane of paranasal sinuses that occurs as a result of fungal infection. It is estimated that about 4% of the adult population in the world suffers from a significant decrease in quality of life due to this disease. As a consequence of chronic inflammation in these patients, nasal polyps can also occur due to serious eosinophilic inflammation. The most common causative agents are Mucormycetes, *Aspergillus* spp. although many other fungi can be causative agents.

**THE AIM** of our study was laboratory diagnosis of fungi in samples of synonasal polyps after surgical removal in patients with chronic fungal rhinosinusitis.

**METHOD:** The study included 7 patients with chronic fungal rhinosinusitis in whom the existence of synonasal polyposis was established. Based on clinical examination by a specialist in otorhinolaryngology, there was a suspicion of fungal etiology. In all patients, an operative procedure was performed and the tissue removed from the polyps was sent to the mycological examination. The samples were mechanically homogenized and seeded on SDA, PDA and liquid SDA and incubated for 5-7 days at 25°C and 37°C. After the growth of fungi on mycological media, identification was made on the basis of macroscopic and microscopic characteristics of isolated fungi.

**RESULTS:** Out of seven patients with clinical suspicion of chronic fungal rhinosinusitis with synonasal polyposis, in 3 patients were isolated fungi. In two patients Mucormycetes (*Rhizopus* and *Mucor*) were isolated, and in one patient *Scedosporium* spp. In the case of one patient who was negative for the finding of fungi, *Actinomyces* spp. filamentous bacteria were observed.

**CONCLUSION:** Chronic fungal rhinosinusitis with nasal polyposis require a serious diagnostic approach. Due to the frequent fungal colonization of synonasal cavities, the role of fungi in the onset of this condition is still controversial. Because of the possible aggressive course of the disease and the propagation of fungi in the surrounding structures, laboratory confirmation of infection is a prerequisite for the correct choice of therapy and improvement of the outcome of treatment.

**KEY WORDS:** synonasal polyposis, fungi, Mucormycetes, chronic fungal rhinosinusitis

**SESIJA: PARAZITOLOŠKO-  
MIKOLOŠKA**

**SESSION: PARASITOLOGY-  
MYCOLOGY**

**USMENE PREZENTACIJE/ ORAL  
PRESENTATION**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
sa međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO

**ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI IZOLATA CANDIDA SPP. IZ HEMOKULTURA NA DERIVATE  
AZOLA I KASPOFUNGIN DISK DIFUZIONOM I BUJON MIKRODILUCIONOM METODOM  
SUSCEPTIBILITY TESTING OF CANDIDA SPP. ISOLATES FROM HEMOCULTURES TO AZOLES  
AND CASPOFUNGIN BY DISC DIFFUSION AND BROTH MICRODILUTION METHODS**

Mijatović Stefan <sup>1</sup>

[stefanmijat@hotmail.com](mailto:stefanmijat@hotmail.com)

Dorđević Tamara<sup>2</sup>, Cvetković Milan<sup>1</sup>, Dubljanin Eleonora<sup>1</sup>, Čolović Čalovski Ivana<sup>1</sup>, Mitrović  
Sanja<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorija za parazitologiju-mikologiju, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski  
fakultet Univerziteta u Beogradu

<sup>2</sup>Univerzitetska dečija klinika-Tiršova, Beograd

**UVOD:** Invazivna kandidijaza, praćena kandidemijom čest je nalaz kod pacijenata na odeljenjima intenzivne nege. Blagovremena laboratorijska dijagnostika i lečenje su ključni u smanjenju mortaliteta. U inicijalnoj terapiji najčešće se koriste antimikotici iz grupe ehinokandina (kaspofungin, mikafungin, anidulafungin), azola (flukonazol, vorikonazol) i amfotericin B.

**CILJ:** Ispitivanje osetljivosti na antimikotike kvasnica iz roda *Candida* izolovanih iz krvi pacijenata sa odeljenja intenzivne nege opšte hirurgije, hematologije, pedijatrije i neonatologije.

**METOD:** Ispitivanjem je obuhvaćeno 33 kliničkih izolata. Identifikacija je vršena klasičnim metodama, upotrebom CHROMagar i VITEK2 sistemom. Osetljivost na derivate azola ispitivana je disk difuzionom metodom po preporukama CLSI, dok je osetljivost na kaspofungin ispitivana bujon mikrodilucionom metodom. Osetljivost na kaspofungin izveštavana je na osnovu poređenja rezultata sa vrednostima dobijenih u drugim istraživanjima, CLSI preporukama, kao i vrednostima datim za sistem VITEK2, jer se po EUCAST preporukama osetljivost na kaspofungin izveštava na osnovu osetljivosti na mikafungin i anidulafungin.

**REZULTATI:** 33% (11/33) izolata pripadalo je vrsti *Candida albicans*, dok je 67% (22/33) pripadalo non-*albicans* vrstama. Osetljivost na amfotericin B kod izolata *C. albicans* utvrđena je kod 91% sojeva, na mikonazol 91%, ketokonazol 82%, flukonazol 82% i vorikonazol 82%, za razliku od non-*albicans* izolata čija je osetljivost na amfotericin B utvrđena kod 91% sojeva, na mikonazol 63%, ketokonazol 95%, flukonazol 59% i vorikonazol 95%. Za većinu sojeva *C. albicans* (92%) vrednost MIK<sub>50</sub> za kaspofungin bila je <0,5 µg/ml, dok je kod 55% non-*albicans* sojeva vrednost MIC<sub>50</sub> bila >0,5 µg/ml. Najveće vrednosti MIK<sub>50</sub> utvrđeni su kod *C. krusei* (4 µg/ml), *C. parapsilosis* (4 µg/ml) i *C. glabrata* (2 µg/ml).

**ZAKLJUČAK:** Pojava sve češće rezistencije *C. albicans* na flukonazol i vorikonazol, kao i veće vrednosti MIK<sub>50</sub> za kaspofungin kod non-*albicans* vrsta, značajni su preduslovi u planiranju terapije invazivne kandidijaze. Posebno je značajna identifikacija kandidate do nivoa vrste pri uvođenju ehinokandina u terapiju.

**KLJUČNE RECI:** kandidemija, azoli, kaspofungin.

**SUSCEPTIBILITY TESTING OF *CANDIDA* SPP. ISOLATES FROM HEMOCULTURES TO AZOLES AND CASPOFUNGIN BY DISC DIFFUSION AND BROTH MICRODILUTION METHODS**

Mijatović Stefan <sup>1</sup>

[stefanmijat@hotmail.com](mailto:stefanmijat@hotmail.com)

Dorđević Tamara<sup>2</sup>, Cvetković Milan<sup>1</sup>, Dubljanin Eleonora<sup>1</sup>, Čolović Čalovski Ivana<sup>1</sup>, Mitrović Sanja<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Parasitology-Mycolology, Institute for Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade

<sup>2</sup>University Children's Hospital-Tiršova, Belgrade

**BACKGROUND:** Invasive candidiasis with candidemia is common among intensive care units patients. Timely laboratory diagnosis and treatment are crucial for decreasing mortality. In the initial therapy, mostly used antimycotics are echinocandins (caspofungin, micafungin, anidulafungin), azoles (fluconazole, voriconazole) and amphotericin B.

**OBJECTIVE:** Antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. isolated from blood of intensive care units patients (Surgery, Hematology, Pediatrics and Neonatology).

**METHOD:** The study included 33 clinical isolates. Identification was done using conventional methods, CHROMagar and VITEK2 system. Susceptibility to azole derivatives was tested with disc diffusion method according to CLSI recommendations, while susceptibility to caspofungin was tested by broth microdilution method. Caspofungin sensitivity was reported based on values obtained in other studies, CLSI recommendations and values given to the VITEK2 system, because according to EUCAST recommendations, susceptibility to caspofungin is reported based on sensitivity to micafungin and anidulafungin.

**RESULTS:** 33% (11/33) of the isolates belonged to the *Candida albicans*, while 67% (22/33) belonged to non-*albicans* species. The sensitivity of *C. albicans* isolates to amphotericin B was noticed in 91% of strains, 91% for miconazole, ketoconazole 82%, fluconazole 82% and for voriconazole 82%, unlike non-*albicans* isolates whose susceptibility to amphotericin B was determined in 91% strains, miconazole 63%, ketoconazole 95%, fluconazole 59% and voriconazole 95%. For most strains of *C. albicans* (92%), MIK<sub>50</sub> for caspofungin was <0.5 µg/ml, while in 55% non-*albicans* strains, MIC<sub>50</sub> value was >0.5 µg/ml. The highest values of MIK<sub>50</sub> were found in *C. krusei* (4 µg/ml), *C. parapsilosis* (4 µg/ml) and *C. glabrata* (2 µg/ml).

**CONCLUSION:** The increase of *C. albicans* resistance to fluconazole and voriconazole and higher MIK<sub>50</sub> values for caspofungin in non-*albicans* species are important for planning of invasive candidiasis therapy. The identification of *Candida* to the species level is important when introducing echinocandins in therapy.

**KEYWORDS:** candidemia, azoles, caspofungin



**LABORATORIJSKA I EPIDEMIOLOŠKA EVALUACIJA PACIJENATA SA OTOMIKOZOM  
LABORATORY AND EPIDEMIOLOGICAL EVALUATION OF PATIENTS WITH OTOMYCOSIS**

Cvetković Milan<sup>1</sup>

[milan.cvetkovic@med.bg.ac.rs](mailto:milan.cvetkovic@med.bg.ac.rs)

Jovanović Milena<sup>2</sup>, Stojanović Sandra<sup>3</sup>, Dubljanin Eleonora<sup>1</sup>, Čolović Čalovski Ivana<sup>1</sup>, Džamić M. Aleksandar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorija za parazitologiju-mikologiju, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd

<sup>2</sup>ORL odeljenje, Opšta bolnica, Pančevo

<sup>3</sup>ORL Klinika, KBC „Zvezdara“, Beograd

**UVOD:** Otomikoza je gljivična infekcija spoljašnjeg ušnog kanala, koja čini oko 10% infekcija ove regije. Najčešći uzročnici su *Aspergillus* i *Candida*. Određeni faktori, kao što su trauma spoljašnjeg slušnog hodnika i vlaženje, povećavaju rizik za nastanak otomikoze. Terapija podrazumeva korišćenje antimikotika iz grupe azola i poliena.

**CILJ:** Utvrđivanje uzročnika i ispitivanje njihove osetljivosti na antimikotike *in vitro* izolovanih od pacijenata sa suspektnom otomikozom u Beogradu i Pančevu.

**METOD:** Studija preseka sprovedena u periodu od marta 2007. do juna 2014. godine, obuhvatila je 322 pacijenta sa dijagnozom otitis externa, iz dva medicinska centra, Gradske bolnice KBC „Zvezdara“, Beograd i Opšte bolnice Pančevo. Anketom su dobijeni podaci o faktorima rizika. Otoskopskim pregledom postavljena je sumnja na otomikozu. Mikroorganizmi su izolovani i identifikovani standardnim mikološkim procedurama. Osetljivost na antimikotike ispitivana je disk difuzionim metodom zasnovanim na CLSI dokumentima i uputstvima proizvođača diskova, korišćenjem antimikotika iz grupe azola i poliena.

**REZULTAT:** Gljive su utvrđene kao uzročnici 18,3% (59/322) infekcija. Najčešće su izolovani *Aspergillus* (67,8%) i to *A. niger* (68,9%), kao i *Candida* (25,6%) i to *C. albicans* (65,2%). Ostali izolati pripadali su rodovima *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Scopulariopsis* i *Fusarium*. Prosečna starost pacijenata sa otomikozom bila je pedeset godina. Povreda je prethodila nastanku infekcije u 35,1% slučajeva. Gljive iz roda *Aspergillus* pokazale su bolju osetljivost na antimikotike (74,2%) u odnosu na ostale plesni (50%). Izolati non-*albicans Candida* su bili češće osetljivi na antimikotike (88,1%) u odnosu na izolate *C. albicans* (77,6%). Vorikonazol, nistatin i mikonazol pokazali su najbolju *in vitro* aktivnost.

**ZAKLJUCAK:** *Aspergillus* i *Candida* su najčešći uzročnici otomikoze kod pacijenata iz Beograda i Pančeva. Verovatnoća nastanka ove infekcije je veća kod starijih osoba i nakon povrede spoljašnjeg slušnog hodnika. Identifikacija uzročnika i ispitivanje osetljivosti na antimikotike *in vitro* značajni su za lečenje ovih stanja.

**KLJUČNE REČI:** otomikoza, *Aspergillus*, antimikotici

## LABORATORY AND EPIDEMIOLOGICAL EVALUATION OF PATIENTS WITH OTOMYCOSIS

Cvetković Milan<sup>1</sup>

[milan.cvetkovic@med.bg.ac.rs](mailto:milan.cvetkovic@med.bg.ac.rs)

Jovanović Milena<sup>2</sup>, Stojanović Sandra<sup>3</sup>, Dubljanin Eleonora<sup>1</sup>, Čolović Čalovski Ivana<sup>1</sup>, Džamić M. Aleksandar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Parasitology-Mycology, Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> ORL department, General Hospital Pančevo

<sup>3</sup> ORL Clinic, Clinical Hospital Center Zvezdara - Belgrade

**INTRODUCTION:** Otomycosis is fungal infection of external auditory canal making about 10% of infections of this region. The most common causative agents are *Aspergillus* and *Candida*. Some factors such as trauma of external auditory meatus and humidification, increase the risk for otomycosis. Therapy implies the use of azole and polyene antifungals.

**OBJECTIVE:** Determination of causative agents and their *in vitro* antifungal susceptibility testing, isolated from patients with suspected otomycosis from Belgrade and Pančevo.

**METHOD:** Cross-sectional study performed between March 2007 and June 2014, included 322 patients with diagnosis of otitis externa, from two medical centers, Town hospital KBC „Zvezdara”, Belgrade and General hospital Pančevo. Data about risk factors were obtained by survey. Suspicion of otomycosis was made by otoscopic examination. Microorganisms were isolated and identified by standard mycological procedures. Antifungal susceptibility testing was performed by disk diffusion method based on CLSI documents and disk manufacturer instructions, using antifungals from azole and polyene class.

**RESULT:** Fungi were determined as causative agents of 18.3% (59/322) infections. The most common isolates were *Aspergillus* (67.8%), particularly *A. niger* (68.9%), and *Candida* (25.6%), particularly *C. albicans* (65.2%). Other isolates belonged to genera *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Scopulariopsis* and *Fusarium*. Average age of patients with otomycosis was 50 years. Injury preceded infection in 35.1% of cases. Fungi from genus *Aspergillus* showed better antifungal susceptibility (74.2%) compared to other molds (50%). Non-*albicans Candida* isolates were more often susceptible to antifungals (88.1%) than *C. albicans* isolates (77.6%). Voriconazole, nystatin and miconazole showed the best *in vitro* activity.

**CONCLUSION:** *Aspergillus* and *Candida* are the most common causative agents of otomycosis among patients from Belgrade and Pančevo. Infection probability is greater among elderly and after injury of external auditory meatus. Identification of causative agent and *in vitro* antifungal susceptibility testing are important for the treatment of these conditions.

**KEYWORDS:** otomycosis, *Aspergillus*, antifungals

**SESIJA: ZNAČAJ PRIMENE SISTEMA**

**VAKCINACIJE**

**SESSION: THE IMPORTANCE OF**

**THE APPLICATION OF THE**

**VACCINATION SYSTEM**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
sa međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> SERBIAN MICROBIOLOGISTS CONGRESS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO

**PERTUSIS – SVE STARO JE PONOVO NOVO**  
**PERTUSSIS – NEW CHALLENGES**

Minić Predrag

[pbminic@gmail.com](mailto:pbminic@gmail.com)

Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije

Pertusis je veoma kontagiozna respiratorna infekcija izazvana Gram-negativnom bakterijom, *Bordetellom pertussis* (*B. pertussis*) koja je isključivo humani patogen. Bolest se javlja u svim uzrastima, najteži oblici bolesti praćeni najvećom smrtnošću se javljaju kod odojčadi u prva tri meseca života, a porast oboljevanja se registruje naročito u grupi adolescenata i odraslih. Reproductivni broj, odnosno broj ljudi inficiranih od izvornog bolesnika, za ovu infekciju je 5,5 (1). Bolest sa sličnom kliničkom slikom mogu izazvati *B. parapertussis* kod mlađe dece i *B. holmesii* kod adolescenata i odraslih. Bolest izazvana *B. pertussis* ima nekoliko osobenosti koje je razlikuju od drugih teških respiratornih infekcija (2). Osnovna bolest je po svojoj prirodi nezapaljenjska i ne prati je povišenje telesne temperature; mortalitet je veći kod ženske nego kod muške dece; bolest se češće javlja leti nego u jesen i zimu; i između epizoda paraksizmalnog kašlja koje su karakteristične za pertusis nema nikakvih respiratornih zankova i simptoma, što nije slučaj u drugim bolestima disajnih puteva koje su praćene kašljem. Ipak, postoje i neke sistemske manifestacije pertusisa: 1. limfocitoza; 2. poremećaj regulacije sekrecije insulina; 3. povraćanje posle kašlja koje može da dovede do dehidracije i malnutricije; 4. promene u funkcionisanju nervnog sistema (konfuzija, sinkope, konvulzije i gubitak svesti); i 5. recidivi paroksizmalnog kašlja, koji traju nedeljama pošto je infekcija prošla. Infekcija i bolest se javljaju i ponavljaju u svakom životnom dobu (3).

U prvim decenijama dvadesetog veka gotovo sva deca su do školskog uzrasta obolevala od pertusisa. Zbog visoke kumulativne incidencije i visoke smrtnosti (jedan smrtni završetak bolesti na svakih 10 obolelih) u to vreme je od velikog kašlja umiralo više dece nego od poliomijelitisa i morbila zajedno. Razvoj i široka primena efikasnih vakcina protiv pertusisa doveli su do dramatičnog pada obolevanja od ove bolesti. U poslednje vreme se, međutim, beleži porast učestalosti pertusisa u velikom broju zemalja uključujući i našu. Zbog toga je pertusis danas najčešća bolest na svetu čiji se nastanak može sprečiti vakcinacijom (4). U tekstu će biti učinjena analiza uzroka koji dovode do ovog porasta i perzistiranja pertusisa u populaciji.

#### DEFINICIJA

U svetu postoje brojne definicije pertusisa, što otežava da se iz kliničke perspektive definiše bolest i odrede prave epidemiološke razmere problema. Najveći broj definicija se zasniva na kliničkom ispoljavanju bolesti kod odojčadi i dece. S obzirom na porast oboljevanja od pertusisa kod adolescenata i odraslih bilo je potrebno dopuniti definiciju radi poboljšanja senzitivnosti i specifičnosti dijagnoze. U tabeli 1 su prikazani definicija i klasifikacija slučaja pertusisa (5).

Tabela 1. Definicija i klasifikacija slučaja pertusisa\*

#### **Klinička definicija slučaja**

Kašalj koji traje najmanje dve nedelje i jedno od: paroksizmi kašlja, tipični inspiratorni zvuk ili povraćanje posle kašlja, bez drugog jasnog uzroka

#### **Laboratorijski kriterijumi za dijagnozu**

Izolacija *B. pertussis* iz uzorka u kulturi

Pozitivni PCR test za *B. pertussis*

#### **Klasifikacija slučaja**

##### **Potvrđen**

Ispunjava kriterijume kliničke definicije i potvrđen kulturom, PCR-om ili je u epidemiološkoj vezi sa bolesnikom kod koga je pertusis laboratorijski potvrđen

### Moguć

Ispunjava kliničku definiciju slučaja ali nije potvrđen laboratorijski i nije u epidemiološkoj vezi sa bolesnikom kod koga je pertusis laboratorijski potvrđen

---

\*Prema preporukama US Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

### MIKROBIOLOGIJA

Pertusis izaziva Gram-negativni kokobacil *Bordetella pertussis*. Bacil su 1906. godine izolovali Jules Bordet i Octave Gengou, a šest godina kasnije su ga i kultivisali iz ekspektorata Bordeovog sina na specijalnoj podlozi koja nosi ime po ovoj dvojici mikrobiologa i još uvek se koristi za izolaciju *B. pertussis* (6). I druge vrste iz roda *Bordetella*, u prvom redu *B. parapertussis* i *B. bronchiseptica*, mogu da izazovu bolest sličnu pertusisu, ali sa blažim simptomima. U poslednje vreme u više epidemija pertusisa u svetu izolovana je *B. holmesii* i to kod adolescenata koji su redovno imunizovani protiv difterije, tetanusa i pertusisa u adolescentnom uzrastu Tdap vakcinom, što dovodi u pitanje efikasnost ove vakcine protiv ove vrste bordetele (7).

Varijacije u ekspresiji faktora virulencije *B. pertussis* su primećene u poslednjih nekoliko godina, što pobuđuje sumnju u efikasnost acelularnih vakcina. Pertaktin, visoko imunogeni faktor virulencije, je jedan od najvažnijih komponenti acelularne vakcine. U poslednje vreme su prvi put opisani sojevi *B. pertussis* bez pertaktina, što ukazuje na potrebu za stvaranjem novih ili poboljšanjem bezbednosti starih, celocelijskih vakcina (8).

### EPIDEMIOLOGIJA

Pertusis je akutna respiratorna infekcija lokalizovana u disajnim putevima koja se uobičajeno ne širi cirkulacijom. Ne postoji dugotrajno kliconoštvo niti rezervoar u životinjama, a *B. pertussis* ne preživljava dugo u spoljašnjem okruženju. Sve ove okolnosti trebalo bi da ograniče širenje infekcije, ali i pored toga pertusis je vrlo kontagiozan i prenosi se na 40% do 80% osetljivih kontakata. Ovom visokom infektivnošću delom se može objasniti ponovni porast pojave pertusisa koji se beleži u poslednjim godinama (2).

U 2012. godini Svetskoj zdravstvenoj organizaciji je prijavljeno oko 200 000 slučajeva pertusisa sa smrtnošću od 3% u zemljama u razvoju, uglavnom kod odojčadi i male dece (9). Razmere problema pertusisa su potcenjene u zemljama sa nerazvijenim ekonomijama zbog niza razloga, uključujući pogrešno postavljanje dijagnoze, neprepoznavanje i neprijavlivanje bolesti. Procenjuje se da na svetu tokom jedne godine od pertusisa oboli između 30 i 50 miliona ljudi sa brojem smrtnih slučajeva od oko 300 000. S obzirom da je mortalitet od pertusisa najveći u grupi male dece, ova bolest i danas predstavlja jedan od vodećih uzroka smrtnosti koje je moguće prevenirati kod dece uzrasta ispod pet godina (10).

U eri pre uvođenja vakcine, morbiditet i mortalitet od pertusisa su bili ogromni. Vakcina (celocelijska, sa mrtvim izazivačem - DTwP) je razvijena tridesetih godina prošlog veka, a u kasnim četrdesetim je počela sistematska vakcinacija stanovništva. Uvođenje vakcine je dovelo do smanjenja obolevanja 157 puta, sa dostignutim minimumom sredinom 70-tih godina dvadesetog veka. U to vreme počinje da raste zabrinutost zbog pojave neželjenih pojava koje su pratile vakcinaciju celocelijskom vakcinom (povišena telesna temperatura, febrilni napadi, lokalne reakcije, hipotonija), pa se u Japanu i Švedskoj ova vakcinacija obustavlja. Posle samo par godina od obustavljanja vakcine obolevanje i smrtnost u ovim zemljama je eksplozivno porasla, a napredak u tehnologiji je omogućio razvoj i primenu acelularnih vakcina (DTaP) koje su bile manje reaktogene zbog odstranjivanja endotoksina iz njih. Vakcine DTaP su u poređenju sa DTwP sadržavale mnogo manji broj antigena i u univerzalnu upotrebu su puštene krajem 90-tih godina prošlog veka. I pored primene ovih strategija vakcinacije, pertusis se i dalje javlja u manjim epidemijama sa interepidemijskim periodima koji traju između tri i pet godina (1,2).

Vakcine protiv pertusisa ne obezbeđuju doživotnu zaštitu. Procenjuje se da zaštita koju daje celocelijska vakcina traje od 4 do 14 godina, a acelularna 5 - 6 godina (11).

U poslednjih desetak godina zapaža se porast obolevanja od pertusisa, a najveći broj obolelih, računajući od 1960. godine, je registrovan 2012. godine. Najveći porast beleži se u grupi

odojčadi mlađe od pet meseci, adolescenata starijih od 10 godina i odraslih. U prvoj grupi se javljaju najteži oblici velikog kašlja, a grupa adolescenata i odraslih predstavlja rezervoar infekcije iz koga se bolest prenosi najmlađima (6). Rezultati multinacionalne studije ukazuju na to da 75% dece hospitalizovane zbog pertusisa nije bilo potpuno imunizovano. Isto tako, 75% dece je zaraženo od ukućana, od majke u 42%, a od brata ili sestre u 26% slučajeva (12). Imajući na umu da je zaštita od pertusisa koju obezbeđuju savremene acelularne vakcine ograničenog trajanja, postaje jasno da su adolescenti i odrasli sa neprepoznatim pertusisom, koji kod njih može da ima netipično ispoljavanje, glavni izvor infekcije odojčadi. Ovo zapažanje je dovelo do promena u planu imunizacije adolescenata, odraslih i trudnica u većini razvijenih zemalja u svetu. U ovim zemljama se u ovim populacijama primenjuje „Tdap” (tetanus toksoid, redukovana količina difterija toksoida i acelularni pertusis) vakcinama sa smanjenom količinom antigena. Vreme vakcinisanja je važna komponenta u izazivanju imunskog odgovora. Utvrđeno je da je za pasivnu zaštitu novorođenčadi i odojčadi u prvih par meseci života potrebno vakcinisati trudnicu u trećem trimestru u svakoj trudnoći (između 27. i 36. gestacijske nedelje), vakcinom Tdap. Tako se postiže maksimalni imunskog odgovor majke i pasivni transfer antitela novorođenčetu. U tabeli 2 su prikazane preporuke CDC (US Centers for Disease Control and Prevention) za imunizaciju dece, adolescenata, odraslih i trudnica (13).

Tabela 2. Preporuke CDC\*( US Centers for Disease Control and Prevention) za imunizaciju protiv pertusisa

Uzrasna grupa (vakcina)	Vreme primene
Od rođenja do 6 godina (DTaP)	2, 4, i 6 mes., 15-18 mes. i između 4-6 godina
7-10 godina (Tdap)	Jedna doza za nepotpuno imunizovane
11-18 godina (Tdap)	Jedna doza za potpuno vakcinisane, poželjno između 11 i 12 godina
≥19 god., uključujući >65 god. (Tdap)	Zameniti 1 dozu Td u prvoj prilici
Trudnice (Tdap)	U svakoj trudnoći između 27. i 36. gestacijske nedelje.  Ako nije ranije data odmah posle porođaja
Zdravstveni radnici	Zameniti 1 dozu Td u prvoj prilici. Prioritet onima koji rade sa novorođenom decom

\*CDC=US Centers for Disease Control and Prevention; DTaP=difterija-tetanus toksoid, acelularni pertusis; Tdap=tetanus toksoid, redukovana količina difterija toksoida i acelularni pertusis; Td=tetanus toksoid, redukovana količina difterija toksoida.

Može se navesti bar pet mogućih razloga za porast pojave pertusisa: 1. genetske promene u izazivaču, *B. pertussis*; 2. smanjenje efikasnosti vakcina; 3. brže iščezavanje postvakcinalnog imuniteta; 4. povećano prepoznavanje i prijavljivanje pertusisa; i 5. noviji laboratorijski dijagnostički testovi (6).

Postoje jasni dokazi da su DTaP vakcine manje efikasne od dobrih DTwP vakcina (14). Često se previđa činjenica da je efikasnost acelularnih vakcina u direktnoj zavisnosti od broja antigena koju vakcina sadrži. Tako na primer, petokomponentna vakcina koja sadrži pertusisni toksin (PT), filamentozni hemaglutinin (FHA), pertaktin (PRN) i fimbrijske aglutinogene (FIM) 2 i 3 je bila efikasnija od trokomponentne vakcine (sadrži PT, FHA i PRN), trokomponentna od

dvokomponentne (PT, FHA), a dvokomponentna od jednokomponentne (sadrži samo PT). S obzirom da DTWP sadrže mnoge dodatne protektivne antigene osim PT, FHA, PRN i FIM 2/3, genske promene u izazivaču nisu bile problem u eri primene celocelijskih vakcina. Sa današnjim acelularnim vakcinama, genetske varijacije u bordeteli mogu predstavljati razlog za smanjenu efikasnost ovih vakcina. Zbog toga postoje mišljenja da bi u budućnosti prioritet trebalo dati razvoju manje reaktogenih celocelijskih vakcina (15).

Napredak u razvoju metoda PCR (engl., Polymerase Chain Reaction) testiranja za *B. pertussis* poboljšalo je mogućnost postavljanja dijagnoze pertusisa i doprinelo njegovom povećanom prijavljivanju (16).

#### PATOGENEZA

Mehanizmi patogeneze infekcije *B. pertussis* su: 1. ekspozicija i inokulacija; 2. tropizam i vezivanje; 3. stvaranje i proliferacija faktora virulencije; 4. zaobilaženje i modulacija odgovora domaćina; 5. lokalna i sistemska disfunkcija ćelija i tkiva; i 6. hronična infekcija, smrt ili ozdravljenje (3,17).

Komponente *B. pertussis* koje su faktori virulencije obuhvataju proteine koji se kategorišu kao toksini i adhezini, kao i druge molekule koji su u interakciji sa imunskim ćelijama domaćina i menjaju njihovu funkciju. Neki od ovih proteina su sastojci savremenih acelularnih vakcina protiv pertusisa.

##### **Pertusisni toksin**

Nasuprot početnom uverenju da je PT odgovoran za nastanak kliničke slike pertusisa, u eksperimentu na životinjama davanje ovog toksina nije dovelo do ispoljavanja znakova i simptoma bolesti. Pertusisni toksin učestvuje u ribozilaciji hetero-trimeričkog G proteina i na taj način prekida signaliziranje u mnogim tipovima ćelija. Biološki efekti ovog delovanja su indukcija limfocitoze, promene u sekreciji insulina i povećanje osetljivosti na histamin. PT deluje inhibitorno na zaštitne antibakterijske funkcije rezidentnih alveolarnih makrofaga i sprečava infulus neutrofila u disajne puteve. Svaki od ovih efekata doprinosi razvoju patofizioloških poremećaja. Tako, na primer, limfocitoza se, zbog formiranja agregata u plućnoj cirkulaciji, dovodi u vezu sa nastankom plućne hipertenzije koja je značajan činilac u morbiditetu i mortalitetu od pertusisa (17).

##### **Filamentozni hemaglutinin**

Filamentozni hemaglutinin je veliki površinski protein koji igra ulogu u interakciji *B. pertussis* sa domaćinovim ćelijama u procesu adhezije. Osim toga FHA ispoljava i imunomodulatorni efekat stvaranjem i aktivacijom FHA-specifičnih T regulatornih (Treg) limfocita čime dovodi do povećane produkcije IL10 i supresije Th1 odgovora (2,18).

##### **Pertaktin**

Pertaktin ima ulogu adhezina u interakciji između bakterije i ćelija domaćina. Osim toga ima ulogu i u odbrani protiv neutrofila slično kao i adenilat ciklazni toksin. Pertaktin je deo acelularnih vakcina protiv pertusisa jer se za stvaranje antitela protiv PRN vezuje oko 70% zaštitnog efekta vakcine (19).

##### **Fimbrijski aglutinogeni**

Fimbrijski aglutinogeni (FIM) su površinski apendiksi, slični onima kod drugih bakterija i funkcionišu kao adhezini i aglutinogeni, pa služe za serotipizovanje *B. pertussis*. Kao FHA i PRN, FIM ima imunomodulatorne efekte (2).

##### **Adenilat ciklazni toksin**

Adenilat ciklazni toksin (ACT) povećava nivo cAMP u domaćinovim ćelijama, što dovodi do inhibicije fagocitne funkcije i aktivacije apoptoze u nekim ćelijama (20). Delovanjem na dendritičke ćelije ACT dovodi do inhibicije njihovog sazrevanja i transporta u limfne čvorove (2).

##### **Trahealni citotoksin**

Trahealni citotoksin (TCT) je tetrapeptidni disaharid, peptidoglikan koji ubija respiratorne epitelne ćelije kompleksim mehanizmom koji uključuje intracelularni interleukin 1 i azot oksid (21).

##### **Lipooligosaharid i dermonekrotički toksin**

Lipooligosaharid (LOS) i dermonekrotički toksin (DNT) su još dva molekula koji predstavljaju faktore virulencije *B. pertussis*, ali čija uloga u patogenezi pertusisa nije u punoj meri razjašnjena. LOS stimuliše stvaranje interleukina (IL) 23, što dovodi podsticanja imunomodulatornog Th17 odgovora (2,22).

Aktivnost pomenutih faktora virulencije *B. pertussis* je usmerena ka supresiji, izbegavanju i subverziji odbrambenog odgovora domaćina, kako urođenog tako i adaptivnog.

Pertusis se prenosi primarno putem udisanja izazivača. Prvi korak u u procesu infekcije je adherencija bakterija za cilijarne ćelije respiratornog epitela provodnih disajnih puteva. Opisanim funkcijama faktora virulencije *B. pertussis* se može objasniti vezivanje i specifični tkivni tropizam. U drugoj i narednim fazama dolazi do dalje proliferacije i stvaranja faktora virulencije, i pod njihovim dejstvom izbegavanja i modulacije odgovora domaćina, oštećenja strukture i funkcije tkiva i, na kraju, trajnog oštećenja ili ozdravljenja (3).

Iako *B. pertussis* proizvodi brojne toksine (PT, TCT, ACT), mehanizam nastanka paroksizmalnog kašlja u pertusisu nije jasan. Najčešće korišćeno, simplifikovano objašnjenje je, da se zbog oštećenja respiratornog cilijarnog epitela usled delovanja toksina i rezultujućeg imunskog odgovora javljaju iritacija i napadi kašlja. Postoji i teza da se paroksizmi kašlja javljaju usled nagomilavanja bradikinina u disajnim putevima. Bradikinin je peptid koji se stvara iz kininogena u procesu proteolize. Njegovi najbolje opisani efekti su hipotenzija, povećana vaskularna propustljivost, edem i bol. Bradikinin pokreće zapaljenjsku reakciju, izaziva bronhokonstrikciju i kašalj kada se unese u disajne puteve ili se u njima stvori pod dejstvom hemijskih iritansa, alergena ili promena u spoljašnjem okruženju. Dejstva bradikinina su ograničena njegovim metabolizmom, a naročito delovanjem angiotenzin-konvertujućeg enzima (ACE) i neutralne endopeptidaze (NE). Smanjenje aktivnosti ACE i NE može kod osetljivih osoba izazvati kašalj. Ova pojava se vidi kod bolesnika sa hipertenzijom koji u terapiji uzimaju ACE-inhibitore. Trahealni citotoksin i drugi faktori virulencije *B. pertussis* oštećuju i ubijaju ćelije respiratornog epitela koje su glavni izvor NE u disajnim putevima. Lipopolisaharidi iz gram-negativnih bakterija smanjuju aktivnost ACE u plućima. Sniženi nivoi ACE i NE produžavaju poluživot bradikinina u disajnim putevima. Kašalj koji pokreće bradikinin je posredovan nadražajem bronhopulmonalnih C-vlakana poreklom iz jugularnih ganglija vagusa. Ovako bi se mogao objasniti prolongirani karakter kašlja u pertusisu i njegovo slabo reagovanje na konvencionalnu terapiju kašlja (23).

#### KLINIČKA SLIKA

Period inkubacije *B. pertussis* je duži (7 - 10 dana) u poređenju sa najvećim brojem drugih akutnih respiratornih infekcija (1 - 3 dana). Prema tome, na pertusis se može pomisliti ako je dete kod koga se razvijaju znaci infekcije gornjih disajnih puteva bilo u kontaktu sa osobom koja je dugotrajno kašljala jednu do dve nedelje pre toga. Tok pertusisa se može podeliti u tri faze: kataralnu, paroksizmalnu i konvalescentnu. U **kataralnoj fazi** se javlja opšta slabost, rinoreja i blagi kašalj. Ova faza traje jednu do dve nedelje. Povišenje telesne temperature, ako ga ima, je obično sasvim malo i ne utiče na opšte stanje. Simptomi i znaci tokom ove faze su nespecifični i slični su simptomima akutnih virusnih infekcija gornjih disajnih puteva. Na pertusis se retko pomišlja ako ne postoji jasan kontakt sa obolelim, zbog čega je potrebno dobiti informaciju da li je neko od članova porodice imao produženi kašalj. Nepurulentni konjunktivitis ili ekscesivno suzenje takođe mogu da pobude sumnju na pertusis u ovoj fazi bolesti.

**Paroksizmalna faza** obično počinje tokom druge nedelje bolesti i karakterišu je paroksizmi kašlja sa zacenjivanjem ili serija kašljanja tokom jednog izdaha. U najtežim slučajevima može biti i više od 30 paroksizama tokom jednog dana. Pražnjenje pluća paroksizmalnim kašljanjem do veoma niskih volumena praćeno je snažnim udahom koji, naročito kod male dece sa malim kalibrom disajnih puteva, daje karakterističan stridorozni prizvuk. Paroksizmi se najčešće javljaju tokom noći i može ih pokrenuti hladan vazduh, glasni zvuci ili neki drugi iritansi. Inspiratorno zacenjivanje se javlja u oko 69%, a pojava povraćanja posle kašlja kod 65% obolelih od pertusisa. Bolesnici su najčešće bez simptoma između paroksizama, što je karakteristično samo za pertusis. Znojenje između epizoda paroksizama je karakteristika pertusisa kod odraslih. Na kraju kataralne



i na početku paroksizmalne faze bolesti mogu se javiti i sistemske manifestacije, kao što je leukocitoza sa dominantnom limfocitozom koja je vezana sa lošijim ishodom. Teški paroksizmi mogu da budu komplikovani sinkopom, subkonjunktivalnim krvarenjima, frakturom rebara, urunarnom inkontinencijom, pojavom hernija i intrakranijalnom hemoragijom. Komplikacije, koje su češće u nekompletno imunizovane odojčadi, uključuju pneumoniju, nenapredovanje, konvulzije, encefalopatiju, cerebralnu hipoksiju, plućnu hipertenziju i prolaps rektuma. Kao kasna komplikacija pertusisa može nastati obliterirajući bronhioolitis.

Oboleli su najinfektivniji tokom kataralnog i prve dve nedelje perioda paroksizmalnog kašlja, a u slučaju neimunizovanog odojčeta infektivnost može da traje i do šest nedelja. Postepeni prelazak u **fazu konvalescencije**, koja traje 1 - 6 nedelja, nastaje 1-2 meseca od početka bolesti, a perzistentni kašalj u ovoj fazi se proređuje i gubi u intenzitetu. Ne treba gubiti iz vida da kod dece, pošto su prebolela pertusis, može doći do recidiva paroksizama kašlja u toku novih virusnih respiratornih infekcija.

Klinička slika pertusisa kod prethodno imunizovanih adolescenata i odraslih ili onih koji su preboleli prirodnu infekciju, je promenljiva i često netipična. Glavni, i najčešće jedini simptom je perzistentni kašalj. Prema rezultatima jednog kliničkog ispitivanja, pertusis je bio uzrok kašlja produženog trajanja u 12% do 32% adolescenata i odraslih. Srednja dužina trajanja kašlja u pertusisu kod odraslih je između 36 i 48 dana. U 82% obolelih adolescenata i odraslih se javljao paroksizmalni kašalj, a povraćanje posle kašlja i stridorozni inspirijum su zabeleženi u svega oko 20%. Ova atipična prezentacija ometa rano prepoznavanje i pravovremeno počinjanje terapije koja vodi ka obeskličenju i čini ovu grupu bolesnika glavnim rezervoarom infekcije odojčadi (1,2,11).

#### DIJAGNOZA

Klinička sumnja je najvažnija za postavljanje dijagnoze pertusisa. Ako slučaj ispunjava kliničke kriterijuma prikazane u tabeli 1., onda sumnju treba potvrditi, i utvrđivanjem direktne epidemiološke veze sa obolelim ili na osnovu odgovarajućih laboratorijskih testova (kulture na podlozi ili PCR eseja) postaviti i laboratorijsku dijagnozu. U tabeli 3. su prikazane preporuke za upotrebu dijagnostičkih testova u različitim fazama bolesti (24).

Tabela 3. Dijagnostički pristup u različitim fazama pertusisa

Klinička faza	Simptomi (trajanje faze)	Vreme od početka bolesti	Analiza koju treba izabrati
Kataralna	Malaksalost, rinoreja, kašalj, temperatura (1-2 nedelje)	blagi ±	1-2 nedelje PCR i kultura
Paroksizmalna	Teški paroksizmi kašlja, najčešće noćni (1-2 meseca)		2 nedelje do 1 meseca PCR i serologija
Konvalescentna	Kašalj epizode blaže i ređe	perzistira, > 1 meseca	Serologija

---

(1-6 nedelja)

---

Kultura na podlozi je zlatni standard u laboratorijskoj dijagnostici pertusisa zbog toga što ima specifičnost od 100% za identifikaciju, omogućava tipizaciju sojeva, kao i ispitivanje rezistencije na antibiotike. Senzitivnost kulture značajno opada ako se uzorak uzme više od dve nedelje posle početka simptoma. Uzorke za kulturu treba uzeti aspiracijom iz nazofarinksa ili brisom iz zadnjeg sprata nazofarinksa u kome se nalaze ćelije respiratornog epitela sa cilijama za koje bordetela ima afinitet. Bris treba uzeti štapićem sa vrhom od dakrona, a ne od vate pošto ovi sadrže masne kiseline toksične za bordetelu. Uzorke treba odmah direktno zasejati na Bordet-Gengou ili Regan-Lowe agar, na kojima se porast izazivača očekuje za 7 - 10 dana (25).

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je najsenzitivniji metod za brzu detekciju pertusisa. Na rezultate PCR ne utiče prethodna antibiotska terapija i na rezultate ne treba čekati duže od 1 - 2 dana. U poređenju sa kulturom, PCR može da poveća broj dijagnoza 3 - 5 puta i otkrije vrlo mali broj broj živih i neživih mikroorganizama. Najveću senzitivnost PCR ima u toku prve tri nedelje kašlja, dok je bakterijska DNK još uvek prisutna u nazofarinksu. Potom, senzitivnost testa značajno opada. Ovaj metod nije bez nedostataka: skup je, nije svuda dostupan, može dati i lažno pozitivne i lažno negativne rezultate (naročito u toku epidemija) i ne preporučuje se posle petodnevne terapije antibioticima. Pseudo-epidemije zbog pojave lažne pozitivnosti metoda u centar pažnje stavljaju standardizaciju metoda i postavljanje jasnih graničnih vrednosti zasnovanih na analitičkoj senzitivnosti i kliničkom značaju. Novi, "real-time" PCR, popravljaju specifičnost i u dijagnozi pertusisu sličnih bolesti (26).

Serološki testovi se u prvom redu koriste za epidemioški nadzor i istraživačke svrhe. Komercijalno raspoložive eseje treba koristiti vrlo pažljivo, s obzirom da imaju različit antigenski sastav i kvalitet bez dokazane kliničke pouzdanosti. Serološka dijagnoza je korisna kod adolescenata i odraslih kod kojih se na bolest posumnja u odmaklom stadijumu bolesti, kada se očekuje da i kultura i PCR budu negativni. Parni serum koji pokazuje dvostruko povećanje titra antitela je zlatni standard za serološku dijagnostiku, ali u kliničkoj praksi serološka dijagnoza se može zasnivati i na jednom uzorku. Optimalno vreme za uzimanje ovakvog uzorka je dve do osam nedelja posle početka kašlja, kada je titar antitela najviši. Odgovor antitela na vakcinu neće imati uticaja na rezultate serologije ako je vakcina data najmanje šest meseci pre testiranja (27).

Detekcija antitela direktnom fluorescencijom u uzorcima iz nazofarinksa nije skup metod, obezbeđuje brzo rezultate, ali se ne preporučuje zbog loše senzitivnosti i specifičnosti, kao i ukrštene reaktivnosti sa drugim mikroorganizmima kao što su *B. bronchiseptica*, *Hemophilus influenzae* i difteroidi (28).

## LEČENJE

Terapija pertusisa se sastoji od lečenja bakterijske infekcije, i možda još važnije za obolelog, lečenja simptoma. Efikasnost lečenja zavisi od pravovremenosti započinjanja. Rani početak lečenja antibioticima može skratiti bolest i umanjiti tegobe, a kasnije davanje lekova samo smanjuje prenošenje. Nažalost, sa lečenjem se retko započinje dovoljno rano da bi se uticalo na tok bolesti. Na osnovu rezultata metaanalize zaključeno je da je kratkotrajna terapija makrolidima bila podjednako efikasna kao i dugotrajna primena u eradikaciji *B. pertussis*, i to sa manje neželjenih dejstava. Azitromicin primenjen tokom 3 - 5 dana je terapija izbora zbog jednostavnosti i dobre bezbednosti primene (29).

Najveću smetnju bolesnicima sa pertusisom predstavlja paroksizmalni kašalj sa zacenjivanjem. Nažalost, u paroksizmalnoj fazi antibiotici nemaju uticaja na ovaj simptom. Za lečenje kašlja u pertusisu za sada ne postoji preporučena i provereno efikasna terapija. Iz brojnih metaanaliza posvećenih ovom problemu zaključuje se da ne postoji dovoljno dokaza da bilo koja od terapija kašlja u pertusisu deluje. Kortikosteroidi, pertusisni imunoglobulin i eksanvinotransfuzija mogu pomoći u najtežim slučajevima, ali ih ne treba koristiti rutinski (7).

## PREVENCIJA

Prevenција ima značajnu ulogu u kontroli širenja pertusisa, pošto su zbog kasnog prepoznavanja i početka lečenja smanjene druge mogućnosti koje utiču na prenošenje i tok bolesti. Od brojnih strategija prevencije korišćenih za suzbijanje pertusisa, vakcinacija je najznačajnija. Antibiotici imaju malu ulogu u prevenciji i njihovo davanje treba ograničiti na one osobe koje su imale bliski kontakt sa bolesnikom (bili na udaljenosti manjoj od jednog metra) ili su bile u direktnom kontaktu sa njegovim oralnim ili nazalnim sekretom. Pri davanju profilakse uvek treba razmotriti stepen izloženosti, vakcinalni status, imunski status pacijenta i rizike od primene antibiotika. Naročitu pažnju u antibiotskoj profilaksi treba posvetiti trudnicama, novorođenčadi i odojčadi u prvim mesecima života i imunosuprimiranim pacijentima. U ovim grupama profilaksu antibioticima (isti režim davanja kao i za lečenje) treba početi u prve tri nedelje posle bliskog kontakta sa obolelim (30).

## ZAKLJUČAK

U poslednjim godinama se beleži porast učestalosti pertusisa u svetu. Zbog toga je pertusis najčešća bolest danas čiji se nastanak može sprečiti vakcinacijom. Postoji velika potreba da se poboljša prepoznavanje, dijagnoza, lečenje simptoma i, najvažnije, prevencija bolesti. Razvoj novih vakcina i proširenje obuhvata vakcinacije, naročito u grupi adolescenata i odraslih koji su rezervoar infekcije za najosetljiviju populaciju novorođenčadi i male dece, kao i trudnica u poslednjem trimestru trudnoće, su od suštinskog značaja za smanjenje učestalosti pertusisa.

## Literatura

1. Cherry JD, Heininger U. Pertussis and other Bordetella infections. In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler-Harrison GJ, Kaplan S, editors. Feigin and Cherry's textbook of pediatric infectious diseases. 6th edition. Philadelphia, PA: WB Saunders Co.; 2009. p. 1683-706.
2. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies. Clin Microbiol Rev 2005; 18:326-82.
3. Hewlett EL, Burns DL, Cotter PA, Harvill ET, Merkel TJ, Conrad P, et al. Pertussis Pathogenesis -What we know and what we don't know. JID 2014; 209:982-5.
4. Clark TA. Changing pertussis epidemiology: everything old is new again. JID 2014; 209:978-81.
5. Pertussis (whooping cough): surveillance and reporting – case definition. Centers for Disease Control and Prevention website. <http://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html#case-definition>. Updated November 4, 2014. Accessed December 13, 2015.
6. Bordet J, Gengou O. Le microbe de la coqueluche. Annales de l'Institut Pasteur 1906; 20:731-41.
7. Hartzell JD, Blaylock. Whooping cough in 2014 and beyond: An update and review. Chest 2014; 146:205-14.
8. Queenan AM, Cassiday PK, Evangelista A. Pertactin-negative variants of Bordetella pertussis in the United States. N Engl J Med 2013; 368:583-4.
9. Immunization surveillance, assessment, and monitoring: pertussis. World Health Organization website. [http://www.who.int/immunization\\_monitoring/diseases/pertussis/en/](http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/pertussis/en/). Published July 23, 2013. Accessed January 23, 2015.
10. Crowcroft NS, Stein C, Duclos P, Birmingham M . How best to estimate the global burden

- of pertussis? *Lancet Infect Dis* 2003; 3:413-8 .
11. Wood N, Peter McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr Respir Rev* 2008; 9:201-12.
  12. Nieves DJ, Singh J, Ashouri N, McGuire T, Adler-Shohet FC, Arrieta AC. Clinical and laboratory features of pertussis in infants at the onset of a California epidemic. *J Pediatr* 2011; 159:1044-6.
  13. Vaccines and immunizations: pertussis – summary of vaccine recommendations. Centers for Disease Control and Prevention website. <http://www.cdc.gov/vaccines/vpd-vac/pertussis/recssummary.htm>. Updated August 28, 2013. Accessed December 11, 2015.
  14. Cherry JD. Why do pertussis vaccines fail? *Pediatrics* 2012; 129:968-70
  15. Cherry JD, Olin P. The science and fiction of pertussis vaccines. *Pediatrics* 1999; 104:1381-3.
  16. Cherry JD. Pertussis: Challenges Today and for the Future. *PLOS Pathogen* 2013; 9:e1003418.
  17. Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin Infect Dis* 2008; 47:328-38.
  18. Inatsuka CS, Julio SM, Cotter PA. *Bordetella* filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:18578-83.
  19. Inatsuka CS, Xu Q, Vujkovic-Cvijin I. Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infect Immun* 2010; 78:2901-9.
  20. Guiso N, Rocancourt M, Sazatanik M, Alonso J-M. *Bordetella* adenylate cyclase is a virulence associated factor and immunoprotective antigen. *Micro Path* 1989; 7:373-80.
  21. Heiss LN, Moser SA, Unanue ER, Goldman WE. Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. *Infect Immun* 1993; 61:3123-8.
  22. Nicholas H Carbonetti. Immunomodulation in the pathogenesis of *Bordetella pertussis* infection and disease. *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7:272-8.
  23. Hewitt M, Brendan, Canning J. Coughing Precipitated by *Bordetella pertussis* Infection. *Lung* 2010; 188(Suppl 1):S73-S79.
  24. Pertussis (whooping cough): diagnosis confirmation. Centers for Disease Control and Prevention website. <http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/diagnosis-confirmation.html>. Updated June 11, 2012. Accessed November 25, 2015.
  25. Wendelboe AM, Van Rie A. Diagnosis of pertussis: a historical review and recent developments. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6:857-64.
  26. Best practices for health care professionals on the use of polymerase chain reaction (PCR) for diagnosing pertussis. Centers for Disease Control and Prevention website. <http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/diagnosis-pcr-bestpractices.html>. Updated February 18, 2011. Accessed November 27, 2015.
  27. Loeffelholz MJ, Sanden GN. *Bordetella pertussis*. In: Murray PR, Baron E, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Vol 1. 9th ed. Washington, DC: ASM Press; 2007, p. 803-14.
  28. Altunaiji S, Kukuruzovic R, Curtis N , Massie J. Antibiotics for whooping cough (pertussis). *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 18:CD004404.
  29. Bettiol S, Wang K, Thompson MJ. Symptomatic treatment of the cough in whooping cough. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 5:CD003257.
  30. Tiwari T, Murphy TV, Moran J. National Immunization Program, CDC. Recommended antimicrobial agents for the treatment and postexposure prophylaxis of pertussis: 2005 CDC Guidelines. *MMWR Recomm Rep* 2005; 54 (RR-14):1-16.

### **PERTUSIS – NOVI IZAZOVI**

Minić Predrag, Sovtić Aleksandar, Rodić Milan

Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije

U poslednjih nekoliko godina se beleži veliki porast učestalosti pertusisa, što ovu infekciju čini najčešćom bolešću na svetu čiji se nastanak može sprečiti vakcinacijom. Iako se vakcinacijom bolest može prevenirati, kontrola njenog širenja i dalje ostaje veliki izazov. Nove strategije vakcinacije se primenjuju u različitim dobnim grupama i populacijama, ali obuhvat vakcinacijom, pogotovo u adolescenata, odraslih i trudnica ostaje i dalje nedovoljan. Acelularne vakcine, iako bezbedne, ne obezbeđuju istu dugotrajnost zaštite kao prethodno korišćene celocelijske vakcine. Zato bi razvoj novih vakcina i poboljšanje obuhvata vakcinacijom mogli biti od suštinskog značaja za smanjenje incidencije pertusisa.

### **PERTUSSIS – NEW CHALLENGES**

Minić Predrag, Sovtić Aleksandar, Rodić Milan

Mother and Child Health Care Institut of Serbia “Dr Vukan Čupić”

Pertussis has had a dramatic resurgence in the past several years and is the most common vaccine-preventable disease in the world. Although the disease is theoretically preventable by vaccination it remains a challenge to control. New vaccination strategies have been implemented across different age groups and populations, but vaccine coverage remains low especially among adolescents, adults and pregnant women. Acellular vaccines, although safe, do not afford same long-lasting immunity as the previously used whole-cell vaccine. Improvements in the development of vaccines and in vaccination coverage will be essential to decrease the burden of pertussis on society.

**BCG VAKCINA**  
**BCG VACCINE**  
Vuković Dragana

[dragana.vukovic@med.bg.ac.rs](mailto:dragana.vukovic@med.bg.ac.rs)

Dakić Ivana

Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

BCG (Bacille Calmette-Guérin) vakcina protiv tuberkuloze (TB) je jedna od najstarijih i najšire korišćenih vakcina u svetu. Originalni BCG soj dobijen je *in vitro* atenuacijom virulentnog *Mycobacterium bovis* soja i prvi put upotrebljen kao vakcina 1921. godine. Svi današnji vakcinalni sojevi potiču od originalnog, ali su usled naknadnih pasaža pod različitim uslovima nastali brojni genetički različiti BCG sojevi. Poređenjem genoma BCG sojeva sa genomima virulentnih sojeva *M. bovis* i *M. tuberculosis*, otkriveno je da gubitak regiona RD1 (Region of Difference 1) ima ključnu ulogu u atenuaciji. Geni RD1 kodiraju imunodominantne antigene ESAT6 i CFP10, kao i ESX-1, tip 7 sistem sekrecije jedinstven za mikobakterije. Ipak, kompletan spektar mehanizama atenuacije BCG još uvek nije potpuno razjašnjen. BCG je jedina vakcina koju i danas koristimo u borbi protiv TB i procenjuje se da je svake godine primi više od 100 miliona novorođenčadi. Međutim, s obzirom na 10,6 miliona novih slučajeva TB i 1,6 miliona smrtnih ishoda tokom 2016., jasno je da TB još uvek predstavlja značajan globalni zdravstveni problem. BCG vakcina data na rođenju ima konzistentno visoku efikasnost u prevenciji diseminovane TB, ali se procene efikasnosti u sprečavanju plućne TB, kao najvažnijeg oblika bolesti, kreću u opsegu od 0% do 99%. Ovakva varijabilnost u efikasnosti BCG vaccine dovodi se u vezu sa različitim faktorima, kao što su: upotreba različitih BCG i prisustvo različitih *M. tuberculosis* sojeva u različitim populacijama, gubitak dominantnih antigena, faktori organizma domaćina i ekspozicija netuberkuloznim mikobakterijama. Kada je u pitanju bezbednost BCG vaccine, ozbiljne komplikacije poput diseminovane BCG infekcije su retke (1,56-4,29 slučajeva/milion doza). Iako je jasno da BCG vakcinacija ne dovodi do potpunog prekida transmisije TB, nedvosmisleno je pokazano da je primena ove vaccine tokom skoro 100 godina značajno doprinela smanjenju oboljevanja od TB. Pored toga, pokazano je da BCG vakcina ima izvesnu efikasnost u prevenciji lepre, kao i da je udružena sa određenim pozitivnim nespecifičnim efektima na sveukupno zdravlje i preživljavanje vakcinisane dece. Takođe, treba imati u vidu da je BCG od ključnog značaja u razvoju novih vakcina za prevenciju TB, za koje je predviđeno davanje kao "buster" vakcina nakon BCG imunizacije.

## BCG VACCINE

Vuković Dragana

[dragana.vukovic@med.bg.ac.rs](mailto:dragana.vukovic@med.bg.ac.rs)

Dakić Ivana

Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade

Bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccine against tuberculosis (TB) is among the oldest and most widely used vaccines worldwide. The original BCG strain had been derived from a virulent *Mycobacterium bovis* through *in vitro* attenuation, and was first administered to humans in 1921. The current vaccine strains are all descendants of the original strain, but subsequent passages under different conditions have resulted in a number of genetically distinct BCG strains. Comparison of the BCG genome to the genomes of virulent *M. bovis* and *M. tuberculosis*, revealed loss of Region of Difference 1 (RD1) as the most important attenuation event. RD1 encodes for immunodominant antigens ESAT6 and CFP10 as well as ESX-1 type 7 secretion system unique for mycobacteria. However, the complete spectrum of BCG attenuation mechanisms remains incompletely understood. BCG is still the only available vaccine to fight TB, and is given to over 100 million newborns each year. Despite this consistent usage, TB remains a major global health problem, with an estimated 10.4 million incident cases and 1.6 million deaths in 2016. While BCG administered at birth is highly effective at preventing disseminated disease, estimates of the protection against pulmonary TB, the major burden of TB, range between 0% and 99%. The variability in BCG efficacy has been associated with different factors, such as: variation in BCG as well as *M. tuberculosis* strains in different populations, the loss of dominant antigens, host factors, and exposure to nontuberculous mycobacteria. As far as safety of BCG is concerned, serious adverse effects such as disseminated BCG disease are rare (1.56-4.29 cases/million doses). Although BCG vaccine is obviously not sufficient to break TB transmission, its contribution to the decrease in TB burden throughout nearly 100 years of administration is indisputable. In addition, BCG has also shown effectiveness in preventing leprosy, and is associated with positive non-specific effects on childhood health and survival. It is also noteworthy that BCG vaccine remains critical for the development of new TB vaccines, which will be given as a booster after BCG vaccination.

## ERADIKACIJA POLIOMIJELITISA POLIOMYELITIS ERADICATION

Knežević Aleksandra

Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Poliomijelitis je akutna flakcidna paraliza uzrokovana poliovirusima (3 tipa) koji se javlja kod 1% -2% zaraženih pacijenata, i kod nekih pacijenata može dovesti do smrti usled paralize respiratornih mišića. Bolest je često udružena sa doživotnim invaliditetom kao posledica akutne infekcije. Tokom 20. veka, polio virus je bio jedan od najopasnijih patogena širom sveta.

Tokom 1949. godine, Enders, Robbins, i Veller su demonstrirali uspešno umnožavanje poliovirusa u ne-neuronskim ćelijskim kulturama što je nagrađeno Nobelovom nagradom. Ovo otkriće je dovelo do razvoja efikasne imunizacije protiv dječije paralize. Godine 1956., Salkova trovalentna inaktivisana polio vakcina (IPV) uvedena je u rutinsku imunizaciju, prvo u Sjedinjenim Američkim Državama, a zatim i u drugim zemljama, što je dovelo do značajnog smanjenja incidence poliomijsitisa. Ova vakcina se daje intramuskularno i stimuliše serumska IgM, IgG i IgA antitela, ali ne i sekretorna IgA antitela. Imunitet na ulaznom mestu se obezbeđuje transudacijom antitela u orofarinks. Godine 1962. Sejbinovala trovalentna oralna atenuisana vakcina protiv dečje paralize (OPV) je uvedena u rutinsku imunizaciju u mnogim zemljama u svetu. Ona se primenjuje oralno, i dovodi do aktivne infekcije atenuiranim sojevima virusa na nivou orofarinksa i creva uz stimulisanje lokalnih sekretornih IgA antitela pored serumske proizvodnje antitela. Nadalje, atenuisani sojevi virusa se izlučuju putem fecesa, što dovodi do populacionog imuniteta.

Godine 1988, Svetska zdravstvena organizacija je pokrenula akcioni plan (Global Poliovirus Eradication Initiative - GPEI) za eradikaciju svih divljih sojeva poliovirusa (WPV) iz globalne cirkulacije. Ova inicijativa se zasniva na tome da su ljudi jedini rezervoari polio virusa, da su razvijena osjetljiva i specifična dijagnostička sredstva za dokazivanje i identifikaciju virusa, da postoji efikasna imunizacija za sprečavanje transmisije i da je transmisija poliovirusa zaustavljena u određenim geografskim područjima.

Plan eradikacije poliomijsitisa obuhvata četiri strategije a) rutinsku imunizaciju sa visokim obuhvatom odojčadi u prvoj godini života; b), dopunske aktivnosti imunizacije za decu do 5 godina; c) ekstenzivno neprekidan nadzor za dokazivanje virusa i d) dopunske kampanje za zemlje gde se još uvek dokazuje poliovirus.

Aktivnosti imunizacije uključuju primenu OPV ili/i IPV vakcine u rutinskim i dopunskim programima imunizacije za svu decu do 5 godina starosti.

Ključni korak u dokazivanju transmisije polio virusa kao i praćenju efikasnosti mera eradikacije je nadzor nad akutnom flakcidnom paralizom (AFP), glavnog simptoma paralitičkog poliomijsitisa, kod dece mlađe od 15 godina starosti. Nakon prijavljivanja AFP slučaja, uzorci stolice se prikupljaju i testiraju za polioviruse u SZO-akreditovanim laboratorijama za polio viruse, koje su deo globalne mreže laboratorija za polio viruse (GPLN). U specifičnim situacijama, osjetljivost AFP nadzora je unapređena nadzorom životne sredine za polioviruse (ispitivanje otpadnih voda) u odabranim lokacijama ili prikupljanje uzoraka od osoba koje su bile u kontaktu sa AFP slučajem. Polio virus izolati dokazani u stolici ili uzorcima iz otpadnih voda se dalje karakterišu analizom genomske sekvence čime se dobijaju važne informacije o putevima prenosa polio virusa.

Od 1988. godine, kada je prijavljeno više od 350.000 endemskih slučajeva poliovirusne infekcije u 125 zemalja, napredak ove inicijative je bio impresivan. Četiri od šest regiona SZO, koji obuhvataju više od 80% svetske populacije, su već potvrđeni kao regije bez poliomijsitisa. Od kraja 2017. godine, samo u tri zemlje se i dalje registruju polio slučajevi (22 slučaja) uzrokovani endemskim divljim tipom 1 polio virusa (WPV1): Nigerija (SZO afrički region) i Pakistan i Avganistan (SZO region istočnog Mediterana). Autohtoni WPV tip 2 je poslednji put registrovan u severnoj Indiji 1999. godine, a u septembru 2015. godine, Global Comission for the Certification



of Poliomyelitis Eradication je proglasila da je WPV tip 2 iskorenjen u svetu. Tip WPV 3 polio virusa je poslednji put prijavljen u Nigeriji u novembru 2012. godine. SZO Evropski region je imao poslednji autohtoni slučaj dečije paralize 1998. godine (u Srbiji u 1996.) i 2002. godine je proglašen regionom bez poliomijelitisa od strane European Regional Certification Commission for Poliomyelitis Eradication (RCC).

Originalni cilj SZO Globalnog plana za postizanje eradikacije poliomijelitisa je bio 2000. godina. Međutim, uočene su značajne poteškoće u vezi primene OPV i IPV imunizacije.

Atenuirani sojevi polio virusa koji se nalaze u OPV vakcini u retkim slučajevima mogu povratiti neurovirulenciju i izazvati vakcinalni poliomijelitis (VAPP), koji se klinički ne može razlikovati od paralitičkih poliomijelitisa izazvanih divljim tipovima virusa. Procenjuje se da se svake godine javlja između 250 i 500 slučajeva VAPP širom sveta i oko 31% slučajeva su izazvani tipom 2. Osim toga, OPV sojevi mogu mutirati i dovesti do stvaranja visoko neurovirulentnih vakcinalnih sojeva polio virusa (VDPVs) koji mogu da cirkulišu duži vremenski period u populaciji. VDPV sojevi pokazuju više od 1% divergencije (0,6% za tip 2) iz originalnih sojeva OPV. U veoma retkim slučajevima, VDPVs bi mogli obnoviti endemski i epidemijski prenos virusa. Procenjuje se da 2012. bila prva godina u istoriji, kada je bilo više slučajeva dečije paralize izazvane vakcinalnim sojevima nego izazvanih divljim tipovima polio virusa i većina od njih su izazvani VDPV tipom 2.

Primena IPV ima ograničen efekat u izazivanju crevnog imuniteta i iz tog razloga IPV ne daje istu zaštitu od transmisije polio virusa u populaciji u odnosu na OPV. Nadalje, prisustvo majčinih antitela u ranom detinjstvu je najveći faktor rizika za neuspeh IPV vakcine. Stoga se preporučuje da ukoliko se primenjuje samo jedna doza IPV u kalendaru imunizacije, dozu treba dati detetu od 14 nedelja starosti da bi se obezbedila dobra imunogenost.

U odnosu na navedene probleme 2012. godine, SZO GPEI je razvio završni plan za iskorenjivanje dečije paralize 2013-2018 (Polio Eradication & Endgame Strategic Plan 2013-2018) u cilju sprečavanja transmisije divljih tipova polio virusa i postizanja dugoročnih ciljeva eradikacije. Definisana su četiri cilja: (a) sprečavanje transmisije divljih tipova polio virusa, (b) jačanje sistema imunizacije i povlačenje OPV (c) sprovođenje nadzora nad čuvanjem i odlaganjem polio virusa i proglašenje eradikacije, i (d) planiranje očuvanja eradikacije poliomijelitisa. Ključni elementi u ovom planu su uklanjanje tipa 2 polio virusa iz OPV (tj prelazak sa trovalentne OPV na dvovalentnu OPV) i uvođenje  $\geq 1$  doze IPV u kalendar imunizacije svake zemlje u cilju smanjenja prevalencije vakcinalnih paralitičkih poliomijelitisa i zaštite od pojave tipa 2 polio virusa. Planirano je da će potpuno povlačenje OPV (uključujući dvovalentnu OPV) biti uvedeno 3 godine nakon poslednjeg registrovanog slučaja divljeg tipa polio virusa.

Uspešna primena navedenog plana omogućiće eradikaciju dečije paralize u svetu.

## POLIOMYELITIS ERADICATION

Knežević Aleksandra

Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

Poliomyelitis is an acute flaccid paralysis caused by poliovirus (3 types) which affect 1%–2% of infected patients and in some patients cause death by paralyzing respiratory muscles. The disease is often associated with lifelong disabilities as a consequence of acute infection. During the 20th century, poliovirus was one of the most feared pathogens worldwide.

In 1949, Enders, Robbins, and Weller demonstrated the successful propagation of poliovirus in non-neuronal cell cultures and this discovery was awarded by Nobel Prize and led to the development of effective immunisation against poliomyelitis. In 1956, the Salk trivalent inactivated polio vaccine (IPV) was introduced for routine immunisation, first in United States and then in other countries with the significant reduction of poliomyelitis incidence. It is given by injection and stimulates serum IgM, IgG, and IgA, but not secretory IgA. The immunity at the entry site is being induced by antibody transuding into the oropharynx. In 1962, Sabin trivalent oral live attenuated polio vaccine (OPV) was also introduced in the routine immunisation in many countries worldwide. It is administered orally, and caused an active attenuated infection of the oropharynx and intestinal endothelium, stimulating local secretory IgA in addition to serum antibody production. Furthermore, the attenuated virus is excreted in the faeces, leading to herd immunity.

In 1988, the World Health Organization launched the action plan (Global Poliovirus Eradication Initiative – GPEI) to eradicate all wild types polioviruses (WPV) from global circulation because the poliovirus is maintained only in humans, there are available sensitive and specific diagnostic tools for detection and identification, there is effective immunisation to prevent transmission and there is a proof of principle (the elimination of poliovirus transmission in large geographic area).

The present global eradication policy includes four point strategy: a) routine immunisation to ensure high infant coverage in the first year of life; b) supplementary immunisation activities for children under 5 years old; c) extensive continuous surveillance to find the virus and d) mopping up campaigns for countries where the final pockets of poliovirus transmission have been identified.

The immunisation activities includes the use OPV or/and IPV vaccines in the routine and supplementary immunisation programmes for all children less than 5 years of age.

The key strategy to detect transmission of poliovirus and monitor the impact of eradication activities has been surveillance for children <15 years of age presenting acute flaccid paralysis (AFP), the lead symptom of paralytic poliomyelitis. Following the reporting of the AFP case, stool specimens are collected and tested for poliovirus in WHO-accredited poliovirus laboratories that are part of the Global Polio Laboratory Network (GPLN). In specific situations, the sensitivity of AFP surveillance is enhanced by environmental surveillance for poliovirus (testing of sewage water) at selected sites or collection of specimens from AFP case contacts. Poliovirus isolates detected in stool or environmental samples are further characterized through genomic sequencing to obtain important information on polio transmission pathways.

From 1988, a year with more than 350.000 reported endemic cases of poliovirus infection in 125 countries, the progress of this initiative has been impressive. Four of six WHO regions, comprising >80% of the world's population, have already been certified as polio-free. As of the end of 2017, only three countries continue to report polio cases (22 cases) caused by endemic wild poliovirus type 1 (WPV1): Nigeria (WHO African Region) and Pakistan and Afghanistan (WHO Eastern Mediterranean Region). Indigenous WPV type 2 was last detected in Northern India in 1999, and in september 2015, Global Commission for the Certification of Poliomyelitis Eradication declare that indigenous WPV type 2 has been eradicated worldwide. WPV type 3 poliovirus was last reported from Nigeria in November 2012. The WHO European region had the

last indigenous case of poliomyelitis in 1998 (in Serbia in 1996) and was certified as polio free by the European Regional Certification Commission for Poliomyelitis Eradication (RCC) in 2002.

The original target of WHO Global plan for achieving poliovirus eradication was the year 2000. Considerable difficulties associated with OPV and IPV vaccination were recognized.

The attenuated polioviruses contained in OPV in rare circumstances can revert to neurovirulent forms and cause vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP), clinically indistinguishable from paralytic poliomyelitis caused by WPVs. It is estimated that each year there are between 250 and 500 cases of VAPP worldwide and about 31% of cases are associated with type 2. In addition, OPV strains may mutate and lead to the generation of highly neurovirulent vaccine-derived polioviruses (VDPVs) with the ability to circulate in communities for long periods of time. VDPV strains showed >1% divergence (0.6% for type 2) from the original OPV strains. On very rare occasions, VDPVs could potentially reestablish endemic and epidemic transmission. It is estimated that 2012 was the first year in history when there were more cases of paralytic poliomyelitis caused by Sabin vaccine polioviruses than caused by WPVs and the majority of them were caused by VDPV type 2.

IPV has limited effect in inducing primary intestinal immunity and for this reason IPV does not provide the same amount of the community protection against poliovirus transmission compared to OPV. Furthermore, maternally derived antibody during early infancy has been shown to be the biggest risk factor for lack of IPV take, and thus vaccine failure. Therefore, it is recommended that if only a single dose of IPV is incorporated into the immunization schedule, the dose should be given at 14 weeks of age to ensure good immunogenicity.

Responding to these difficulties, in 2012, WHO GPEI has developed the Polio Eradication & Endgame Strategic Plan 2013–2018, to interrupt the transmission of WPV and to achieve the long-term goals of the posteradication era. The four objectives of the plan are: (a) to interrupt WPV transmission, (b) to strengthen immunization systems and the withdrawal of OPV, (c) to implement containment of polioviruses and to certify the world as polio-free, and (d) to plan the legacy of polio eradication. The key policy changes in this plan is the cessation of the type 2 component of OPV (ie, the switch from trivalent OPV to bivalent OPV) and the global introduction of  $\geq 1$  dose of IPV into every country's routine immunization schedule in order to reduce the prevalence of vaccine-associated paralytic poliomyelitis and protect against emergence of type 2 poliovirus. It is planned that the complete withdrawal of OPV (including bOPV) will be implemented 3 years after the last WPV is detected.

The successful implementation of the new polio end game offers the best opportunity to achieve polio eradication and secure it forever.

**ISPITIVANJE VARIJABILNOSTI GENA EPSTEIN-BARR VIRUSA U CILJU IDENTIFIKACIJE  
POTENCIJALNIH PREDIKTORA KLINIČKOG TOKA EBV UDRUŽENIH OBOLJENJA  
INVESTIGATION OF EPSTEIN-BARR VIRUS GENES VARIABILITY FOR IDENTIFICATION OF  
POTENTIAL PREDICTORS OF CLINICAL COURSE OF EBV-RELATED DISEASES**

Banko Ana  
[ana.banko@med.bg.ac.rs](mailto:ana.banko@med.bg.ac.rs)

Institut za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Epstein-Barr virusna (EBV) infekcija povezuje se sa brojnim humanim malignitetima. U toku infekcije, EBV nuklearni antigen 1 (EBNA1) ima najznačajniju ekspresiju u inficiranim ćelijama, dok je latentni membranski protein 1 (LMP1) najznačajniji virusni onkogen. Ciljevi ovog rada bili su ispitivanje polimorfizama EBNA1 i LMP1 gena u različitim EBV udruženim oboljenjima, kao i utvrđivanje specifičnih karakteristika EBV sekvenci koje su u korelaciji sa kliničkim parametrima opisanih oboljenja.

U studiju je uključeno 128 uzoraka plazme pacijenata sa infektivnom mononukleozom (IM), 116 uzoraka plazme pacijenata nakon transplantacije bubrega (T), i 116 bioptata pacijenata sa nazofaringealnim karcinomom (NFK). Karakteristični delovi LMP1 i EBNA1 gena su umnožavani nested-PCR metodom. Dobijeni produkti su sekvencirani i filogenetski obrađivani. Svi podaci i rezultati su analizirani i statistički.

U studiji je identifikovano 5 novih EBNA1 subvarijanti, sa značajnim grupisanjem P-thr-sv-5 subvarijante među NPC izolatima. Ispitivanje LMP1 varijabilnosti pokazalo je 2 nove, ali i NPC specifične varijante: Srb1 i Srb2. Varijante B95-8 i Severna Karolina identifikovane su kao potencijalni prediktori za niže TNM graduse, dok su LMP1 delecije identifikovane kao potencijalni faktori rizika za najagresivnije TNM graduse. Kod IM pacijenata, broj specifičnih LMP1 ponovaka od 33 bazna para manji od 4,5, kao i specifične kombinacije varijabilnosti LMP1 i EBNA1 gena (LMP1 sa delecijom/P-thr i LMP1 bez delecije/P-ala), apsolutno su korelirali sa povišenim vrednostima jetrinih enzima. Sa druge strane, LMP1/EBNA1 polimorfizam Med/P-thr dokazan je kao potencijalni faktor rizika za TNM gradus IVB, odnosno N3 nodularno širenje NFK.

Na osnovu rezultata ove studije mogu se prepoznati potencijalni virusni skrining markeri za klinički tok NFK kao i zahvaćenost jetre kod pacijenata sa IM.

**INVESTIGATION OF EPSTEIN-BARR VIRUS GENES VARIABILITY FOR IDENTIFICATION OF  
POTENTIAL PREDICTORS OF CLINICAL COURSE OF EBV-RELATED DISEASES**

Banko Ana

[ana.banko@med.bg.ac.rs](mailto:ana.banko@med.bg.ac.rs)

Institute for Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

Epstein-Barr virus (EBV) infection is associated with the broad range of malignancies. EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) has the most notably expression in cells, and latent membrane protein 1 (LMP1) is the major EBV oncogene. The aims of this study were to characterize polymorphisms of EBNA1 and LMP1 genes in different EBV-related diseases and to investigate potential sequence patterns that correlate with the clinical presentations of these diseases.

Plasma samples from patients with mononucleosis syndrome (IM) (128) and from patients after renal transplantation (T) (116), and 116 nasopharyngeal carcinoma (NPC) biopsies were tested in this study. LMP1 and EBNA1 genes were amplified and analyzed with sequence, phylogenetic and statistical evaluation.

The study showed 5 newly discovered EBNA1 subvariants with noticeable clustering of P-thr-sv-5 in NPC isolates. LMP1 variability showed two newly discovered and NPC-specific variants: Srb1 and Srb2. The B95-8 and North Carolina variants revealed as possible predictors for favorable TNM stages. In contrast, deletions in LMP1 represented possible risk factors for the most unfavorable TNM stage. In addition, the number of specific 33-bp repeats of LMP1, less than reference 4.5, and the particular combinations of LMP1/EBNA1 variability (deleted LMP1/P-thr and non-deleted LMP1/P-ala), absolutely correlated with elevated levels of hepatic transaminases in IM patients. On the other hand, the LMP1/EBNA1 polymorphism Med/P-thr was identified as a possible risk factor for TNM stage IVB or progression to the N3 stage in NPC patients.

In conclusion, potential viral screening markers for European NPC and the primary EBV infection could be recognized.

**KEY WORDS:** Epstein-Barr virus (EBV), gene variability, nasopharyngeal carcinoma (NPC)

**MORBILIVIRUS-UZROČNIK MALIH BOGINJA I GLOBALNOG ZDRAVSTVENOG PROBLEMA  
MEASLES VIRUS - CAUSATIVE AGENT OF MEASLES AND A GLOBAL HEALTH PROBLEM**

Ćupić Maja

[maja.cupic@med.bg.ac.rs](mailto:maja.cupic@med.bg.ac.rs)

Instut za mikrobiologiju i imunolgiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Male boginje-morbile, su visoko kontagiozna akutna bolest praćena temperaturom i ospom koju uzrokuje virus malih boginja (*Morbilli virus*). Morbilivirus je pleomorfna čestica čiji je genom negativna jednolančana RNK. Pripada familiji *Paramyxoviridae*, rodu *Morbillivirus*. Naziv morbille potiče od latinske reči morbus-bolest (engl. measles prema latinskoj reči misellus- jadan, bedan, mizeran). Bolest je poznata i pod nazivom rubeola koji se ređe koristi u stručnoj terminologiji, a čije je poreklo imena takođe od latinskog naziva rubeolus, što u prevodu znači crvenkasto i odnosi se na karakterističan izgled/boju ospe koja se javlja u toku morbila. Prema epidemiološkim podacima bolest je prisutna u humanoju populaciji vrlo dugo čak 5000-10.000 godina. U 10. veku persijski lekar Razes, opisuje morbile kao bolest od koje su ljudi više strahovali nego od velikih boginja. Od tada sve do danas male boginje ne prestaju da zaokupljaju pažnju stučne javnosti.

Male boginje su visoko infektivno i lako prenosivo obolenje. Uobičajeni i dominantan vid transmisije je bliskim interhumanim kontaktom preko sekreta iz gornjeg respiratornog trakta. Ređe, morbile se mogu preneti preko predmeta kontaminiranih svežim respiratornim sekretima, što predstavlja indirektan način transmisije. Kod imunokompromitovanih pacijenata osetljivost od nastanka infekcije je izuzetno visoka i iznosi oko 90%. Visoka kontagioznost virusa ogleda se u činjenici da jedna inficirana osoba može da zarazi 9-18 zdravih, čemu doprinose i faktori sredine posebno prenaseljenost, koja značajno olakšava transmisiju virusa koji je prisutan u takvim sredinama u visokim koncentracijama. U delovima sveta sa umerenom klimom epidemije morbila se javljaju u intervalima od 2-5 godina u trajanju od 3-4 meseca i koreliraju sa veličinom društvene zajednice i što je ona veća, interval između epidemija je kraći.

Vakcinalni programi protiv malih boginja su se pokazali kao veoma efikasni i njihovo dosledno i sveobuhvatno sprovođenje je imalo za ishod smanjenje stope obolevanja od morbila kao i komplikacija koje prate ovu bolest. Ipak danas i nakon dugog perioda sprovođenja imunizacije protiv morbila i visoke pokrivenosti svetske populacije vakcinom posebno u razvijenim zemljama sveta, male boginje se evidentiraju u sredinama u kojima nije sprovedena potpuna i sveobuhvatna vakcinacija, ili je u populaciji imunski odgovor izostao kod određenog broja tzv. "nerespondera" tj. onih koji nisu razvili vakcinalni imunitet. Epidemije morbilima koje se registruju čak i u zemljama sa dobrom pokrivenošću vakcinom, dokaz su prisustva tkz. "imunskih džepova" u populaciji koji predstavljaju rizik u zajednicama za nastanak novih epidemija. Male boginje su pre vakcinalne ere odnosno pre uvođenja vakcine protiv morbila 60.-tih godina 20 veka bile najznačajniji globalni uzok visoke stope morbiditeta i mortaliteta kod dece sa preko 2.000.000 smrtnih slučajeva na godišnjem nivou. Primena proširenih programa globalne imunizacije (Expanded Programme on Immunization) koja je otpočela 80.-tih godina prošloga veka, uspostavili su značajno veću pokrivenost sveta vakcinom što je značajno redukovalo morbiditet i mortalite od malih boginja.

Do danas su identifikovana 24 genotipa morbilivirusa. Podela na genotipove izvršena je na osnovu nukleotidnih razlika unutar fragmenta od 450 bp strukturnog NP gena koji kodira nukleoprotein. Međutim genotipske razlike nemaju uticaja na biološke karakteristike virusa kao ni na vakcinalni virusni soj, što znači ni na efikasnost vakcine. Ipak, genotipizacija virusnih izolata je značajna sa dva aspekta: 1. Transmisije tj. proučavanja kretanja virusa u različitim regionima sveta što je važno za epidemiološko praćenje i pojavu novih sojeva virusa, odnosno 2. Za razlikovanje divljeg soja virusa u odnosu na vakcinalni soj. Devet genotipova je dokazano u izolatima obolelih do 2009. godine, dok se spektar novootkrivenih genotipova proširio na 13 do 2014. godine. Ograničen broj identifikovanih genotipova u odnosu na ukupan broj do danas poznatih, ukazuje da se različiti

genotipovi virusa morbila kratko zadržavaju u populaciji. Novija istraživanja sugerišu da bi za preciznije otkrivanje novih sojeva morbilivirusa koji cirkulišu svetskom populacijom bilo od značaja sekvencirati veće delove RNK genoma morbilivirusa ili čak ceo genom, što bi dovelo do preciznijih podataka u vezi kretanja virusa u svetskoj populaciji i poboljšalo podatke u tzv. transmisivnoj mreži morbilivirusa.

Virus malih boginja kao i većina RNK virusa pokazuje visoku stopu mutacija što rezultuje velikom genetičkom raznovrsnosti virusa. Suprotno genetičkom diverzitetu, antigenski je veoma stabilan i postoji samo jedan serotip morbilivirusa. Od kada je 50.-tih godina prošlog veka *in vitro* izolovan i atenuisan prvi vakcinalni soj virusa, nije se menjao. Razlog za ovo leži u činjenici što su trageti za neutrališuća antitela visoko konzervirani epitopi na hemaglutininu glavnom antigen spoljašnjeg virusnog omotača. Najverovatnije su neutrališući epitopi nepromenljivi zbog funkcionalnih ograničenja aminokiselinskih sekvenci u terciarnoj strukturi protein omotača. Vakcinalni soj virusa nije transmisibilan.

Imunski odgovor u toku infekcije ima ključnu ulogu u eliminaciji virusa i uspostavljanju protektivne imunosti. Najranije u toku infekcije je važna uloga urođene imunosti koja dominira u toku prodromalne faze pre pojave simptoma bolesti. Ipak tokom tog ranog perioda dva nestrukturna virusna proteina V i C dovode do supresije interferona što virusu obezbeđuje nesmetanu replikaciju. Sa nastankom simptoma bolesti indukuje se stečeni imunitet koji podrazumeva specifičan humoralni i celularni imunski odgovor koji dovodi do ozdravljenja i stvaranja dugotrajnog protektivnog imuniteta. Efikasnost neutrališućih specifičnih antitela se najbolje oslikava u njihovoj efikasnosti da preveniraju nastanak morbila kod neonatusa u prvim mesecima života upravo zbog prisustva majčinskih antitela transplacentarno prenesenih. Uloga citotoksičnih T limfocita je važna u eliminaciji virusa tj postizanju virusnog klirensa i ozdravljenja. Imunost koja nastaje nakon prirodne infekcije ili vakcinacije je efikasna, dugotrajna i predstavlja memorijsku (tzv. anamnestičku) imunost koja se ogleda u rapidnom skoku buster IgG antitela koja obezbeđuju protekciju pri ponovnoj izloženosti virusu.

Ipak novije hipoteze pokušavaju da objasne zbog čega kod osoba koje su preležale morbile ili su vakcinisane dolazi do mogućnosti reinfekcije. Ovo se tumači proliferacijom morbili-specifičnih limfocita koji zamenjuju već stvoren repertoar specifičnih memorijskih ćelija na antigene virusa stvoren po prirodnoj infekciji uključujući i vakcinalne antigene što se naziva imunska amnezija. Zbog hipoteze o imunskom zaboravljanju, osobe sa prirodnim ili veštačkim anti-morbilivirusnim imunitetom 2-3 godina nakon prirodne infekcije/vakcinacije odnosno stvorenog imuniteta ponovo mogu da budu reinficirane.

Danas su morbile jedno od najbolje preveniranih virusnih infekcija zahvaljujući postojanju vakcine koja se primenjuje u različitim kombinacijama: kao dvokomponentna vakcina zajedno sa atenuisanim sojem Rubellavirusa (MR), trokomponentna protiv Morbila, Rubelle i Mumpsa (MMR) ili kvadrivalentna Morbille, Rubella, Mumps i Varicella vakcina (MMRV). Vakcina protiv morbila preporučena od SZO za globanu vakcinaciju (soj iz 1989. godine), sadrži visoku koncentraciju atenuisanog soja morbilivirusa koji je čini mnogo efikasnijom od prethodne vakcine koja je sadržala mnogo nižu koncentraciju vakcinalnog virusa. Prema preporukama SZO morbilivakcina se aplikuje u dve doze kako bi se postigao efektivan protektivni imunitet: MCV-1 i MCV-2 (Morbili Containing Vaccine -1,-2). Najranije se prva doza aplikuje u periodu od 9-12 meseci ali se bolji imunitet razvija ako se vakcina primeni u periodu od 12-15 meseci života (protektivni nivo imuniteta kod kasnije date vakcine je 95% vs protektivnom nivou od 85% ako je vakcina aplikovana ranije), jer u periodu posle godinu dana od rođenja prestaje inibišući efekat majčinih antitela na stvaranje sopstvenog imuniteta novorođenčeta nakon vakcinacije kao i zbog sazrevanje imuniteta novorođenčeta koje se poklapa sa periodom života posle 12 meseci. MCV-2 treba davati najmanje u razmaku od 4 meseca od MCV-1, što podrazumeva period između 12-15 meseci odnosno od 15-18 meseci u zavisnosti od perioda kada je primenjena prva doza vakcine. Da bi se prekinuo lanac transmisije morbila neophodno je populaciju kompletno zaštititi sa obe MCV.

Glavni cilj SZO i Globalnog akcionog plana imunizacije protiv malih boginja 2012-2020 je eliminacija i eradikacija virusa. Do tada ciljevi programa su

Povećanje globalne pokrivenosti vakcinom sa tendencijom da bude veća od 90% odnosno pokrivenost veća od 85% u svakom geografskom regionu, bez pojave "imunskih džepova"  
Maksimalno redukovati smrtnost- više od 95%  
Smanjiti incidenciju od morbila na manje od 5 slučajeva na 1.000.000 ljudi  
Suprotno nazivu, sve drugo u vezi malih boginja, je veliko i značajno za zdravlje čoveka.



## MEASLES VIRUS - CAUSATIVE AGENT OF MEASLES AND A GLOBAL HEALTH PROBLEM

Ćupić Maja

[maja.cupic@med.bg.ac.rs](mailto:maja.cupic@med.bg.ac.rs)

Institute for Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

Measles is a highly contagious, acute febrile illness that results from infection with measles virus. The measles virus is a pleomorphic, negative-sense RNA virus and a member of the *Morbillivirus* genus in the family of Paramyxoviridae. The name measles is derived from the Latin, *misellus*, meaning miserable. The disease is also sometimes known as rubeola (from *rubeolus*, Latin for reddish) or morbilli (from *morbis*, Latin for disease). Epidemiological evidence suggests measles likely became a disease of humans 5000–10,000 years ago. In the 10th century, Rhazes, a Persian physician, described measles as being more dreaded than smallpox. Since then, measles do not cease to be interested in the professional public.

Measles virus can only be maintained in human populations and represent one of the most easily transmitted diseases. Transmission is primarily by large droplet spread or direct contact with nasal or throat secretions from an infected person. Less commonly, it is spread by indirect contact with freshly contaminated articles. Measles is highly communicable, with a secondary attack rate among susceptible persons of more than 90%. A single person with measles infects 9–18 other people on average. Also, overcrowding facilitates person-to-person transmission of the virus and increases the likelihood of exposure to high viral loads. In temperate areas, epidemics of measles tended to occur at 2-5 year intervals and lasted 3-4 months. In general, the larger size of the community, the shorter interval between epidemics.

Measles vaccination programs have had a marked effect on the incidence of the disease and the complications associated with it. There has also been a shift in the age at which measles is most commonly contracted in these populations. After prolonged periods of high vaccine coverage in developed countries, measles transmission now occurs mainly in people that have never been vaccinated and in older children who did not seroconvert following vaccination. Measles outbreaks can still occur in countries with high immunization coverage and demonstrate an immunity gap in the population involved. Measles was a leading global cause of child morbidity and mortality before the introduction of measles vaccines in the 1960s, and was responsible for more than 2 million deaths annually before the increase in global measles vaccine coverage in the 1980s as a result of the Expanded Programme on Immunization.

There are 24 genotype strains. Measles virus can be genetically characterised by sequencing of 450 basepairs that code for a variable region of the nucleoprotein gene. Genotyping of viral isolates allows determination of patterns of importation and transmission, and genome sequencing can be used to differentiate between wild-type and vaccine virus infection in those who have been immunized recently. Only 13 of the 24 known genotypes were detected between 2005 and 2014 and only eight since 2009, suggesting that many genotypes are no longer circulating. Recent evidence suggests detailed measles virus transmission networks can be identified by sequencing larger segments of the measles virus genome, such as the haemagglutinin and phosphoprotein genes, or sequencing the whole viral genome. This genotype variation does not appear to be biologically significant, in that there is no change in vaccine efficacy.

An important characteristic of measles virus is that it is an antigenically monotypic virus, despite its genotypic diversity and the fact that RNA viruses have high mutation rates. Consequently, attenuated measles vaccines derived from a single measles virus genotype isolated in the 1960s, remain protective worldwide. Thus, new measles vaccines do not need to be developed to counter evolving measles virus strains because the neutralising epitopes on the haemagglutinin protein that confer protection are highly conserved, probably because of functional constraints on the amino acid sequence and tertiary structure of the surface proteins. The measles vaccine virus is not communicable.

Immune responses to measles virus are crucial for viral clearance and the establishment of protective immunity. The earliest, innate immune responses occur during the prodromal phase before the onset of rash. But during this period, two non-structural viral proteins (V and C) suppress host interferon production, facilitating virus replication. The adaptive immune response follows and consists of cellular and humoral immunity, which are essential for recovery and the establishment of long-term, protective immunity. The efficacy of antibodies alone in preventing measles is shown by the protection conferred by passively acquired maternal antibodies and post-exposure administration of antimeasles virus immune globulin. Cellular immunity consisting of cytotoxic T-cells are important for viral clearance and recovery. Re-exposure to the measles virus induces a strong anamnestic immune response with a rapid boosting of IgG antibodies, which prevents clinical disease. It appears that once the immune system has been primed through natural infection, immunity is lifelong. Recent hypothesis is that measles virus infection results in a proliferation of measles virus-specific lymphocytes that replace the established memory cell repertoire, resulting in so-called immune amnesia and susceptibility to previously encountered antigens, including vaccine antigens.

Measles is best prevented through measles vaccination which can be administered as combined with those for rubella (MR), mumps (MMR), or varicella (MMR-V). Measles vaccine recommended for use by WHO in 1989 contained a higher concentration of measles virus than previously vaccine from 1963. According to the WHO recommendations, the first dose of MCV-1 is administered to children in a period of 9-12 months and a second dose with MCV-2 of 15-18 months or before going to school. Better immunity is achieved if MCV-1 is administered in the later period from 12-15 months than previously from 9-12 months (protective levels of antibody after measles vaccination are about 95% vs. 85%), because inhibitory effect of the maternal antibodies disappears in period of 12 to 15 months as well as immunity of the child occurs in that period of age. The high levels of population immunity necessary to interrupt measles virus transmission can not be achieved with a single dose. A second dose of measles vaccine should be provided to immunise children who failed to respond to the first dose.

The main goal of WHO and the Global Vaccine Action Plan for 2012–20 are:

1. That vaccination coverage should be greater than 90% globally and greater than 85% in every world districts, without the immune gaps;
2. To reduce the mortality by 95% or higher and
3. To reduce measles incidence of fewer than five cases per 1 million people

Contrary to it's name, in the case of measles, everything else is so big and so important for human's health.

## MORBILI – STARA BOLEST ILI NOVA PRETNJA?

Stevanović Olja <sup>1</sup>

Aleksandra Radovanović Spurnić<sup>1,2</sup>, Miloš Korać<sup>1,2</sup>, Ivana Milošević<sup>1,2</sup>, Uroš Karić<sup>1</sup>, Ivana Pešić Pavlović<sup>3</sup>, Jelica Grebenarević<sup>4</sup>, Aleksandar Marković<sup>1</sup>, Nataša Nikolić<sup>1</sup>, Anita Petković<sup>1</sup>, Sanja Peruničić<sup>1</sup>, Branko Milošević<sup>1,2</sup>, Aleksandar Urošević<sup>1,2</sup>, Goran Stevanović<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Klinika za infektivne i tropske bolesti, Kliničkog Centra Srbije, Beograd

<sup>2</sup>Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

<sup>3</sup>Služba mikrobiologije, Kliničkog Centra Srbije, Beograd

<sup>4</sup>Služba Radiološke dijagnostike, Kliničkog Centra Srbije, Beograd

**UVOD:** Morbili, koji su u prošlosti bili stavljeni pod kontrolu vakcinacijom, danas zbog pada obuhvata ponovo počinju da dobijaju na značaju. Javljaju se u većini zemalja Evrope u formi manjih ili većih epidemija. Tokom 2017/2018 desila se i epidemija na teritoriji Beograda.

**MATERIJAL I METODE:** U radu su prikazane karakteristike toka bolesti, kliničkih i laboratorijskih nalaza, komplikacije kod hospitalno lečenih bolesnika koji su primljeni u Kliniku za infektivne i tropske bolesti, Kliničkog Centra Srbije (KCS), a tokom epidemije morbila 2017/2018. Tokom lečenja korišćene su metode koje su u rutinskoj upotrebi u KCS.

**REZULTATI:** Kod obolelih prevladuje uzrast od 30-40 godina starosti i većina su ili nevakcinisani ili nepoznatog vakcinalnog statusa. Najčešća komplikacija morbila je bila upala pluća. Od drugih komplikacija zapaženi su hepatitisi, gastrointestinalne komplikacije, kao i konjuktivitisi. Dok nije bilo komplikacija na centralnom nervnom sistemu, a otitisi i sinuzitisi su bili izuzetno retki. Kod velikog broja bolesnika zapažen je i pad broja leukocita i trombocita.

**DISKUSIJA:** Prema raspodeli i tipu komplikacija u ovom uzorku ukupnog broja obolelih uočljiva je izmena u odnosu na zastupljenost komplikacija u dosada opisanim epidemijama morbila na teritoriji Srbije. Kao i značajno teži tok kod osoba koje nisu primile ni jednu dozu vakcine ili imaju neko stanje imunodeficijencije.

**ZAKLJUČAK:** U odnosu na podatke drugih autora iz skorašnjih epidemija morbila u Evropi, a što je potvrđeno i u našem uzorku dolazi do izmene u učestalosti pojave pojedinih komplikacija od kojih dominiraju upale pluća. Takođe se zapaža i povećana proporcija hepatitisa, kao i gastrointestinalnih komplikacija, a pre svega lezija želudačne sluznice, što nameće potrebu daljeg ispitivanja i eventualne izmene dosadašnjih terapijskih protokola.

**KLJUČNE REČI:** morbili, klinički tok, terapija, komplikacije

**SESIJA: ZNAČAJ PRIMENE  
VAKCINACIJE**

**SESSION: THE IMPORTANCE OF  
THE APPLICATION OF THE  
VACCINATION SYSTEM**

**USMENE PREZENTACIJE/ ORAL  
PRESENTATION**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
sa međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO

**PREVALENCA REAKTIVACIJE HUMANOG CITOMEGALOVIRUSA (HCMV) I OKSIDATIVNI  
STRES U NETRANSPLANTIRANIH BOLESNIKA SA HEMATOLOŠKIM MALIGNITETIMA  
PREVALENCE OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS (HCMV) REACTIVATION AND OXIDATIVE  
STRESS IN NON-TRANSPLANT PATIENTS WITH HAEMATOLOGIC MALIGNANCIES**

Janković Marko <sup>1</sup>

[marko.jankovic@med.bg.ac.rs](mailto:marko.jankovic@med.bg.ac.rs)

Šuvakov Sonja<sup>2</sup>, Joksić Sanja, Todorović-Balint Milena<sup>3</sup>, Simić Tatjana<sup>2</sup>, Jovanović Tanja<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut za Mikrobiologiju i Imunologiju, Beograd, Srbija;

<sup>2</sup>Institut za Biohemiju, Beograd, Srbija;

<sup>3</sup>Klinika za Hematologiju, Klinički centar Srbije, Beograd, Srbija

**UVOD-** Oksidativni stres nastaje kao posledica nejednakosti između stvaranja reaktivnih kiseoničnih jedinjenja (ROS) i zaštitnih antioksidativnih sistema. Čelije kontrolišu nivoe ROS putem grupe antioksidativnih enzima i molekula, od kojih su superoksid dizmutaza (SOD) i glutation peroksidaza (GPX) jedni od najvažnijih. Infekcija humanim citomegalovirusom (HCMV) indukuje stvaranje ROS čime izaziva oksidativni stres, uz posledično povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima. Koliko je poznato, do sada nije bilo istraživanja koja se bave oksidativnim stresom u netransplantiranih bolesnika sa hematološkim malignitetom u kontekstu HCMV reaktivacije u našoj sredini.

**CILJ** - Ciljevi ovog istraživanja bili su (1) određivanje prevalencije HCMV reaktivacije u bolesnika sa malignom bolesti krvi, kao i (2) ispitivanje postojanja razlike u aktivnosti enzima SOD i GPX u bolesnika sa HCMV reaktivacijom i bez nje.

**METOD** - Istraživanjem je obuhvaćen 71 bolesnik sa hematološkim malignitetom hospitalizovan u Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije. Za registrovanje virusne reaktivacije u plazmi bolesnika korišćena je reakcija lančanog umnožavanja (PCR). Vanćelijska aktivnost enzima SOD i GPX je merena spektrofotometrijski. Statistička analiza je vršena putem programa IBM SPSS Statistics 25.

**REZULTAT** - Reaktivacija HCMV je registrovana u 19/71 (26,76%) bolesnika. Nije uočen statistički značajan porast u aktivnosti enzima SOD ( $p=0,917$ ) i GPX ( $p=0,743$ ) u grupi bolesnika sa HCMV reaktivacijom naspram grupe bez virusne reaktivacije.

**ZAKLJUČAK**- Reaktivacija HCMV u netransplantiranih bolesnika sa malignom bolesti krvi je uočena u približno jednoj četvrtini bolesnika. U kontekstu veze između virusne reaktivacije i oksidativnog stresa, aktivnosti SOD i GPX antioksidativnih enzima nisu se značajno razlikovale između grupe bolesnika sa reaktivacijom HCMV i bez nje.

**KLJUČNE REČI:** Citomegalovirus, oksidativni stres, reaktivacija

**PREVALENCE OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS (HCMV) REACTIVATION AND OXIDATIVE STRESS IN NON-TRANSPLANT PATIENTS WITH HAEMATOLOGIC MALIGNANCIES**

Janković Marko <sup>1</sup>

[marko.jankovic@med.bg.ac.rs](mailto:marko.jankovic@med.bg.ac.rs)

Šuvakov Sonja<sup>2</sup>, Joksić Sanja, Todorović-Balint Milena<sup>3</sup>, Simić Tatjana<sup>2</sup>, Jovanović Tanja<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology and Immunology, Belgrade, Serbia;

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry, Belgrade, Serbia;

<sup>3</sup>Clinic for Hematology, Clinical center of Serbia, Belgrade, Serbia

**INTRODUCTION:** Oxidative stress results from a disparity between the generation of reactive oxygen species (ROS) and protective antioxidant systems. Cells use a set of antioxidant enzymes and molecules to control ROS levels, with superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) being the most important ones. Human cytomegalovirus (HCMV) infection induces generation of ROS thus causing oxidative stress and a consequent increase in antioxidant defense enzyme activity. To the best of our knowledge there has been no research into oxidative stress in non-transplanted patients with haematologic malignancies and HCMV reactivation in our setting.

**AIM:** The aims of our study were (1) to determine the prevalence of HCMV reactivation in patients with blood cancer and (2) to assess if there was a significant difference in antioxidant enzymes SOD and GPX activity between patients with and without viral reactivation.

**METHODS USED:** The cohort consisted of 71 patients with haematologic malignancies hospitalized at the Clinic of Haematology, Clinical Center of Serbia. Reactivation of HCMV was registered in plasma samples by nested PCR. Extracellular SOD and GPX activity in the sera was measured by spectrophotometric assays. Statistics was performed by IBM SPSS Statistics Version 25 software.

**RESULT:** HCMV reactivation was detected in 19/71 (26,76%) patients. No statistically significant increase was observed in SOD ( $p=0,917$ ) and GPX ( $p=0,743$ ) activity in patients with HCMV reactivation compared to the group without the reactivation.

**CONCLUSION:** HCMV reactivation in non-transplanted blood cancer patients was present in approximately one quarter of patients. This research also queries if HCMV reactivation relates to oxidative stress in non-transplanted patients with blood cancer. Activity of SOD and GPX enzymes did not differ significantly between the groups of patients with and without HCMV reactivation.

**KEYWORDS:** Cytomegalovirus, oxidative stress, reactivation

**POTENCA KAO POKAZATELJ KONZISTENTNOSTI PROIZVODNJE TOKSOIDNIH VAKCINA U  
INSTITUTU "TORLAK"  
POTENCY AS AN INDICATOR OF CONSISTENCY OF PRODUCTION OF TOXOID VACCINES IN  
"TORLAK" INSTITUTE**

Radojević Katarina  
[kradojevic@torlak.rs](mailto:kradojevic@torlak.rs)

Institut za virusologiju, vakcine i serume "Torlak", Beograd, Srbija

Vakcina protiv tetanusa (Tetavaksal-T), kao i vakcina protiv difterije i tetanusa (Ditevaksal-T), već više decenija su deo proizvodnog programa Instituta "Torlak" i sa uspehom se primenjuju u vakcinaciji stanovništva u Srbiji i drugim zemljama regiona. Toksoidi koji nastaju hemijskom inaktivacijom toksina i danas predstavljaju aktivni princip toksoidnih vakcina. Dugogodišnja upotreba ovih vakcina značajno je smanjila incidencu i smrtnost od difterije i tetanusa.

Kvalitet vakcina se procenjuje kroz testove kontrole kvaliteta koji su usklađeni sa svetskim zahtevima i preporukama i kontrolnim testovima podleže svaka serija vakcina. Pored testova bezbednosti, odnosno odsustva specifične i reverzibilne toksičnosti, kod svakog balka vakcine se obavezno ispituje potenca ili aktivnost, odnosno sposobnost toksoida da indukuje zaštitni imunski odgovor i izražava se u internacionalnim jedinicama (IU). Pored toga, jedan od parametara kvaliteta je sadržaj antigena u vakcini koji se izražava u flokulacionim jedinicama (Lf). Potenca ili aktivnost vakcine se određuje biološkim ogledom na zamorcima trostrukim dilucionim challenge testom u kome se sposobnost vakcine da indukuje zaštitni imunski odgovor poredi sa standardom i minimalni zahtev za difteriju je najmanje 30 IU/PHD, a za tetanus najmanje 40 IU/PHD. Sa druge strane antigenost vakcine određuje se *in vitro* testom flokulacije uz korišćenje odgovarajućeg antiseruma. Konzistentnost proizvodnje se može proceniti poređenjem potence vakcine za najmanje 10 konsektivnih serija vakcine od različitih balkova toksoida koji zadovoljavaju kriterijume linearnosti i paralelizma, sa potencom koja je konzistentno viša od minimalnog zahteva. Prikazani rezultati predstavljaju rezultate potence i antigenosti 10 uzastopnih serija vakcine protiv tetanusa (Tetavaksal-T) i vakcine protiv difterije i tetanus (Ditevaksal-T) u cilju procene konzistentnosti proizvodnje. Rezultati pokazuju konzistentne rezultate potence obe vakcine, sa vrednostima koji su kontinuirano iznad minimalnog zahteva, što ukazuje da proizvodni proces u Institutu "Torlak" obezbeđuje stabilan kvalitet vakcine protiv tetanusa i vakcine protiv difterije i tetanusa.

**KLJUČNE REČI:** potenca, flokulacija, toksoidne vakcine

POTENCY AS AN INDICATOR OF CONSISTENCY OF PRODUCTION OF TOXOID VACCINES IN  
"TORLAK" INSTITUTE

Radojević Katarina

[kradojevic@torlak.rs](mailto:kradojevic@torlak.rs)

Institute of Virology, Vaccines and SerA "Torlak", Belgrade, Serbia

The tetanus vaccine (Tetavaxal-T), as well as diphtheria and tetanus vaccine (Ditevaksal-T), has been a part of the Torlak production program for decades and are successfully applied in the vaccination of the population in Serbia and other countries of the region. Toxoids which are produced by chemical inactivation of toxins are still present as an active principle of toxoid vaccines. Long-term use of these vaccines significantly reduced the incidence and mortality caused by diphtheria and tetanus.

The quality of the vaccines is assessed through quality control tests that are in line with global requirements and recommendations and each batch of vaccine is subjected to control tests. In addition to safety tests, i.e. absence of specific and reversible toxicity, in each vaccine bulk it is mandatory to examine the potency or activity, which represents the ability of toxoids to induce a protective immune response and is expressed in international units (IU). In addition, one of the quality parameters is the content of the antigen in the vaccine expressed in the flocculation units (Lf). The potency or activity of the vaccine is determined by biological assay in guinea pigs with a triple dilution challenge test in which the ability of the vaccine to induce a protective immune response is compared with the standard. The minimum requirement for diphtheria is at least 30 IU / SHD, and for tetanus at least 40 IU / SHD. On the other hand, the antigenicity of the vaccine is determined by an *in vitro* flocculation test using appropriate antiserum. Production consistency can be assessed by comparing the vaccine potency for at least 10 consecutive vaccine batches from different toxoid batches that meet linearity and parallelism criteria with a potency that is consistently higher than the minimum requirement. Shown results represent the results of potency and antigenicity of 10 consecutive tetanus vaccine series (Tetavaxal-T) and diphtheria and tetanus vaccine (Ditevaksal-T) in order to assess the consistency of production. The results show consistent results of the potency of both vaccines, with values that are continuously above the minimum requirement, which indicates that the production process at the Torlak Institute provides stable quality of tetanus vaccine and diphtheria and tetanus vaccine.

**KEY WORDS:** potency, flocculation, toxoid vaccines



**BCG VAKCINA U SRBIJI – DEVEDESET GODINA USPEŠNE IMUNIZACIJE**  
**BCG VACCINE IN SERBIA – NINETY YEARS OF SUCCESSFUL IMMUNIZATION**

Janjušević Ana

[dr.ana.janjusevic@gmail.com](mailto:dr.ana.janjusevic@gmail.com), [ajanjusevic@torlak.rs](mailto:ajanjusevic@torlak.rs)

Cmiljanović Ivana, Davidović Tihomir

Institut za virusologiju, vakcine i serume "Torlak", Beograd, Srbija

**UVOD:** Proizvodnja BCG vakcine, žive atenuisane vakcine za prevenciju tuberkuloze, počela je pre više od 90 godina, u Institutu za virusologiju, vakcine i serume "Torlak". Najveća zasluga po pitanju BCG vakcinacije pripada dr Rankoviću, učeniku dr Kalmeta, koji je 1926. godine napravio prvu domaću BCG vakcinu, od podsoja *M.bovis* BCG 327. Tokom 90 godina, proizvodnja BCG vakcine je doživela je nekoliko modifikacija, preko izmene podsoja, načina primene i farmaceutskog oblika vakcine. Od 1948. godine, počela je masovna proizvodnja BCG vakcine, koja u kontinuitetu traje i danas.

**CILJ** rada je prikaz proizvodnog procesa BCG vakcine u Srbiji u periodu 1926-2018. godine. Do 1960. godine korišćen je originalni Kalmetov podsoj 327, a od 1970. godine uvodi se podsoj *M.bovis* BCG Pasteur 1173-P2, koji se i danas koristi. Vakcinacija se prvo vršila peroralno, zatim se 1955. godine prešlo na intradermalnu primenu. Do 1993 godine paralelno su se proizvodile i tečna i liofilizovana vakcina, da bi se od 1993. godine prešlo samo na liofilizovani oblik. BCG vakcina se proizvodi i kontroliše u saglasnosti sa zvaničnim dokumentima Evropske farmakopeje, tehničkim uputstvima Svetske Zdravstvene Organizacije i zakonskim odredbama Republike Srbije. U proizvodnji se koristi princip Seed lot sistema. Svaka serija je kontrolisana od strane Službe za kontrolu kvaliteta, Instituta za virusologiju, vakcine i serume "Torlak" i Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije.

**ZAKLJUCAK:** Posle 90 godina kontinuirane proizvodnje BCG vakcine, Institut za virusologiju, vakcine i serume "Torlak", nastavlja da radi na stalnom unapređivanju proizvodnje i kontrole kvaliteta sa ciljem dobijanja visoko kvalitetne, bezbedne, stabilne i efikasne domaće vakcine koja štiti novorođenčad i malu decu od najtežih oblika tuberkuloze.

**KLJUČNE REČI:** BCG vakcina, Srbija, *Mycobacterium bovis* BCG 1173-P2.

## BCG VACCINE IN SERBIA – NINETY YEARS OF SUCCESSFUL IMMUNIZATION

Janjušević Ana

[dr.ana.janjusevic@gmail.com](mailto:dr.ana.janjusevic@gmail.com), [ajanjusevic@torlak.rs](mailto:ajanjusevic@torlak.rs)

Cmiljanović Ivana, Davidović Tihomir

Institute of Virology, Vaccines and Serums "Torlak", Belgrade, Serbia

**INTRODUCTION:** Production of BCG vaccine, live attenuated vaccine for tuberculosis prevention started in 1926 at Institute of Virology, Vaccines and Sera "Torlak". The greatest contribution to BCG vaccination in Serbia belongs to dr. Ranković, dr. Calmette's student, who made the first domestic BCG vaccine from the substrain *M. bovis* BCG 327. Over the 90 years, the production of BCG vaccine has undergone several modifications: of the substrain, route of administration and pharmaceutical form of the vaccine. The mass production of BCG vaccine started in 1948 and is still ongoing.

**THE AIM** of the paper is to describe BCG vaccine production in Serbia, from 1926 to 2018. Until 1960, *M. bovis* BCG 327 substrain was used. From 1970 to present *M. bovis* BCG Pasteur 1173-P2 substrain is in use. Route of administration was first oral and from 1955 intradermal route is applied. By 1993, a liquid and lyophilized vaccine was produced in parallel, and from 1993 only lyophilized form has been made. BCG vaccine is produced and controlled in accordance with official European Pharmacopoeia documents, technical instructions of the World Health Organization and regulations of the Republic of Serbia. The principle of Seed Lot system is applied. Each series of vaccine is controlled by Quality Control Department of the Institute of Virology, Vaccines and Sera "Torlak" and by Medicines and Medical Devices Agency of Serbia, respectively.

**CONCLUSION:** After over 90 years of continuous production of BCG vaccine, Institute of Virology, Vaccines and Sera "Torlak" is still working on continuous improvement, regarding production and quality control of BCG vaccine. The primary goal is obtaining a high-quality, safe, stable and efficient domestic vaccine that protects newborns and young children from the most severe forms of tuberculosis.

**KEY WORDS:** BCG vaccine, Serbia, *Mycobacterium bovis* BCG 1173-P2.

**SESIJA: BAKTERIOLOGIJA**

**SESSION: BACTERIOLOGY**

**PREDAVANJA PO POZIVU/**

**INVITED LECTURES**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
sa međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO

**NATIONAL LABORATORY SURVEILLANCE OF INVASIVE PNEUMOCOCCAL DISEASES  
BEFORE AND AFTER THE INTRODUCTION OF THE VACCINATION INTO THE NATIONAL  
IMMUNISATION PROGRAM IN SLOVENIA**

Paragi Metka <sup>1</sup>

[metka.paragi@nlzoh.si](mailto:metka.paragi@nlzoh.si)

Mioč Verica <sup>1</sup>,Kastrin Tamara <sup>1</sup>, Žohar Čretnik Tjaša <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Public Health Microbiology, Centre for Medical Microbiology, National Laboratory of Health, Environment and Food, Grablovičeva 44, 1000 Ljubljana, Slovenia

**BACKGROUNDS:** Slovenia was one of the countries with the highest incidence of invasive pneumococcal diseases before the introduction of vaccination. From 2015 an optional and free of charge vaccination against pneumococcal infections with a conjugated 10 valent vaccine was introduced in NIP in Slovenia.

**AIM:** We want to confirm, that with the introduction of the optional pneumococcal vaccination, a decrease of incidence is detected.

**METHODS:** 1497 invasive *Streptococcus pneumoniae* strains, isolated in Slovenia, in the period from 2013 to 2017, were identified, tested for antibiotic susceptibility, typed and frozen at -70 °C.

**RESULTS:** In Slovenia the vaccination coverage was 48,8% in 2015, 49,4% in 2016 and 55,2 % in 2017. The incidence in children in 2015 was 15,6 while 12,6 in 2017, this fluctuation is still in the range of previous years, so we do not notice any significant decrease in incidence yet. The distribution of incidence by age groups indicates that the highest incidence is in children under two years of age and in adults older than 65. We can not talk about significant decrease of certain vaccine serotypes or serotype replacement. Serotypes 3, 1, 14, 9V, 4, 7F, 19A, 23F, 6A, 10A, 22F and 19F are predominant in adults while in children serotypes 14, 1, 19A, 6B, 6A, 9V, 23F, 19F, 7F, 18C, 4 and 10A. Serotype 3, which is mostly found in adults, is particularly pronounced in observed years. The frequencies of vaccine serotypes 23F and 18C decreased by more than a half, after the vaccination, but this can be due to normal year to year fluctuation. A nonsignificant decrease in nonvaccine serotypes can be also seen for 19A and 6A.

**CONCLUSIONS:** In the years after the introduction of vaccination we do not notice any significant decrease in incidence children and, consequently, in adults.

**KEY WORDS:** *Streptococcus pneumoniae*, invasive pneumococcal diseases, conjugate pneumococcal vaccines

**LABORATORIJSKI NADZOR NAD INVAZIVNOM PNEUMOKOKNOM BOLEŠĆU PRE UVOĐENJA  
PNEUMOKOKNE KONJUGOVANE VAKCINE U SRBIJI  
LABORATORY BASED SURVEILLANCE OF PNEUMOCOCCAL INVASIVE DISEASES BEFORE  
INTRODUCTION OF PNEUMOCOCCAL CONJUGATE VACCINE IN SERBIA**

Opavski Nataša

[natasaopavski@gmail.com](mailto:natasaopavski@gmail.com)

Mijač Vera, Gajić Ina, Kekić Dušan, Popović Sunčica, Ranin Lazar

Nacionalna referentna laboratorija za streptokok, Institut za mikrobiologiju i imunologiju,  
Medicinski fakultet Beograd

*Streptococcus pneumoniae* (pneumokok) je vodeći bakterijski izazivač neinvazivnih vanbolničkih infekcija respiratornog trakta (zapaljenja srednjeg uha, sinusitisa, pneumonije), ali i invazivnih bolesti (bakterijemijske pneumonije, meningitisa i sepe). Najveći rizik za nastanak invazivnih pneumokoknih bolesti (IPB) i pneumonije postoji kod dece mlađe od 5 godina, starijih osoba, bolesnika sa deficijencijama imunskog sistema, funkcionalnom ili anatomskom asplenijom, opstruktivnom bolešću pluća i hroničnim bolestima bubrega i kardiovaskularnog sistema. Pneumokokno kliconoštvo je često kod odojčadi i male dece.

Glavni faktor virulencije bakterije je polisaharidna kapsula koja pneumokoku omogućava preživljavanje u toku infekcije. Na osnovu razlike u sastavu kapsule, do sada je opisano 97 serotipova, od kojih je 20 do 30 invazivno. Smatra se da su serotipovi 1, 4, 5, 7F, 8, 12F, 14, 18C, i 19A vrlo invazivni, za razliku od tipova 6A, 6B, 11A, 15B/C i 23F. U odbrani od pneumokoknih infekcija je ključno dobro funkcinisanje sistema komplementa i polimorfonuklearnih leukocita, kao i sposobnost produkcije antitela.

U lečenju pneumokoknih infekcija respiratornog trakta se koriste beta laktamski antibiotici (amoksicilin, kombinacija amoksicilina i klavulanske kiseline i oralni oblici treće generacije cefalosporina), makrolidi, a kod odraslih i respiratorni fluorohinoloni. Većina infekcija se leči empirijski jer se pneumokok izoluje u relativno malom broju slučajeva. U terapiji invazivnih oblika pneumokoknih bolesti se primenjuju parenteralni oblici cefalosporina treće i četvrte generacije, meropenem, vankomicin, linezolid i novije generacije fluorohinolona. Tokom poslednjih decenija je došlo do porasta rezistencije pneumokoka na penicilinske i cefalosporinske preparate, kao i makrolide, a od 2000-tih godina se pojavljuje i rezistencija na fluorohinolone. Takođe se izoluje sve veći broj sojeva koji su rezistentni na više klasa antibiotika - multirezistentni *S. pneumoniae*.

Zato se vakcinacija preporučuje kao najefikasnija strategija u prevenciji pneumonije i pneumokoknih invazivnih bolesti. Postoje dva tipa pneumokoknih vakcina: 23-valentna polisaharidna (PPV23) koja se daje imunokompromitovanim osobama starijim od 2 godine i pneumokokna konjugovana vakcina (PCV) koja se koristi u zaštiti odojčadi i male dece, starijih osoba i imunodeficientnih odraslih pacijenata. U upotrebi su dve konjugovane vakcine: desetovalentna (PCV10) i trinaestovalentna (PCV13). Antitela na kapsularne polisaharidne antigene obezbeđuju tipski specifičan imunitet koji daje zaštitu od teških pneumokoknih bolesti. Vakcine sadrže kapsularne antigene najčešćih serotipova izazivača IPB. Serotipove 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F i 23F sadrže obe konjugovane vakcine, dok PCV13 ima i dodatna tri serotipa: 3, 6A i 19A. U sažetku karakteristika leka za PCV10, koji daje Evropska agencija za lekove i medicinska sredstva, se navodi da postoji dovoljno dokaza da, zbog ukrštenog imuniteta sa 19F, desetovalentna vakcina štiti i od serotipa 19A.

U zemljama u kojima se u nacionalnim programima imunizacije dece primenjuje konjugovana vakcina je došlo do pada incidencije IPB, kao i učestalosti vakcinalnih serotipova kod dece, ali i odraslih osoba. Istovremeno je, međutim, zapažena pojava nevakcinalnih serotipova (fenomen poznat kao zamena serotipova). Zbog redukovanja kliconoštva rezistentnim sojevima

pneumokoka, konjugovana vakcina ima pozitivan uticaj i na smanjenje rezistencije pneumokoka na antibiotike.

Konjugovana pneumokokna vakcina je od aprila 2018. godine uvedena u kalendar obavezne imunizacije dece u Srbiji. Poznavanje distribucije serotipova pneumokoka u zemlji pre uvođenja PCV je od velikog značaja zbog razumevanja efikasnosti vakcine, kao i pravljenja dobrog izbora PCV. U cilju sagledavanja seroepidemiologije invazivnih pneumokoknih bolesti u Srbiji, sprovodimo od 2009. godine laboratorijski nadzor nad IPB. Preko 28 mikrobioloških laboratorija širom Srbije je tokom proteklih godina slalo invazivne izolate pneumokoka u Nacionalnu referentnu laboratoriju za streptokok. Sojevi su tipizirani pomoću tipski specifičnih antiseruma primenom reakcije "bubrenja" kapsule. U devetogodišnjem periodu je sakupljeno 420 invazivnih izolata *S. pneumoniae*. Najveći broj sojeva (86%) je izolovan iz krvi (n=226) i likvora (n=124) bolesnika sa dijagnozom pneumonije, sepse i meningitisa, dok su ostali poticali iz pleuralne tečnosti, bronhoalveolarnog lavata i peritonealne tečnosti. Oko polovine sojeva (51%) je izolovano od dece starosti do dve godine (n=97) i odraslih osoba starijih od 65 godina (n=119). Nađeno je ukupno 34 serotipa, a 6 izolata nije bilo moguće tipizirati. Najzastupljeniji serotipovi su bili: 3 (n=84), 19F (n=60) i 14 (n=49) i oni su detektovani kod 46% izolata. Drugi serotipovi nađeni u značajnijem broju su bili: 6B (n=13), 6A (n=10), 23F (n=6) i 18C (n=5), dok su preostali identifikovani kod 4 i manje izolata. U populaciji dece do dve godine starosti su najčešći izazivači IPB bili serotipovi 19F, 14, 6B i 6A, koji su bili prisutni kod 60% pedijatrijskih sojeva, dok je dominantni adultni serotip 3 nađen kod 4 dečija izolata. Pokrivenost serotipova konjugovanim vakcinama kod dece do 2 godine starosti je iznosila 70% za PCV10 i 83% za PCV13. Obe formulacije konjugovanih vakcina imaju dobar potencijal da preveniraju većinu slučajeva invazivne pneumokokne bolesti kod odojčadi i male dece u Srbiji. U godinama koje slede nakon uvođenja vakcine možemo očekivati da će doći do izmena u distribuciji serotipova izazivača IPB kod dece, te je važno da se nastavi laboratorijski nadzor, kako bi se navedene promene detektovale.

**LABORATORY BASED SURVEILLANCE OF PNEUMOCOCCAL INVASIVE DISEASES BEFORE  
INTRODUCTION OF PNEUMOCOCCAL CONJUGATE VACCINE IN SERBIA**

Opavski Nataša

[natasaopavski@gmail.com](mailto:natasaopavski@gmail.com)

Mijač Vera, Gajić Ina, Kekić Dušan, Popović Sunčica, Ranin Lazar

National Reference Laboratory for Streptococcus, Institute for Microbiology and Immunology,  
Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is a leading cause of bacterial community-acquired noninvasive respiratory diseases (otitis media, sinusitis, pneumonia), but also invasive illnesses such as bacteremic pneumonia, meningitis, and sepsis, worldwide. Children under 5 years, elderly and older than 5 years with certain medical conditions (primary and secondary immune deficiencies, functional or anatomical asplenia and chronic renal and cardiovascular disease,) are at increased risk for invasive pneumococcal disease (IPD) and pneumonia. Pneumococcal nasopharyngeal carriage is frequent in infants and young children.

The main virulence factor is polysaccharide capsule which is critical to pneumococcal survival during infection. At least 97 serotypes have been identified based on differences in the polysaccharide capsule, but only 20 to 30 show significant invasiveness. It is considered that some serotypes (1, 4, 5, 7F, 8, 12F, 14, 18C, and 19A) are highly invasive, while others (6A, 6B, 11A, 15B/C, and 23F) are less invasive. Both innate (complement and polymorphonuclear leukocytes) and adaptive humoral immune response are essential for host defense against pneumococcal diseases.

Antibiotics for first-choice therapy of pneumococcal respiratory infections are beta lactams (amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid and third generation cephalosporins), macrolides and respiratory fluoroquinolones in adults. Most infections are often empirically treated and the relatively small number of pneumococci are isolated from patients suffering from pneumonia. Mainly used antibiotics in the treatment of IPD are: parenteral third and fourth generation cephalosporins, meropenem, vancomycin, linezolid and newer fluoroquinolones. During the past decades the reports of increasing resistance of *S. pneumoniae* to penicillin and cephalosporins and macrolides continued, and in the 2000s reports of increasing resistance to fluoroquinolones began to appear. Many isolates developed resistance to multiple classes of drugs and became known as multi-drug-resistant *S. pneumoniae* (MDRSP).

Therefore, vaccination appears to be the most effective strategy for prevention invasive pneumococcal disease. There are two types of pneumococcal vaccines: 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPV23) recommended for immunocompromised individuals older than 2 years and pneumococcal conjugate vaccine (PCV) used to protect infants, young children, elderly and immunocompromised adults against pneumonia and IPD. Currently, two formulations of PCV are available: 10-valent (PCV10) and 13-valent (PCV13). Antibodies to capsular polysaccharide antigens provide serotype-specific protection against serious infections, and the pneumococcal vaccines are designed to cover the serotypes most commonly associated with severe pneumococcal disease. They share serotypes 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F, and PCV13 in addition includes 3, 6A and 19A. According to Summary of Product Characteristics (SPCs) issued by the European Medicines Agency (EMA) there is sufficient evidence that PCV10 provides protection against cross-reactive serotype 19A.

Childhood immunization programs in countries which implemented PCV have led to a decline of vaccine serotypes in vaccinated children, but also in older children and adults. However, concomitantly there has been an increased incidence of non-vaccine types (NVTs), eg, serotype replacement. PCVs can reduce pneumococcal resistance in vaccinated and unvaccinated populations by reducing the carriage of antibiotic resistant serotypes.

PCV vaccination became mandatory in Serbia from April 2018 and is included in childhood immunization schedule. Dynamics of serotype distribution prior to introduction of PCV assist in understanding effects of the vaccine over time and is important in choosing the optimal PCV formulation. To describe the seroepidemiology of invasive pneumococcal disease in the pre-conjugate vaccine era in Serbia, we conducted laboratory-based, national surveillance for IPD in Serbia from 2009. Over 28 laboratories throughout country sent us invasive pneumococcal isolates. Pneumococci were serotyped using Quellung reaction. Overall, 420 isolates were collected during nine-year period. Most strains (86%) were isolated from blood (n=226) and cerebrospinal fluid (CSF) (n=124) of patients suffering from pneumonia, sepsis and meningitis. Remaining strains recovered from pleural fluid, bronchoalveolar lavage and peritoneal fluid. About half of the isolates (51%) originated from children 2 years old and younger (n=97) and adults older than 65 years (n=119). A total of 34 serotypes were identified, with 6 isolates were non-typable. The leading serotypes were: 3 (n=84), 19F (n=60) and 14 (n=49) accounting for 46% of isolates. Other serotypes detected in significant number were: 6B (n=13), 6A (n=10), 23F (n=6) and 18C (n=5), while others were found in  $\leq 4$  strains. The most common serotypes causing IPD in children  $\leq 2$  years were: 19F, 14, 6B and 6A constituted 60% of all strains, while serotype 3 which dominated in adults were detected in 4 pediatric isolates. The serotype coverage of PCV10 and PCV13 in isolates from children younger than 2 years are 70% and 83%, respectively. Both vaccine formulations have the potential to prevent most cases from IPD in children in Serbia. Since shifts in the distribution of IPD serotypes from children after PCV implementation is expected, continued surveillance is critical to assess the changes in serotype distributions.



## ULOGA BIOFILMA U NASTANKU SISTEMSKIH INFEKCIJA

Šmitran Aleksandra

[aleksandrasmitran@yahoo.com](mailto:aleksandrasmitran@yahoo.com)

Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

Od samih početaka mikrobiologije većina ispitivanja su se odnosila na pojedinačne mikroorganizme, odnosno na planktonski način života mikroorganizama. Iako često rezultati dobijeni *in vitro* ispitivanjem nisu pokazivali isti efekat na pacijentima, zbog nepostojanja tehničke podrške nismo bili u mogućnosti da damo pravi odgovor i objasnimo ova nepodudaranja i nejasnoće. Sa razvojem konfokalnog 3D mikroskopa, uočeno je grupisanje i zajednički organizovani suživot mikroorganizama koji je nazvan biofilm. Zvanična i najčešće korištena definicija objašnjava biofilm kao sesilnu zajednicu mikroorganizama, ireverzibilno vezanih za supstrat i međusobno, okružena matriksom od sopstvenih polisaharidnih polimera, koja se fenotipski razlikuje od planktonskih sojeva od kojih je potekla. Ove fenotipske razlike se odnose na izmijenjenu brzinu razmnožavanja i različitu transkripciju gena u odnosu na planktonske sojeve

Biofilm predstavlja sesilnu zajednicu mikroorganizama, unutar koje se razvija izuzetno izražena i aktivna međuzavisnost njenih članova. Unutar biofilma se mikroorganizmi nalaze u različitim fazama razvoja, što dodatno doprinosi kompleksnosti ovakvog načina suživota. Značaj i prednost ovakvog načina života su mnogobrojne:

1. zaštita od nepovoljnih uslova spoljašnje sredine (nepovoljna temperatura, nedovoljna količina hranjivih materija, pH sredine)
2. zaštita od uobičajenih doza antibiotika i dezinficijensa
3. zaštita od imunskog sistema domaćina
4. ekspresija i razmjena genetskog materijala zbog specifičnih uslova života
5. smještaj mikroorganizama u određenim nišama ljudskog tijela, kao i na neživim površinama poput medicinskih implanta
6. preživljavanje na neživim objektima u intrahospitalnim uslovima.

Zbog svih nabrojanih prednosti i zahvaljujući razvoju dijagnostičkih tehničkih mogućnosti, shvatili smo da biofilm ima izuzetno značajnu ulogu u hroničnim infekcijama, te infekcijama vezanim za medicinske implante (kateteri, proteze, sonde...).

Klasični znaci na osnovu kojih se može posumnjati na infekciju vezanu sa biofilmom su:

1. hronične infekcije;
2. infekcije kod kojih se simptomi povuku tokom terapije, ali se vrate neposredno nakon prestanka terapije;
3. infekcije koje su povezane sa medicinskim implantima;
4. dugotrajne infekcije sa slabo izraženim simptomima;
5. infekcije kod kojih terapija ne dovodi do eradikacije i kod kojih se ponavljano izoluje isti patogen koji pokazuje osjetljivost na korištene antibiotike na antibiogramu.

Veoma je važno uvesti u svakodnevnu praksu i dokazivanje da izolovani sojevi imaju sposobnost produkcije biofilma, jer bi se na taj način dobile dodatne informacije i objašnjenja u slučaju terapijskog neuspjeha. Postoji nekoliko metoda koje se mogu koristiti i svaka laboratorija bi shodno svojim mogućnostima trebala da izabere jednu i uključi je u svakodnevnu praksu.

Takođe, istraživanja *in vitro* su pokazala da sojevi izolovani iz sistemskih infekcija slabije produkuju biofilm u odnosu na sojeve iste vrste izolovane iz lokalizovanih infekcija, poput infekcije rana ili respiratornih infekcija. Smatra se da se tokom sepsa i sistemskih infekcija ne stvaraju uslovi koji doprinose sesilnom načinu života, te da zbog toga nema ni ekspresije gena karakteristično aktivnih za bakterije u biofilmu. Ako bi se navedeni rezultati posmatrali doslovno, onda bi bilo vrlo jednostavno i lako zaključiti da biofilm nema značajnu ulogu u nastanku sistemskih infekcija.

Međutim, situacija u našem organizmu tokom sistemskih infekcija je puno kompleksnija, te je kao takvu treba i posmatrati sa više gledišta. Većina pacijenata sa sepsom je u veoma teškom stanju i

zahtijeva stalnu kateterizaciju (u cilju mjerenja diureze ili za aplikaciju parenteralne terapije) ili respiratornu potporu. Prisustvo katetera i/ili respiratora omogućava uslove za stvaranje biofilma, pri čemu nije neophodno da mikroorganizmi efikasno adherišu za vještačke materijale. Nakon višednevnog uvođenja kateteri i sonde se oblože proteinima domaćina olakšavajući adherenciju bakterija za obloženi kateter i lako stvaranje biofilma. Biofilm nije stabilna sredina, zbog nedostatka hrane dolazi do njegovog rasipanja, a planktonski oblici na takav način dospijevaju u krvotok, dovodeći do posljedičnog pogoršavanja simptoma i bolesti. Čak i ukoliko se kateteri redovno mijenjaju, dokazano je da adherencija bakterija i produkcija biofilma nastaje već u roku od nekoliko sati po njihovom uvođenju. Potpuno iznenađujuće, najnoviji podaci su pokazali da suportivna terapija tokom sepse (heparin, dopamin) djeluje stimulatивно na bakterije i indukuje produkciju biofilma.

S obzirom da očigledno ne možemo uticati na produkciju biofilma tokom sistemskih infekcija, onda je veoma važno naći efikasne načine da spriječimo širenje bakterija koje produkuju biofilm, te da radimo na razvijanju supstanci koje imaju antibiofilm dejstvo. Uvijek je dobro ponoviti da bakterije koje produkuju biofilm upravo zahvaljujući robustnosti i otpornosti biofilma, mogu preživjeti na neživim površinama u intrahospitalnim uslovima. Kao odličan antibiofilm dezinficijens su se pokazali preparati hlora i 75% alkohol, pri čemu su u našim testiranjima preparati hlora bili uspješniji. U eradikaciji biofilma je veoma bitno pravilno održavati dozu antibiotika kako ne bi došlo do subdoziranja antibioticima, jer takvi uslovi indukuju bakterije na produkciju biofilma. Kako antibiotici sve više gube borbu protiv bakterija, a pogotovo kad su u sastavu biofilma, razvijaju se nove antimikrobne supstance i strategije pomoću kojih bi trebali da utičemo ili na prevenciju nastanka biofilma ili na razaranje već stvorenog biofilma u ljudskom organizmu.

U zaključku možemo samo ponoviti da je nastanak biofilma u ljudskom tijelu kompleksan proces i da je bitno pronaći načine prevencije nastanka biofilma, jer još uvijek nemamo efikasan način za njegovu eradikaciju.

IZOLATI IZ KRVI I CEREBROSPINALNE TEČNOSTI IZ UNIVERZITetskOG KLINIČKOG  
CENTRA REPUBLIKE SRPSKE U 2016.GODINI

Travar Maja

[maja.travar@kc-bl.com](mailto:maja.travar@kc-bl.com)

Zavod za kliničku mikrobiologiju, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banja Luka

Univerzitetski klinički centar (UKC RS) je najveća zdravstvena ustanova u Republici Srpskoj (RS), sa kapacitetom preko 1100 bolesničkih postelja i sa prijemom pacijenta sa najtežim medicinskim stanjima iz cijele RS. Podaci o prvom izolatu iz krvi (hemokulture) i cerebrospinalne tečnosti (kultura likvora) od 1.januara do 31.decembra 2016 preuzeti su iz informacionog sistema UKC za sledeće izolate: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* i *Acinetobacter baumannii*. *Staphylococcus epidermidis* i druge koagulaza negativne stafilokoke (KNS) bili su izolovani u 317 uzoraka. Prije uključivanja podataka urađeni su konfirmatorni (fenotipski) testovi za visoko rezistentne organizme. Testiranje na antimikrobne lijekove u većini slučajeva izvršeno je u automatskom sistemu, a prilikom izolacije rezistentnih bakterija, izvršena potvrda fenotipskim testovima. Prema kliničkim vodičima, hemokulture su uzete svim pacijentima sa sumnjom na sepsu, a kultura likvora kod pacijenta sa sumnjom na meningitis. Broj ovih uzoraka ukupno od 1.1. 2016 do 31.12.2016. bio je 5882. Prosječna dužina hospitalizacije u UKC RS iznosi 5 dana.

**REZULTATI:** u 2016. godini bilo je ukupno 282 izolata *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* i *Acinetobacter baumannii*. *Staphylococcus epidermidis* i drugi koagulaza negativni stafilokoko bili su izolovani u 317 uzoraka. Osim *Staphylococcus epidermidis* i drugih KNS, najčešći izolati bili su *E.coli* (30%), *Klebsiella pneumoniae* (16%), *Acinetobacter baumannii* (16 %), *Staphylococcus aureus* (16%), a slijede *Enterococcus faecalis* (7%), *E. faecium* (6%), *Streptococcus pneumoniae* (4%). Kod *E. coli*, osim za aminopeniciline (70%), rezistencija se kretala od 0% za karbapeneme i ertapenem do 34% za treću generaciju cefalosporina i cefotaxime/ceftriaxone. Rezistencija na više antimikrobnih lijekova (MDR) bila je 18% za *E. coli*. Kod izolata *K. pneumoniae*, rezistencija se kretala od 47% do 77% za sve testirane antimikrobne lijekove osim za karbapeneme (29%), i kolistin (0%). MDR kod *K. pneumoniae* bila je 66%. Kod *P. aeruginosa*, rezistencija se kretala od 3% za kolistin do 85% za aminoglikozide. Rezistencija kod izolata *Acinetobacter* spp. bila je veoma visoka (89-92%) za sve testirane antimikrobne lijekove, osim za kolistin. MDR kod *Acinetobacter* spp. bila je 84%. 28 % izolata *S. aureus* bilo je MRSA. Kod *S. pneumoniae*, rezistencija na penicilin bila je 20%. Kod *E. faecalis*, rezistencija na vancomycin i linezolid bila je 0%. Na osnovu malog broja izolata *E. faecium* iz krvi, rezistencija na vancomycin je bila 43% a na linezolid 40%.

**ZAKLJUČAK:** Procenat izolacije iz hemokultura u UKC RS iznosi 10,18%. Najčešći izolati su *E.coli* i *Klebsiella pneumoniae* kod pacijenata sa sumnjom na urosepsu. Procenat rezistencije je uporediv sa zemljama u okruženju. U cilju unapređenja dijagnostike, napravljen je dijagnostičko-terapijski vodič za sepsu, koji definiše način, vrijeme uzimanja uzoraka, kao i empirijsku terapiju prema izolatima na pojedinim odjelima UKC RS.

**SESIJA: BAKTERIOLOGIJA**

**SESSION: BACTERIOLOGY**

**USMENE PREZENTACIJE/ ORAL**

**PRESENTATION**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
sa međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO

**DISTRIBUCIJA KAPSULARNIH TIPOVA I REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE INVAZIVNIH I  
NEINVAZIVNIH SOJEVA GRUPE B STREPTOKOKA U SRBIJI 2017. GODINE  
CAPSULAR TYPE DISTRIBUTION AND RESISTANCE TO ANTIBIOTICS AMONG INVASIVE  
AND NONINVASIVE GROUP B STREPTOCOCCI STRAINS IN SERBIA IN 2017**

Kekić Dušan <sup>1</sup>

[dusan\\_vk@yahoo.com](mailto:dusan_vk@yahoo.com)

Gajić Ina <sup>1</sup>, Popović Sunčica <sup>1</sup>, Opavski Nataša <sup>1</sup>, Bošković Lidija <sup>2</sup>, Vitorović Teodora <sup>2</sup>, Stojković Marina <sup>3</sup>, Bošković Tatjana <sup>4</sup>, Karanović Vesna <sup>5</sup>, Branković Milena <sup>6</sup>, Delić Snežana <sup>7</sup>, Mijač Vera <sup>1</sup>, Ranin Lazar <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

<sup>2</sup> Služba za mikrobiologiju, KBC „dr Dragiša Mišović - Dedinje“, Beograd

<sup>3</sup> Služba za mikrobiologiju, GAK „Narodni front“, Beograd

<sup>4</sup> Zavod za javno zdravlje, Čačak

<sup>5</sup> Zavod za javno zdravlje, Kraljevo

<sup>6</sup> Služba za mikrobiologiju, Opšta bolnica Užice

<sup>7</sup> Zavod za javno zdravlje, Sombor

**UVOD:** Grupa B streptokoka (GBS) je vodeći uzročnik obolevanja i smrtnosti kod novorođenčadi. Sojevi tipa III kapsularnog polisaharida koji pripadaju hipervirulentnom klonu ST-17, su česti izazivači neonatalnih infekcija, posebno sa kasnim početkom. Serotipovi V i III su u visokom procentu rezistentni na makrolide.

**CILJEVI** rada su procena distribucije cirkulišućih kapsularnih tipova kod invazivnih (I) i neinvazivnih (NI) izolata GBS, određivanje učestalosti prisustva hipervirulentnog klona CPS III/ST-17 i ispitivanje osetljivosti na antibiotike.

**MATERIJAL I METODE:** Studija je obuhvatila 133 izolata (112 NI i 21 I), izolovanih tokom 2017. godine. Invazivni izolati su poticali iz krvi i likvora, a neinvazivni iz vaginalno-rektalnog brisa i urina trudnica.

Kapsularni tipovi su određeni metodom multipleks PCR. Hipervirulentni klon ST-17 je identifikovan detekcijom *hvgA* gena. Osetljivost na antibiotike je ispitana disk difuzionom metodom, prema preporukama EUCAST.

**REZULTATI:** Među svim izolatima, najčešći su bili kapsularni tipovi III (28%) i V (26%), dok su tipovi Ia, Ib, II i IV nađeni kod ukupno 46% sojeva. Tipovi III i V su bili zastupljeni kod 57%, odnosno 23.8% invazivnih izolata, dok je kod neinvazivnih izolata nađeno 22.3% sojeva tipa III i 25.9% tipa V. Hipervirulentni klon III/ST-17 je bio prisutan kod 48% I i 41.6% NI izolata. Rezistencija na makrolide je iznosila 24% kod invazivnih i 31% kod neinvazivnih izolata, a cMLS fenotip rezistencije na makrolide je bio dominantan. Zabeležena je i visoka rezistencija na tetracikline (88%). Svi sojevi su bili osetljivi na penicilin, norfloksacin i vankomicin.

**ZAKLJUČAK:** Distribucija serotipova GBS u Srbiji je slična onoj u evropskim zemljama. Hipervirulentni klon III/ST-17 je detektovan kod velikog broja izolata. Visok nivo rezistencije na makrolide ukazuje na potrebu za rutinskim testiranjem GBS na antibiotike.

**KLJUČNE REČI:** GBS, hipervirulentni klon III/ST-17, rezistencija

**CAPSULAR TYPE DISTRIBUTION AND RESISTANCE TO ANTIBIOTICS AMONG INVASIVE  
AND NONINVASIVE GROUP B STREPTOCOCCI STRAINS IN SERBIA IN 2017**

Kekić Dušan <sup>1</sup>

[dusan\\_vk@yahoo.com](mailto:dusan_vk@yahoo.com)

Gajić Ina <sup>1</sup>, Popović Sunčica <sup>1</sup>, Opavski Nataša <sup>1</sup>, Bošković Lidija <sup>2</sup>, Vitorović Teodora <sup>2</sup>, Stojković Marina <sup>3</sup>, Bošković Tatjana <sup>4</sup>, Karanović Vesna <sup>5</sup>, Branković Milena <sup>6</sup>, Delić Snežana <sup>7</sup>, Mijač Vera <sup>1</sup>,  
Ranin Lazar <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for microbiology and immunology, Medical Faculty, University of Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> Departement for microbiology, KBC „dr Dragiša Mišović - Dedinje“, Beograd

<sup>3</sup> Departement for microbiology, GAK „Narodni front“, Beograd

<sup>4</sup> Center for public health, Čačak

<sup>5</sup> Center for public health, Kraljevo

<sup>6</sup> Departement for microbiology, County hospital Užice

<sup>7</sup> Center for public health, Sombor

**INTRODUCTION:** Group B streptococcus (GBS) remains the leading infectious cause of morbidity and mortality among newborns. A significant proportion of group B neonatal disease, particularly late-onset, is associated with strains of serotype III, hypervirulent sequence type, ST-17 clone. High level macrolide resistance among GBS isolates, especially in CPS types V and III is observed.

**AIM:** The aims of this study were to estimate the distribution of circulating CPS types among invasive (I) and noninvasive (NI) GBS isolates, the prevalence of the hypervirulent clone III/ST-17 and to determine antimicrobial susceptibility.

**MATERIAL AND METHODS:** The study included 133 isolates (112 NI and 21 I), collected during 2017. Invasive strains were isolated from blood and CSF, while noninvasive originated from vaginal-rectal swabs and urine of pregnant women. Capsular types were determined by multiplex PCR. The hypervirulent clone ST-17 was identified by *hvgA* gene detection. Antibiotic susceptibility was tested by disk diffusion method, according to EUCAST.

**RESULTS:** Overall, the most common CPS types were III (28%) and V (26%), followed by Ia, Ib, II, IV which accounted for 46% of isolates. Distribution of CPS types III and V in invasive isolates was 57% and 23.8% respectively, while 22.3% of the strains of type III and 25.9% of type V was found among noninvasive isolates. Hypervirulent clone III/ST-17 was found both in I and NI isolates (48% and 41.6% respectively). Macrolide resistance of I and NI isolates was 24% and 31% respectively, with predominance of cMLS phenotype of macrolide resistance. Tetracycline resistance was high (88%). All tested strains were susceptible to penicillin, norfloxacin, and vancomycin.

**CONCLUSION:** Serotype distribution of GBS isolates in Serbia is similar to those reported in European countries. The hypervirulent clone III/ST-17 was recovered in substantial number of isolates. High level of macrolide resistance among GBS indicates the need for the routine antimicrobial testing.

**KEY WORDS:** GBS, hypervirulent clone III/ST-17, resistance

**DETEKCIJA IZVORA U NEŽIVJOJ BOLNIČKOJ SREDINI SPORA C. DIFFICILE U INTENZIVNOJ  
JEDINICI KLINIKE ZA NEUROHIRURGIJU  
DETECTION OF ENVIRONMENTAL SOURCES OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE IN ICU ON CLINIC OF  
NEUROSURGERY**

Popovska Katja <sup>1</sup>

[katja.popovska@t.mk](mailto:katja.popovska@t.mk)

Kartalov A <sup>2</sup>, Trajkovska-Dokik E<sup>1</sup>, Kuzmanovska B<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut za mikrobiologiju i parazitologiju UKIM Skoplje,

<sup>2</sup>KARIL klinika za anesteziologiju, intenzivnu negu i reanimaciju

**UVOD :** C. difficile je veoma osetljiv na kiseonik čak i u veoma niskim koncentracijama, ali on može preživeti u spoljašnjoj sredini u obliku metabolički neaktivni spora. Laboratoriski rad sa C. difficile zahteva izbegavanje kislorodne kontaminacije t.j. strogo kontrolirane anaerobne uslove i obogakene hranjive podloge za reduktivnim sredstvima (tioglikolat i L-cistin) kao i antibiotske mešavine (cikloserin kao inhibitor gram pozitivnih bakterija i cefoksitin za inhibiciju gram pozitivnih i gram negativnih bakterija).

**CILJ RADA:** Detekcija C.difficile iz bolničke nežive sredine u intenzivnoj jedinici na klinici za neurohirurgiju gde su bili detektirani pacijenti za infekcijom/kolonizacijom sa ovom bakterijom. Materijal i metode: Uzeto je 120 briseva i 60 uzoraka ruku od pacijenata (tač metodom). Brisevi su prema Edwardsu i sar. (1) inokulirani u pred-pripremljeni anaerobnim selektivni tioglikolatni bujon (TB) ( izložen reduktivnim uslovima 24č pre upotrebe), nakon inokulacije kapci na epruvetama su odmah bili omotani lepljivom trakom i stavljeni odmah u anaerobnu komoru koja je isto bila pred-pripremljena 24č. Inkubacioni period je bio 48č /37°C. Preafivanje je vršeno na čvrsti selektivni CD medium takođe pred-pripremljen za anaerobne uslove 2č pre upotrebe. Lepljivom trakom omotan oko ivice kapka nakon zasevanja i dalji kultivisan u anaerobnim uslovima sledeka 48č.tačmetod je izvođen na istom selektivnom CD medijumu u anaerobnim uslovima.

**Rezultati i diskusija**

**ZAKLJUČAK**

**KLJUČNE REČI:** Clostridium difficile, neživa sredina, anaerobna kultivacija

**DETECTION OF ENVIRONMENTAL SOURCES OF CLOSTRIDIUM DIFICILE IN ICU ON CLINIC OF  
NEUROSURGERY**

Popovska Katja <sup>1</sup>

[katja.popovska@t.mk](mailto:katja.popovska@t.mk)

Kartalov A <sup>2</sup>, Trajkovska-Dokik E<sup>1</sup>, Kuzmanovska B<sup>1</sup>

<sup>1</sup>.Institute for microbiology UKIM Skopje RM;

<sup>2</sup>.Klinic for anesthesiology, intensive care and reanimation KARIL UKIM Skopje

**INTRODUCTION:** *C. difficile* is very sensitive to oxygen even to low level in the environment, but it can persist in the environment as metabolically inactive spore. Laboratory manipulation of *C. difficile* requires a no oxygen contamination e.g. controlled anaerobic conditions and enriched nutrient media with reductive agents (Thioglycolate and L-cistine) and antibiotic mixture (cycloserine as inhibitor of Gram positive bacteria and ceftioxin to inhibit growth gram negative and Gram positive bacteria).

**AIM OF STUDY:** Recovery of *C. difficile* from hospital environment in ICU on Clinic of neurosurgery unit since there have been detected patients with CDI or CD colonization confirmed previously.

**MATERIAL AND METHODS:** Samples were collected. 120 dried swabs from patient's beds and 60 samples from patient's hands (touch method). Swabs were inoculated on Edinburg (1) in pre-reduced anaerobic selective media Thioglycolate broth (TB) (stored in anaerobic atmosphere for 24h before sampling), taped around the tube's lids and immediately put into previously prepared anaerobic jars. Incubation period was for 48h/ 37°C. Replacing one loop over selective CD selective media. Touch method was performed also on CD selective media previously prepared in anaerobic conditions for two hours, taped around the lids and incubated in previously prepared anaerobic jars.

**RESULTS AND DISCUSSION:** Survey resulted with CDI in group of patient without administration of probiotic with 37,5% (7-10<sup>th</sup> day) and 12,5% in patients group protected with probiotic. Recovery of *C. difficile* from hospital environmental samples estimated 9% (N=120) and 6,8 (N=60) from patients hands.

**CONCLUSION:** Selective anaerobic media in combination with strictly controlled anaerobic conditions during sampling can be effective in recovery of *C. difficile*

**KEY WORDS:** *Clostridium difficile*, environment, anaerobic cultivation



**EPIDEMIOLOGIJA I EMM TIPOVI INVAZIVNOG STREPTOKOKA GRUPE A U SRBIJI**  
**EPIDEMIOLOGY AND EMM TYPES OF INVASIVE GROUP A STREPTOCOCCAL INFECTIONS IN**  
**SERBIA**

Popović Sunčica

[suncicaPBG@gmail.com](mailto:suncicaPBG@gmail.com)

Gajić Ina, Kekić Dušan, Mijač Vera, Ranin Lazar, Opavski Nataša

Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**UVOD:** *Streptococcus pyogenes* (grupa A streptokoka, GAS) je izaziva invazivne infekcije, kao što su bakterijemija, nekrotizirajući fascitis (NF) i streptokokni toksični šok sindrom (STŠS). U Srbiji ima malo podataka o molekularnoj epidemiologiji infekcija izazvanih invazivnim GAS (iGAS).

**CILJ:** Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita distribucija emm tipova iGAS u našoj zemlji.

**METOD:** U periodu od 2010. do 2018. godine, 5 laboratorija iz Beograda i 6 iz Vojvodine i Centralne Srbije je učestvovalo u prikupljanju 63 soja iGAS iz primarno sterilnih regija (krv, likvor, pleuralna i peritonealna tečnost), kao i iz nekrotičnog tkiva kod pacijenata sa NF i STŠS. *Emm* tipovi su određivani prema protokolima CDC-a, dok je testiranje osjetljivosti na antibiotike vršeno prema preporukama EUCAST-a.

**REZULTATI:** Sojevi iGAS su bili izolovani iz krvi (41; 65.6%), likvora (7; 11%), pleuralne i peritonealne tečnosti (6; 9.4%) i nekrotičnog tkiva (9; 14%). Medijana starosti pacijenata je bila 52 godine, (rang, 3-88), i 55% pacijenata je bilo muškog pola. Najčešća dijagnoza kod pacijenata sa izolovanim iGAS je bila sepsa (30%), meningitis (15%), NF (6.2%) i pneumonija (5%). Najučestaliji *emm* tipovi su bili *emm1* (35%), *emm89* (15%), *emm3* (15%), *emm75* (9%) i *emm12* (7%). U Beogradu je primećen najveći diverzitet *emmtipova*. *Emm1* tip je bio najzastupljeniji kod pacijenata sa sepsom i NF. Rezistencija na eritromicin je postojala kod 7.8% izolata, a na klindamicin kod 3.1%. Tri *emmtipa* (*emm1*, *emm89* i *emm75*) su detektovana kod sojeva rezistentnih na makrolide.

**ZAKLJUČAK:** U ovoj studiji laboratorijskog nadzora nad iGAS je pokazano da su 4 *emm* tipa dominantna. Međutim, klinički i demografski podaci su vrlo oskudni, te je u Srbiji neophodno uspostaviti sveobuhvatan sistem nadzora nad invazivnim infekcijama koje izaziva GAS.

**KLJUČNE REČI:** invazivni *Streptococcus pyogenes*, rezistencija na antibiotike, *emm* tipovi

**EPIDEMIOLOGY AND EMM TYPES OF INVASIVE GROUP A STREPTOCOCCAL INFECTIONS IN  
SERBIA**

Popović Sunčica

[suncicaPBG@gmail.com](mailto:suncicaPBG@gmail.com)

Gajić Ina, Kekić Dušan, Mijač Vera, Ranin Lazar, Opavski Nataša

Institute for microbiology and immunology, Medical Faculty, University of Belgrade, Serbia

**INTRODUCTION:** *Streptococcus pyogenes* (group A streptococcus, GAS) is associated with serious invasive infections, including bacteremia, necrotizing fasciitis (NF), and streptococcal toxic shock syndrome (STSS). There are little data on molecular epidemiology of invasive GAS infections in Serbia.

**AIM:** The aim of the study was to assess *emm* type distribution of invasive GAS (iGAS) infections in our country.

**METHODS USED:** Between 2010 and 2018, 5 laboratories from Belgrade and 6 laboratories located throughout Vojvodina and Central Serbia collected 63 iGAS strains from normally sterile sites (blood, CSF, pleural and peritoneal fluid) and from a necrotic tissue accompanied by NF or STSS. The *emm* types of GAS isolates were determined according to the recommendations of CDC. The antimicrobial susceptibility testing was done using the disc diffusion test method according to the EUCAST.

**RESULTS:** iGAS strains were isolated from blood (41 cases; 65.6%), CSF (7; 11%), pleural and peritoneal fluid (6; 9.4%) and necrotic tissue (9; 14%). The median age was 52 years (range, 3–88) and 55% were males. The most common diagnosis in patients with iGAS were sepsis (30%), meningitis (15%), NF (6.2%) and pneumonia (5%). The five most common *emm* types were *emm1* (35%), *emm89* (15%), *emm3* (15%), *emm75* (9%), and *emm12* (7%). The greatest diversity of *emm* types was observed in Belgrade. *Emm1* type was observed in patients mostly suffering from sepsis and NF. The erythromycin and clindamycin resistance were observed in 7.8% and 3.1% of isolates, respectively. In the macrolide-resistant population, three *emm* types were detected: *emm1*, *emm89*, and *emm75*.

**CONCLUSION:** In this laboratory based surveillance study we documented the predominance of four *emm* types among Serbian iGAS isolates. However, clinical and demographic data are scarce and there is a need for establishment of comprehensive iGAS infection surveillance systems in Serbia.

**KEY WORDS:** Invasive *Streptococcus pyogenes*, antibiotic resistance, *emm* types

**PREVALENCE OF THE MOST COMMON NON-FERMENTING GRAM-NEGATIVE BACTERIA  
ORIGINATED FROM PEDIATRIC INTENSIVE CARE UNITS IN R. MACEDONIA**

Kakaraskoska Boceska Biljana  
[kakaraskoska@yahoo.com](mailto:kakaraskoska@yahoo.com)

Petrovska Basovska Branka, Osmani Dugagjin, Memeti Shaban, Cvetkovik Snezana, Coneva  
Elizabeta  
Institute of Public Health of R. Macedonia, Skopje, R. Macedonia

**INTRODUCTION:** The most common non-fermenting Gram-negative bacteria are *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, followed by *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* and *Achromobacter xylosoxidans*. Multi-resistance of these bacteria has emerged as a major therapeutic problem, especially in the Intensive Care Units (ICU).

**AIM:** To show the prevalence of the most common non-fermenting Gram-negative bacteria in the Pediatric Intensive Care Units (PICU) in R. Macedonia.

**MATERIAL AND METHODS:** It is a retrospective study for a period of 1 year (2017), conducted in three wards for PICU. The isolates originated from clinical specimens such as: blood cultures, tracheal aspirates, wounds and urine samples. Identification and susceptibility testing were done with standard microbiological methods, also using automated VITEK2 system. EUCAST standards for interpretation were used.

**RESULTS:** The total number of specimens was 1445. Blood cultures were 1120 (77%), tracheal aspirates 229 (16%), following by urine samples (56 or 4%) and wounds-40 (3%). Positive findings were detected in 72,5% of the wounds, 39% of the tracheal aspirates, 36% of the urine samples and almost 10% of the blood cultures. Out from the positive samples, *Acinetobacter spp.* was most present in the tracheal aspirates, with 27%, in the wounds with 24%, followed by 6,5% in the blood cultures and 5% from the positive urine samples. *Pseudomonas aeruginosa* in the urine samples was not detected at all but present with 16% in the tracheal aspirates, 14% in the wounds and 2% from the blood cultures. From other non-fermenting bacteria that were of interest for this study, *Stenotrophomonas maltophilia* was present in total 4 samples (3 tracheal aspirates and 1 blood culture), and *Burkholderia cepacia* and *Achromobacter xylosoxidans* were isolated from 1 sample each.

**CONCLUSION:** *Acinetobacter baumannii* is the the most present non-fermenting bacteria in the tracheal aspirates and wounds, followed by *Pseudomonas aeruginosa*.

**KEYWORDS:** Non-fermenting, Gram-negative bacteria, Intensive Care Units

**SESIJA: ANTIMIKROBNA TERAPIJA**

**I REZISTENCIJA**

**SESSION: ANTIMICROBIAL**

**THERAPY AND RESISTANCE**

**PREDAVANJA PO POZIVU/**

**INVITED LECTURES**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
sa međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO

## REZISTENCIJA NA KOLISTIN - STARI LEK, NOVI PROBLEM

Mladenović-Antić Snežana

Institut za javno zdravlje Niš

Pojava multirezistentnih Gram-negativnih bakterijskih patogena predstavlja sve veći problem, i u terapijskom i u epidemiološkom smislu. Najvažniji predstavnici ove grupe mikroorganizama za humanu patologiju su bakterije iz familije *Enterobacteriaceae*, kao i vrste *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*. Infekcije koje izazivaju su vrlo teške, sa izuzetno visokim morbiditetom i mortalitetom. Ovi mikroorganizmi najčešće su rezistentni na veliki broj antimikrobnih lekova, u koje spadaju beta laktamski antibiotici, uključujući i karbapeneme, aminoglikozidi, hinoloni, tetraciklini i drugi. Terapijske opcije za tretman infekcija izazvanih ovakvim multirezistentnim, ekstremno- i panrezistentnim sojevima vrlo su ograničene, a najčešće se svode na upotrebu fosfomicina, tigeciklina i kolistina. Povratak starog antibiotika kolistina uzrokovan je povećanom incidencom ovih sojeva i nedostatkom novih antimikrobnih lekova. Kolistin spada u katjonske ciklične polipeptide koji su četrdesetih godina prošlog veka uvedeni u kliničku praksu. Od pet opisanih polimiksina (A-E), za terapiju se koriste kolistin (polimiksin E) i polimiksin B.

Mehanizam dejstva- polimiksinski antibiotici su katjonski agensi koji reaguju sa negativno naelektrisanim fosfatnim grupama lipida A u lipopolisaharidu (LPS). Vezivanje polimiksina za lipid A dovodi do izmeštanja  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  jona i oštećenja ćelijske membrane koje dovodi do uništenja bakterijske ćelije. Takođe, polimiksini u ovom procesu učestvuju i u neutralizaciji bakterijskih endotoksina. U mehanizme dejstva polimiksina uključena je i inhibicija ključnog respiratornog ćelijskog enzima koji se nalazi u ćelijskoj membrani bakterije- NADH- kvinon- oksidoreduktaze tipa 2 (NDH-2). Polimiksini su selektivni za Gram-negativne bakterije koje imaju hidrofobnu spoljnu membranu.

Kolistimetat-natrijum je ciklični polipeptidni antibiotik dobijen iz *Bacillus polymyxa* var. *colistinus* i pripada grupi polimiksina. Kolistimetat natrijum je polianjonska neaktivna forma leka, manje toksična od kolistin sulfata. Po intravenskoj administraciji, potrebno je nekoliko sati da se konvertuje u aktivan oblik leka i postigne dovoljnu koncentraciju. Najvećim delom eliminiše se nepromenjen urinom (60%), i ima nefrotoksični efekat.

Rezistencija na kolistin posledica je delom i sve veće upotrebe ovog leka u terapiji infekcija izazvanih multirezistentnim Gram-negativnim bacilima. Osim prekomerne ili neadekvatne upotrebe u humanoj medicini, jedan od najvažnijih faktora razvoja rezistencije predstavlja i njegova neracionalna upotreba u veterinarskoj medicini, što je posebno karakteristično za zemlje Dalekog istoka.

Rezistencija bakterija se karakteriše supstitucijom negativno naelektrisane fosfatne grupe na lipopolisaharidu A pozitivno naelektrisanim fosfoetanolaminom i/ili 4-amino deoksi-L-arabinozom, što sprečava vezivanje kolistina. Ove izmene posledica su mutacija u dvokomponentnom sistemu prenosa signala (TCS) koji reguliše gene potrebne za modifikaciju lipopolisaharida. Mutacije *phoPQ* i *pmrAB* gena najčešće su detektovane kod *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter* sp.

Unutrašnja rezistencija detektovana je kod rodova *Proteus* sp., *Providencia* sp., i *Serratia* sp., kao i kod vrste *Burkholderia cepacia*. Njihov lipidni fosfat kompletno je supstituisan etanolaminom ili aminoarabinozom, koja je posledica konstitutivne ekspresije *arnBCADTEF* operona i *eptB* gena.

Rezistencija na kolistin može biti hromozomska ili plazmidska. Hromozomska posredovana rezistencija na kolistin kod *K.pneumoniae* bazira se na izmeni TCS sistema i mutaciji *mgrB* gena koji uzrokuju signifikantne izmene LPS. Takođe, izmene ovog gena insercionim sekvencama (*IS5*-like, *ISF1*-like i *ISKpn14*) dovode do njegove kompletne inaktivacije i rezistencije na kolistin sa MIK vrednostima od 4 do 64 µg/ml. Ove sekvence prisutne su na plazmidima koji nose i *bla<sub>KPC</sub>* gen, što predstavlja rizik za nastanak panrezistentnih sojeva.

Hromozomski posredovana rezistencija na kolistin kod *P. aeruginosa* posledica je mutacija u *phoPQ* i *pmrAB* genima koje kodira TCS i dovode do modifikacije LPS i uzrokuju rezistenciju sa MIK vrednostima od 4 do >512 µg/ml, a hromozomski posredovana rezistencija na kolistin kod *Acinetobacter baumannii* zasniva se na prisustvu PEtN molekula u LPS, koji je prvo opisan kod enterobakterija, a kodiran je pomoću *pmrAB* TCS. Za razliku od enterobakterija i *P. aeruginosa*, nema *phoPQ* sistema. Drugi mehanizam uključuje mutaciju gena *lpxA*, *lpxC* i *lpxD*, koja vodi do kompletnog gubitka lipida A i uzrokuje rezistenciju sa vrednostima MIK >128 µg/ml.

Plazmidski posredovana rezistencija na kolistin detektovana je 2015. godine, otkrićem *mcr-1* gena koji se nalazi na *Incl2* familiji plazmida. Ovaj plazmid otkriven je u soju *E. coli* izolovanom kod životinja i ljudi u Kini. Gen *mcr-1* kodira fosfoetanolamin transferazu koja fosfoetanolamin dodaje na lipid A i time sprečava vezivanje kolistina. Gen *mcr-1* otkriven je i u Belgiji, Švajcarskoj, Francuskoj, Nemačkoj, Holandiji i Maleziji, kod ljudi, životinja i u spoljašnjoj sredini. U nekim studijama iz Kine, ovaj gen nađen je na različitim plazmidima u izolatima poreklom iz stolice, što ukazuje na mogućnost njihovog samostalnog prenošenja. Varijanta ovog gena nazvana *mcr-1.2* sa supstitucijom samo jedne aminokiseline (glicin-leucin na poziciji 3) identifikovana je u Italiji kod izolata *Klebsiella pneumoniae* koji je proizveo KPC karbapenemazu. Gen *mcr-2* otkriven je na *IncX4* plazmidu u izolatu *E. coli* a gen *mcr-3* kod bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* i *Aeromonas* sp., na *IncHI2* plazmidu.

Zbog pojave sve većeg broja multirezistentnih sojeva koji mogu biti tretirani samo kolistinom, postoji potreba za brzom, efikasnom i preciznom metodom testiranja osetljivosti na ovaj lek.

Testiranje osetljivosti na kolistin ima poseban značaj- lažno osetljivi izolati spadaju u najveće greške (VME), ali i lažno rezistentni (ME), u situacijama kada je ovaj lek jedina terapijska opcija, imaju podjednak značaj. Ovde je značaj esencijalnog slaganja (slaganja ne samo po kategoriji, nego i po MIK vrednostima) mnogo veći nego kod mnogih drugih lekova.

Do sada su u upotrebi bile različite metode ispitivanja osetljivosti: disk-difuziona metoda, gradijent test, automatizovani sistemi, brzi test, agar i bujon dilucija i bujon mikrodiluciona metoda (BMD).

Disk difuziona metoda: ne preporučuje se zbog loše difuzije kolistina u agaru, što uzrokuje male zone inhibicije i nepouzdana rezultate testa, i nikad nije bila u EUCAST preporukama.

Gradijent test- po podacima nekih autora daje poklapanje sa BMD. Međutim, studije u koje je bio uključen veći broj visokorezistentnih izolata daju podatke o velikom broju vrlo velikih grešaka (VME), do više od 32%. Uzrok ovoj pojavi može biti loša difuzija u agaru i njegov katjonski sastav. Gradijent test ima nešto bolje rezultate kod izolata kod kojih nema rezistencije na kolistin (MIC≤2 mg/L) nego kod kolistin rezistentnih (MICs >2 mg/L). U nekim slučajevima, u rezultate testiranja kod osetljivih izolata može se pouzdati bez obzira što je određivanje nivoa rezistencije nedovoljno precizno. Rezultati nekih studija ukazuju da, iako je većina izolata bez rezistencije na kolistin kategorisana kao osetljiva, i neki izolati sa rezistencijom kategorisani su kao osetljivi ili rezistentni. Osim toga, suštinsko slaganje kod osetljivih izolata takođe nije bilo zadovoljavajuće- MIK je bio niži i kod osetljivih i kod rezistentnih izolata u odnosu na BMD. Najverovatnije je to posledica loše difuzije u agaru, kao i kod disk-difuzione metode. Gradijent test ima bolje rezultate kod *E. coli* i *K. pneumoniae* nego kod *P. aeruginosa* i *Acinetobacter* spp.

Automatizovani sistemi (Vitek 2 sistem, TREK Sensititre sistem MicroScan WalkAway) takođe daju nezadovoljavajuće slaganje sa referentnom metodom (78,6%, 96%, 88,1%, datim redom) i ne preporučuju se za rutinsko testiranje.

Rapid polymyxin NP test bazira se na bakterijskom rastu u medijumu sa definisanom koncentracijom kolistina (5 µg/ml). Detekcija porasta vrši se na osnovu promene boje medijuma iz narandžaste u žutu u prisustvu kiselih produkata metabolizma glukoze. Rezultati su dostupni za 2-4 sata, ne zahteva posebnu opremu ni obučenosnost osoblja. Senzitivnost i specifičnost testa kreće se od 99,3- 100% i 95,4 do 100%.

Bujon mikrodilucioni test smatra se referentnim testom za određivanje osetljivosti na kolistin. Ovaj test predstavlja komplikovanu metodu, posebno za rutinski laboratorijski rad, ali komercijalni BMD testovi su jednostavni za korišćenje i ne zahtevaju dodatnu opremu ili posebnu

obuku. Oni imaju najbolju korelaciju sa BMD testom. Lažno senzitivni rezultati najčešći su kod *Pseudomonas aeruginosa*.

Za sve navedene testove potrebna je dalja evaluacija. Za dalju procenu validnosti testova za određivanje osetljivosti na kolistin potrebno je obezbediti veliki broj izolata sa širokim spektrom osetljivosti, od potpuno osetljivih do visoko rezistentnih. Najveći broj grešaka kod određivanja osetljivosti zabeležen je kod izolata čiji MIK je bio blizu graničnih vrednosti. Kako ne postoji kategorija intermedijarnog, sve greške u testiranju spadaju u velike i vrlo velike greške.

Konačna preporuka EUCAST protokola bila bi bujon mikrodilucija kao referentna metoda testiranja, po ISO standardu 20776-1 umesto testiranja gradijent testom ili automatizovanim sistemima. Kao negativna kontrola preporučuju se *Escherichia coli* ATCC® 25922™ (0,25-2 µg/ml) i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853™ (0,5-4 µg/ml), a kao pozitivna kontrola kolistin rezistentna *E. coli* NCTC 13846 *mcr-1* pozitivna (4 µg/ml - 8 µg/ml), sa ciljanom vrednosti 4µg/ml.

Problemi rezistencije na kolistin najuočljiviji je u infekcijama MDR sojevima kod kojih on predstavlja najčešće jedinu terapijsku opciju. Zbog toga je pravilna detekcija osetljivosti na kolistin od ključnog značaja u terapiji.

S obzirom na činjenicu da mnoge studije ukazuju na nedovoljnu preciznost metoda kao što su disk-difuzija, gradijent test i automatizovani sistemi, kao jedina mogućnost ostaje bujon mikrodiluciona metoda, i ona bi trebalo da bude rezervisana samo za one MDR izolate kod kojih je detektovana rezistencija na sve ostale raspoložive antimikrobne lekove.

Rezistencija na kolistin kod Gram-negativnih bakterija je u porastu, a činjenica da se geni rezistencije nalaze i na plazmidima ukazuje na mogućnost brze transmisije i širenja u ljudskoj populaciji. Poseban značaj ima pojava i širenje sojeva rezistentnih na kolistin u bolničkim sredinama. Heterorezistencija nastala izlaganjem bakterija suboptimalnim dozama kolistina je poseban problem čiji klinički značaj tek treba ispitati.

U Institutu za javno zdravlje u Nišu poslednjih godina beleži se porast rezistencije na kolistin, a odnosi s u najvećem broju slučajeva na vrste *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*. Poseban problem predstavlja i sve veći broj multirezistentnih i sktremno rezistentnih Gram-negativnih bacila, gde kolistin predstavlja jednu od retkih, a nekada i jedinu terapijsku opciju. Iz tih razloga, u rutinsku laboratorijsku praksu je, po preporuci EUCAST protokola, uvedena bujon mikrodiluciona metoda umesto dosadašnjeg korišćenja gradijent testa i Vitek 2 sistema. Takođe, vrlo je važno praćenje kretanja rezistencije i incidenca multirezistentnih sojeva Gram-negativnih bacila, posebno onih koji su rezistentni na kolistin, ne samo zbog terapijskog pristupa, već i zbog prevencije daljeg širenja rezistencije, posebno u bolničkim sredinama.

## REFERENCE

1. Tanwar J, Das S, Fatima Z, Hameed S. Multidrug resistance: an emerging crisis. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2014;2014:541340.
2. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:1206–15.
3. Perez LRR. Evaluation of polymyxin susceptibility profile among KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* using Etest and MicroScan WalkAway automated system. *APMIS* 2015; 123:951–4.
4. Kwa AL, Tam VH, Falagas ME. Polymyxins: a review of the current status including recent developments. *Ann Acad Med Singapore* 2008;37: 870–83.
5. Aquilini E, Merino S, Knirel YA, Regue M, Tomas JM. Functional identification of *Proteus mirabilis* *eptC* gene encoding a core lipopolysaccharide phosphoethanolamine transferase. *Int J Mol Sci* 2014; 15:6689–702, Lin QY, Tsai YL, Liu MC, Lin WC, Hsueh PR, Liaw SJ.
6. Mitrophanov AY, Jewett MW, Hadley TJ, Groisman EA. Evolution and dynamics of regulatory architectures controlling polymyxin B resistance in enteric bacteria. *PLoS Genet* 2008; 4: e1000233.
7. Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, *et al.* *PmrB* mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:1019–30.

8. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T *et al.* Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:4971-77
9. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J *et al.* Emergence of plasmid mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases* 2015; 16: 161-8
10. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AM, Diederens BM, Kluytmans JA, van Keulen PH. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, Etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3726-30
11. Tan TY, Ng SY. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13:541-4.
12. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. 2016. Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2016; 22:1038-43
13. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1678-84.
14. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1953-8.
15. Matuschek E, et al., Antimicrobial susceptibility testing of colistin e evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter spp.* *Clin Microbiol Infect* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.020>
16. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical and Laboratory Standards Institute. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. 2016. [http://www.eucast.org/guidance\\_documents/](http://www.eucast.org/guidance_documents/).
17. Bakthavatchalam YD, Pragasam AK, Biswas I, Veeraraghavan B. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanism: an update *J Glob Antimicrob Resist* 2018;124-136 <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.011>



**OSETLJIVOST MULTIPLO REZISTENTNIH SOJEVA *ACINETOBACTER BAUMANNII* NA  
NEKONVENCIONALNE ANTIMIKROBNE AGENSE  
SENSITIVITY OF MULTYDRUG-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* STRAINS TO  
UNCONVENTIONAL ANTIMICROBIAL AGENTS**

Aleksić Sabo Verica

[verica.aleksic@dbe.uns.ac.rs](mailto:verica.aleksic@dbe.uns.ac.rs)

Knežević Petar

Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

**UVOD:** Jedan od najznačajnijih izazova za ljudsko zdravlje predstavlja širenje rezistencije bakterija na antimikrobne agense. Jedna od najčešće detektovanih multiplo rezistentnih bakterija je nozokomijalni, oportunistički humani patogen *Acinetobacter baumannii*. Ova vrsta ima veoma visok stepen rezistencije na antibiotike, zbog čega je njena eradikacija izuzetno teška. Iz tog razloga, nekonvencionalni antimikrobni agensi sve više postaju predmet interesovanja, a najčešće se proučavaju bakteriofagi, antimikrobni peptidi, etarska ulja, biljni ekstrakti i njihove bioaktivne komponente.

**CILJ:** Pronalaženje novih, nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa prirodnog porekla i strategija za kontrolu multiplo rezistentnih *Acinetobacter baumannii* izolata iz rana kombinovanjem konvencionalnih i nekonvencionalnih agenasa.

**METOD:** Efekat nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa je određivan primenom metoda za utvrđivanje antimikrobne aktivnosti (CLSI, 2007), a metodom za utvrđivanje sinergističkih interakcija ispitan je efekat kombinacije agenasa. Ispitan je efekat 39 etarskih ulja (biljaka iz familija Myrtaceae, Cupressaceae, Lamiaceae, Apiaceae i Asteraceae), 14 biljnih ekstrakata (iz familija Polygonaceae, Urticaceae i Alliaceae) i efekat kombinovanja odabranih etarskih ulja sa polimiksinom B, ciprofloksacinom i gentamicinom. Ispitan je i efekat 11 komponenti etarskih ulja:  $\alpha$ -pinen, (R)-(+)-limonen, sabinen, 3-karen,  $\alpha$ -terpinen,  $\gamma$ -terpinen, terpinolen, (-)-terpinen-4-ol, timol, karvakrol i eugenol.

**REZULTAT:** Bakteriostatsku aktivnost (MIC<4  $\mu$ L/mL) ispoljilo je 69,2 % ispitivanih etarskih ulja, a najefikasnija ulja bila su *O. vulgare*, *E. camaldulensis*, *T. vulgaris*, *S. officinalis* i *M. communis*. Takođe, antibakterijski efekat je potvrđen za 42,9 % ekstrakata (najefikasnija su *Rumex sanguineus* i *Rumex crispus*) i za 27,3 % komponenti ulja (najaktivnije su karvakrol, timol i eugenol). Kombinacije etarskih ulja sa antibioticima su se pokazale kao izuzetno efikasne, u smislu velikog broja detektovanih sinergističkih interakcija (polimiksin B u kombinaciji sa uljima *M. communis* ili *E. camaldulensis*).

**ZAKLJUČAK:** Multiplo rezistentni sojevi *Acinetobacter baumannii* su osetljivi na mnoge ispitivane nekonvencionalne antimikrobne agense, pojedinačno i u kombinaciji sa antibioticima, zbog čega imaju izuzetan potencijal u kontroli rasta ove vrste.

**KLJUČNE REČI:** *Acinetobacter baumannii*, etarska ulja, biljni ekstrakti

**SENSITIVITY OF MULTYDRUG-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* STRAINS TO  
UNCONVENTIONAL ANTIMICROBIAL AGENTS**

Aleksić Sabo Verica

[verica.aleksic@dbe.uns.ac.rs](mailto:verica.aleksic@dbe.uns.ac.rs)

Knežević Petar

Department of biology and ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Serbia

**INTRODUCTION:** One of the most important challenges for human health is the spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. Commonly detected multidrug-resistant bacterium is nosocomial, opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii*. This species has a very high antibiotics resistance degree, making her eradication extremely difficult. Thus, unconventional antimicrobial agents are becoming object of interest, most commonly bacteriophages, antimicrobial peptides, essential oils, plant extracts and their bioactive components are studied.

**AIM:** Finding new, unconventional antimicrobial agents of natural origin and strategies for control multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* wound isolates combining conventional and unconventional agents.

**MATERIAL AND METHODS:** The effect of unconventional antimicrobial agents was determined using methods for antimicrobial activity determination (CLSI, 2007), and effect of agents combination was investigated using the method for determining synergistic interactions. The effect of 39 essential oils (plants families Myrtaceae, Cupressaceae, Lamiaceae, Apiaceae and Asteraceae), 14 plant extracts (families Polygonaceae, Urticaceae and Alliaceae) and effect of selected essential oils combination with polymyxin B, ciprofloxacin and gentamicin were tested. The effect of 11 essential oils compounds was examined:  $\alpha$ -pinene, (R)-(+)-limonene, sabinene, 3-carene,  $\alpha$ -terpinene,  $\gamma$ -terpinene, terpinolene, (-)-terpinene-4-ol, thymol, carvacrol and eugenol.

**RESULTS:** Bacteriostatic activity (MIC < 4  $\mu$ L/mL) showed 69.2% of tested essential oils, and the most effective oils were *O. vulgare*, *E. camaldulensis*, *T. vulgaris*, *S. officinalis* and *M. communis*. Also, the antibacterial effect was confirmed for 42.9% extracts (the most effective are *Rumex sanguineus* and *Rumex crispus*) and 27.3% for oil components (the most active are carvacrol, thymol and eugenol). Combination of essential oils with antibiotics proved to be extremely effective, in sense of detected synergistic interactions in large number (polymyxin B in combination with *M. communis* or *E. camaldulensis* oils).

**CONCLUSION:** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains are susceptible to many investigated unconventional antimicrobial agents, individually and in combination with antibiotics, and therefore have great potential in the growth control of this species.

**KEY WORDS:** *Acinetobacter baumannii*, essential oils, plant extracts

**STAPHYLOCOCCAL SKIN AND SOFT TISSUE INFECTIONS.  
THERAPEUTICAL CHALLENGES**

Nășcuțiu Alexandra-Maria

Carol Davila University of Medicine and Pharmacy  
Cantacuzino National Medico-Military Institute for Research and Development,  
Bucharest

Staphylococci are an important cause of skin and soft tissue infections worldwide, and the recurrences of these infections may have significant morbidity. The rise of antibiotic resistance and the challenges of conventional antibacterial agent discovery and development have led to a very limited pipeline of therapies.

In this context it may be prudent to consider the potential of other approaches, conventional or even non-conventional. Reconsiderations of old approaches could boost research and offer solutions.

Studies are being performed evaluating the safety and efficiency of antibodies, phage lysins, or antimicrobial peptides in the treatment of staphylococcal infections. One approach is that of staphylococcal vaccines that can be tempted either in the classical way of “one size suits all” or as personalized therapy - the autogenous vaccines. Vaccines to prevent staphylococcal infections would have to protect against both antibiotic-resistant and antibiotic-susceptible strains. Two high-level positive effects from the perspective of resistance are targeted: prevention of infection determined by drug-resistant bacteria and reduction of the overall number of bacterial infections as well as of the need to use antibiotics, which is itself a driver of drug resistance. An alternative approach is to develop anti-virulence therapies that interfere with bacterial toxins or virulence factors and/or pathways that regulate toxins or virulence factors production. Traditional medicine (Ayurvedic, Chinese, Unanic, etc.), revisited and refined, remains a very rich source of active compounds, integrative phytotherapy being able to provide a personalized, holistic solution to staphylococcal recurrent infections.

Innovation and reconsideration of past strategies should fuse in order to provide the best needed.

**ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND CONSUMPTION IN THE REPUBLIC OF MACEDONIA IN  
COMPARISON WITH BALKAN REGION AND EUROPE: RESULTS OF CAESAR NETWORK**

Panovski Nikola <sup>1</sup>,

Kakaraskoska Boceska Biljana<sup>2</sup>, Cekovska Zaklin<sup>1</sup>, Kaftandzieva Ana<sup>1</sup>, Boshevaska Golubinka<sup>2</sup>,  
Hristova Kristina<sup>3</sup>, Milevska Kostova Neda<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Institute of Microbiology and Parasitology, Medical Faculty, University, "Ss Cyril and Methodius",  
Skopje, Republic of Macedonia

<sup>2</sup>Institute for Public Health, Skopje, Republic of Macedonia

<sup>3</sup> Health Insurance Fund, Republic of Macedonia

<sup>4</sup>Studiorum, Skopje, Republic of Macedonia

**AIM** To overview the antimicrobial resistance (AMR) in Europe with focus on the Balkan region, and especially R.Macedonia; its close relation with the consumption of antibacterials.

**METHODS** (source of data). Data on consumption of antimicrobial drugs was retrieved from ECDC (2014): Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012, and Health Insurance Fund of Macedonia - HIF, data of prescribed antimicrobials in R.Macedonia; Data on AMR: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), coordinated and funded by ECDC, produced annual reports on AMR since 2002. Such reports are also produced by the WHO and since 2013 functions the CAESAR (Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance) system for surveillance of antimicrobial resistance in non-EU European and Central Asian countries. EARS-Net performs surveillance of AMR in eight bacterial pathogens of public health importance: *E.coli*, *Kl.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *Acinetobacter*, *St.pneumoniae*, *S.aureus*, *E.faecalis* and *E.faecium*. Only data from invasive (blood and cerebrospinal fluid) isolates are included. The methodology of collecting, checking and processing of data in CAESAR system are in accordance with the EARS-Net.

**RESULTS** Consumption expressed as defined daily dose (DDD) varied by a factor of 2.8 between the highest (31.9 DDD per 1000 inhabitants per day in Greece) and the lowest (11.3 DDD per 1000 inhabitants per day in the Netherlands). The population-weighted EU/EEA mean consumption was 21.5 DDD per 1000 inhabitants. In Macedonia, the antimicrobial drugs prescribed in the past 5 years in primary care covered by Health Insurance Fund (HIF) in R.Macedonia, were between 17-20 DDD per 1000 inhabitants per day. There is no official data on consumption of antimicrobials in R.Macedonia prescribed, but not covered by HIF. CAESAR network results: in total, for a four-year period (2013-2016), 896 isolates were submitted in this network. There is high percentage of resistance to almost all isolates to the antibiotics/group of antibiotics: MRSA (37-48%); ESBL *E.coli* (59-73%); ESBL *Kl.pneumoniae* (82-100%); carbapenem resistant *Kl.pneumoniae* (0-17%); VRE *faecium* (50-65%); CRAB (71-84%).

**CONCLUSION** Percentages of resistance in invasive strains isolated in R.Macedonia are significantly higher than the average in the EU and similar to those in South Europe and the Balkan region countries.

**KEY WORDS** antimicrobial agents, resistance, invasive strains

## FIVE YEARS EXPERIENCE OF R. MACEDONIA IN THE CAESAR NETWORK

Cekovska Zaklina

Kakaraskoska Boceska Biljana<sup>2</sup>, Kaftandzieva Ana<sup>1</sup>, Boshevska Golubinka<sup>2</sup>, Ristovska Nadica<sup>1</sup>,  
Panovski Nikola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology and Parasitology, Medical Faculty of Skopje

<sup>2</sup>Institute of Public Health of R. Macedonia, Republic of Macedonia

**INTRODUCTION:** CAESAR (Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance) network is a national surveillance system for antibiotic resistance in the countries from the European Region of the World Health Organization (WHO) that are not part of EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network). The initiators and founders of this network are WHO, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) in the Netherlands and the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), in close collaboration with ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control).

**AIM OF THE STUDY** is to present our five-years experience in the CAESAR network and make an overview of the antimicrobial resistance during this period.

**METHODS:** CAESAR annual reports from 2013, 2014, 2015 and 2016 were used as an official data source. For 2017 we used already collected data but not published yet. The methodology of collecting, checking and processing of data is in accordance with the European Antimicrobial Resistance Surveillance network (EARS-Net). CAESAR-Net provides comparable and validated data on the prevalence and trends of antimicrobial resistance in a core group of invasive bacteria. Pathogens under surveillance are: *S. aureus* (MRSA), *S. pneumoniae* (Pen R), *E. coli* (ESBL, Carbapenemases producing - CP), *K. pneumoniae* (ESBL, CP), *E. faecium* and *E. faecalis* (VRE), *P. aeruginosa* (MDR) and *Acinetobacter spp.* (MDR) isolated only from the blood and cerebrospinal fluid (CSF) as samples

**RESULTS:** Republic of Macedonia is participating in this network since 2013. CAESAR laboratories in the Republic of Macedonia are submitting data sheets in paper form to the National data manager. After checking at national level they are sent for analysis at RIVM in the Netherlands. At the beginning (2013 and 2014) there were 6 laboratories providing data for CAESAR. In the last years laboratories succeed to provide good geographical coverage: 12, 11 and 14 active labs in 2015, 2016 and 2017, respectively. However, most isolates (about 70%) were processed at the Institute of Microbiology and Parasitology of the Medical Faculty in Skopje, which provides diagnostic support for the main tertiary care hospitals in the country. For a period of five years (2013-2017), a total of 1145 invasive isolates were sent from all participated laboratories. Out of the total number, *Staphylococcus aureus* were 277, *Enterococcus faecalis* -107, *Enterococcus faecium*-84, *Streptococcus pneumoniae* 34, *Escherichia coli* 301, *Klebsiella pneumoniae* 144, *Acinetobacter spp* 139 and *Pseudomonas aeruginosa* 59. Summarized for all 5 years, the total percentage of resistant bacteria was: *Staphylococcus aureus* (MRSA - 45,4%), *Streptococcus pneumoniae* (Pen R - 35,2%), *Enterococcus faecalis* (VRE - 1,7%), *Enterococcus faecium* (VRE - 59%), *E. coli* (ESBL producing - 67,8%), *Klebsiella pneumoniae* (ESBL producing - 87,6%), *Acinetobacter spp* (Carbapenem resistant (CR) - 76,9%) and *Pseudomonas aeruginosa* (CR - 34%). Carbapenemases producing (CP) strains of *Klebsiella pneumoniae* from invasive isolates appeared for the first time in our country in 2016 (13% of isolated strains) and in 2017 that percentage increased to 18%. During all these years, according the annual reports Republic of Macedonia is B level of evidence, due to the fact of the very small number of received data and very small number of proceeded samples at all. The participation of our laboratories in external control (EQA) of the strains send by UK-NEQAS is very successful. Thus, in 2016 (annual report 2017), out of 21, 19 laboratories from our country within one month, responded positively to the test for identification of 6 control strains and succeeded to determine the exact antimicrobial susceptibility.

**CONCLUSION:** The Republic of Macedonia has been successfully engaged in the antimicrobial monitoring of invasive isolates within the CAESAR network. The percentage of resistant strains seems to be high, because of the very small number of processed samples. In the next years, raising the number of samples will be the main goal of the working team involved in this network.

**KEY WORDS:** antimicrobial resistance, invasive strains, antimicrobial surveillance



**PROFIL OSETLJIVOSTI IZOLATA IZ HEMOKULTURA U KLINIČKOM CENTRU SRBIJE  
BACTERIOLOGICAL PROFILE AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PATTERNS OF BLOOD  
CULTURE ISOLATES IN CLINICAL CENTER OF SERBIA**

Jovanović Snežana  
[drsnezana.jovanovic@gmail.com](mailto:drsnezana.jovanovic@gmail.com)

Klinički centar Srbije, Služba za mikrobiologiju, Beograd, Srbija

**UVOD:** Bakterijske infekcije krvi su glavni javno zdravstveni problem, što dovodi do visokog morbiditeta i mortaliteta. Pravovremena dijagnoza i odgovarajući lekovi su najbolji način za spašavanje života pacijenata. Cilj ove studije je bio određivanje profila osetljivosti bakterijskih izolata iz hemokultura na antibiotike.

**METODOLOGIJA:** Retrospektivna analiza mikrobioloških rezultata

**REZULTATI:** Lekari i klinički mikrobiolozi smatraju da su hemokulture možda najvažniji laboratorijski testovi za dijagnozu ozbiljnih infekcija. Poslednjih godina postalo je jasno da je njihova kontaminacija česta (lažno pozitivni rezultati). Kontaminirane hemokulture u nekim centrima čine čak polovinu ili više od svih pozitivnih hemokultura, vrlo su skupe za zdravstveni sistem, zbunjuju kliničare.

**ZAKLJUČAK:** Prevalencija bakterijskih izolata iz krvi bila je visoka. Izolovane vrste bakterija su bile rezistentne na većinu testiranih antibiotika, što naglašava potrebu nadzora etioloških agensa i njihove antibiotske osetljivosti radi sprečavanja daljeg pojavljivanja i širenja rezistentnih bakterijskih patogena.

**KLJUČNE REČI:** hemokulture, bakterijski izolati, rezistencija bakterija

**BACTERIOLOGICAL PROFILE AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PATTERNS OF BLOOD  
CULTURE ISOLATES IN CLINICAL CENTER OF SERBIA**

**Jovanović Snežana**

**Clinical Center of Serbia, Belgrade, Department of microbiology**

**INTRODUCTION:** Bacterial bloodstream infections are a major public health problem, which leads to high morbidity and mortality of patients. On time diagnosis and appropriate medication will be the best way to save the lives of affected ones. The aim of the present study was to determine the bacterial profile of bloodstream infections and their antibiotic susceptibility pattern.

**METHODOLOGY:** Retrospective analysis of microbiological results.

**RESULTS:** Physicians and clinical microbiologists have long appreciated that blood cultures are perhaps the most important laboratory tests to diagnose serious infections. In recent years, it has also become apparent that contaminated blood cultures are common, leading to falsely positive test results. Contaminated blood cultures constitute as many as half or more of all positive blood cultures in some centers, are very costly to patients and the health care system, and are confusing for clinicians.

**CONCLUSION:** Prevalence of bacterial isolates in blood was high. It also reveals isolated bacteria species developed multi drug resistance to most of the antibiotics tested, which highlights for periodic surveillance of etiologic agent, antibiotic susceptibility to prevent further emergence and spread of resistant bacterial pathogens.

**KEY WORDS:** Blood culture, bacterial isolates, antimicrobial susceptibility pattern



**REZISTENCIJA PNEUMOKOKA NA MAKROLIDNE ANTIBIOTIKE U SRBIJI**  
**MACROLIDE RESISTANCE IN PNEUMOCOCCI IN SERBIA**

Hadnađev Mirjana

Institut za plućne bolesti Vojvodine, Sremska Kamenica, Srbija

*Streptococcus pneumoniae* je najčešći bakterijski uzročnik infekcija respiratornog trakta (RT), ali i teških invazivnih bolesti. U lečenju pneumokoknih infekcija RT se intenzivno koriste makrolidi. Njihova prekomerna upotreba je dovela do porasta rezistencije pneumokoka na makrolide. Opisana su dva ključna mehanizma rezistencije: modifikacija ciljnog mesta delovanja leka putem metilacije 23S rRNK i aktivni efluks. Prvi mehanizam je posredovan *ermB* genom i karakteriše se visokim nivoom rezistencije na makrolide i ukrštenom rezistencijom na makrolide, linkozamide i streptogramine B. Označava se kao MLS<sub>b</sub> fenotip. Ekspirimira se kao konstitutivni i inducibilni. Drugi mehanizam rezistencije kodira *mefA* gen i kod njega dolazi do efluksa makrolida, te se javlja nizak nivo rezistencije samo na 14-člane i 15-člane makrolide. Ispoljava se kao M-fenotip. Učestalost rezistencije pneumokoka na makrolide varira između zemalja i najviša je u zemljama Dalekog istoka, gde dostiže i preko 90%. U evropskim zemljama se rezistencija invazivnih sojeva pneumokoka na makrolide kreće od 0% na Islandu do 60% na Kipru. Poslednjih godina je u razvijenim zemljama sveta došlo do smanjenja rezistencije, kao posledica redukovanja upotrebe antibiotika, ali i uvođenja pneumokone konjugovane vakcine. U periodu od 2010-2012. godine rezistencija pneumokoka na makrolidne antibiotika u Srbiji je iznosila 34%. Dominantan fenotip rezistencije na makrolide je bio MLS<sub>b</sub> (78,5%). Potvrđena je udruženost *mefA* gena i M fenotipa, kao i *ermB* gena i MLS<sub>b</sub> fenotipa. Prema podacima projekta CAESAR rezistencija invazivnih izolata pneumokoka na makrolide je u Srbiji iznosila 29% u 2013, 31% u 2014, 53% u 2015. i 31% u 2016. godini. Od 2018. godine je u Srbiji uvedena pneumokokna konjugovana vakcina u kalendar obavezne imunizacije dece, te se može očekivati da će doći do smanjenja rezistencije na antibiotike. Da bi se procenila efikasnost vakcine, neophodno je i dalje pratiti rezistenciju pneumokoka na ove antibiotike.

## MACROLIDE RESISTANCE IN PNEUMOCOCCI IN SERBIA

Hadnađev Mirjana

Institute for Pulmonary Diseases of Vojvodina, Sremska Kamenica, Serbia

*Streptococcus pneumoniae* is a leading cause of bacterial respiratory tract infections (RTIs), as well as severe invasive diseases. Macrolides are widely used for treatment of pneumococcal RTIs. The widespread use of macrolides is associated with increased macrolide resistance in pneumococci. Macrolide resistance is mediated by two major mechanisms: target site modification and active drug efflux. First mechanism is encoded by the *ermB* gene, confers a high-level resistance and leads to cross-resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins B. It is expressed as the MLS<sub>b</sub> phenotype. Expression of MLS<sub>b</sub> resistance can be either constitutive or inducible. Another mechanism is the active drug efflux, encoded by the *mefA* gene. Drug efflux confers low-level resistance to 14- and 15-membered macrolides only. It is expressed as the M phenotype. Pneumococcal macrolide resistance varies between different regions and the highest rates of resistance have been reported in East Asia, with rates of >90%. Macrolide resistance of invasive pneumococci in European countries varies from 0% in Iceland to 60% in Cyprus. As a result of reduced use of antibiotics and introduction of pneumococcal conjugate vaccine (PCV) over the last several years a decline in macrolide resistance has been observed. During the period from 2010-2012. pneumococcal macrolide resistance in Serbia was 34%. The MLS<sub>b</sub> (78.5%) was the predominant macrolide resistance phenotype. All the strains assigned to the MLS<sub>b</sub> phenotype harbored *ermB* gene, while all the strains with M phenotype had the *mefA* gene. According to data available from CAESAR project macrolide resistance of invasive pneumococci in Serbia was 29% in 2013, 31% in 2014, 53% in 2015. and 31% in 2016. Serbia introduced PCV in national immunisation program in 2018. and a decline in antibiotic resistance could be expected. The impact of the PCV on resistance should be evaluated by continuous monitoring of antibiotic susceptibility patterns.

**SESIJA: ANTIMIKROBNA TERAPIJA**

**I REZISTENCIJA**

**SESSION: ANTIMICROBIAL**

**THERAPY AND RESISTANCE**

**USMENE PREZENTACIJE/ ORAL**

**PRESENTATION**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
s međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO

**KRETANJE REZISTENCIJE NA ANTITUBERKULOZNE LEKOVE PRVE LINIJE ZA GRAD  
BEOGRAD  
TRENDS OF RESISTANCE TO THE FIRST-LINE ANTITUBERCULOUS DRUGS – CITY OF  
BELGRADE**

Vitković Aleksandar

Antić – Glavaški Andrijana

Gradski zavod za plućne bolesti i tuberkulozu

**UVOD:** Pravilan izbor antituberkuloznih lekova (ATL) u lečenju tuberkuloze od izuzetne je važnosti. Dug vremenski period neophodan za očitavanje testa rezistencije uslovljava dobro poznavanje učestalosti i kretanja rezistencije na ATL pre započinjanja terapije.

**CILJ:** Utvrditi učestalost i kretanje rezistencije izolovanih sojeva *M. tuberculosis* na ATL prve linije.

**MATERIJAL I METODE:** Korišćen je materijal laboratorije Gradskog zavoda za plućne bolesti i tuberkulozu, Beograd. Primenjena je retrospektivna metoda. Obuhvaćen je period od 1998. do 2017. godine. Praćena je rezistencija na streptomycin (S), izoniazid (H), etambutol (E) i rifampicin (R).

**REZULTATI:** U posmatranom periodu, *M. tuberculosis* izolovan je kod 4389 lica od čega je bilo 2823(64.4%) muškaraca i 1566(35.6%) žena. Kod ukupno 393(8.95%) lica registrovali smo pojavu rezistencije na jedan ili više antituberkulotika. Monorezistencija registrovana je kod 251(5.7%) lica, pri čemu je najčešće bila na streptomycin – 160 (64%). Polirezistencija registrovana je kod 57(1.3%) lica, a najčešća kombinacija bila je SH – 23 (40%). Multi rezistenti sojevi (MDR) registrovani su kod 85(1.93%) lica, češće kod muškaraca – 75(82%) u odnosu na žene – 10(18%) . U okviru MDR najčešće je registrovana rezistencija na sva četiri antituberkulotika – 59 (69.4%).

**ZAKLJUČAK:** Učestalost rezistencija izolovanih sojeva *M. tuberculosis* na AT lekove prve linije kod pacijenata na teritoriji grada Beograda je niska – 8.95%, kao i MDR -1.93%. Češća je kod muškaraca nego kod žena.

**TRENDS OF RESISTANCE TO THE FIRST-LINE ANTITUBERCULOUS DRUGS – CITY OF  
BELGRADE**

Vitković Aleksandar

Antić – Glavaški Andrijana

Municipal Institute for Lung Disease and tuberculosis, Belgrade

**INTRODUCTION:** Accurate choice of antituberculosis drugs (ATD) in the tuberculosis treatment is of the utmost significance. Thorough knowledge of frequency and trends of ATD resistance prior to introduction of therapy are required due to long time duration necessary for read-out of resistance test.

**AIM:** To determine frequency and trends of resistance of *M. tuberculosis* isolated strains to the first-line ATD.

**MATERIAL AND METHODS:** Material from the laboratory of the Municipal institute for lung disease and tuberculosis, Belgrade is used for the study. Retrospective method is applied. The period from 1998 to 2017 is observed. The resistance to Streptomycin (S), Isoniazid (H), Ethambutol (E), and Rifampicin (R) is studied.

**RESULTS:** In the observed period, *M. tuberculosis* was isolated in 4389 subjects, of whom 2823 (64.3%) were men and 1566 (35.7%) women. In total of 393 (8.95%) subjects, resistance occurrence to one or more antituberculous drugs was registered. Mono-resistance was registered in 251 (5.7%) subjects, most often noted to Streptomycin – 160 (64%). Poly-resistant strains were found in 57 (1.3%) subjects, with most common combination of SH – 23 (40%). Multi-resistant strains (MDR) were registered in 85 (1.93%) subjects, more often in men – 75 (82%) compared to women – 10 (18%). In MDR, the most common resistance to all four antituberculous drugs is noted – 59 (69.4%).

**CONCLUSION:** Frequency of *M. tuberculosis* isolated strains resistant to first-line AT drugs in patients at the territory of the city of Belgrade is low – 8.95%, as well as MDR – 1.93%. It is more often observed in men than in women.

**GENETIČKA OSNOVA REZISTENCIJE MULTIREZISTENTNIH SOJEVA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IZOLOVANIH U SRBIJI**  
**GENETIC BASIS OF RESISTANCE IN MULTIDRUG-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS ISOLATED IN SERBIA**

Arandelović Irena  
[irence@gmail.com](mailto:irence@gmail.com)

Vuković Dragana, Dakić Ivana, Savić Branislava

Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Širenje multirezistentnih (MDR) sojeva *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), odnosno MTB sojeva rezistentnih najmanje na rifampicin i isoniazid, predstavlja značajnu pretnju programima kontrole tuberkuloze (TB) na globalnom nivou. Iako se Srbija sa stopom incidencije manjom od 1/100.000 svrstava u države sa niskim opterećenjem MDR-TB, molekularno epidemiološke studije i analiza demografskih i epidemioloških podataka ukazuju na visoku stopu aktivne transmisije MDR-TB u Srbiji.

Cilj ove studije je detekcija i procena učestalosti mutacija u okviru gena rezistencije na antituberkulotike (ATL) prve i druge linije, prepoznavanje molekularnih markera rezistencije i procena sposobnosti transmisije MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji.

Studija obuhvata sve MDR sojeve MTB izolovane u Srbiji u periodu 01.01.2008.-31.05.2014. godina (103 soja). Za detekciju mutacija rezistencije na ATL korišćena je tehnika sekvenciranja genoma putem sinteze i reverzibilnih terminatora. Klasteri MDR MTB sojeva su definisani kao grupe sojeva čiji su se genomi razlikovali u  $\leq 12$  polimorfizama pojedinačnih nukleotida.

U 33 gena povezana sa rezistencijom na ATL detektovano je ukupno 170 mutacija, a najviše učestalosti ustanovljene su za mutacije S450L *rpoB*, S315T *katG*, Q497R *embB*, K43R *rpsL*, V7G *pncA* i A576T *embA*. Ukupno 12 detektovanih mutacija rezistencije udruženo je sa pripadnošću sojeva klasterima. U genomima 82% MDR sojeva svrstanih u klastere dokazane su kompenzatorne mutacije *rpoA* i *rpoC* gena.

Molekularni markeri rezistencije dokazani u genomima MDR MTB sojeva u Srbiji odgovaraju tipičnim markerima rezistencije prepoznatim na globalnom nivou. Jedini izuzetak su mutacije u okviru *gyrA* gena, za koje je pokazano da se ne mogu smatrati pouzdanim markerima rezistencije na fluorohinolone kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji, što ograničava primenljivost komercijalno dostupnih molekularnih eseja za brzo otkrivanje ekstenzivno rezistentnih sojeva u našoj zemlji. Čak 12 mutacija rezistencije u genomima MDR sojeva MTB ne umanjuje sposobnost njihove transmisije, a prisustvo kompenzatornih mutacija u genomima većine sojeva grupisanih u klasterima predstavlja dodatnu potvrdu velike sposobnosti transmisije MDR sojeva MTB prisutnih u našoj zemlji.

**KLJUČNE REČI:** *Mycobacterium tuberculosis*, multirezistentna tuberkuloza, mutacije rezistencije

**GENETIC BASIS OF RESISTANCE IN MULTIDRUG-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS ISOLATED IN SERBIA**

Arandelović Irena

[irence@gmail.com](mailto:irence@gmail.com)

Vuković Dragana, Dakić Ivana, Savić Branislava

Institute for microbiology and immunology, Medical Faculty, University of Belgrade, Serbia

The spread of multidrug-resistant (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) strains, i.e. MTB strains resistant to at least rifampin and isoniazid, presents a major threat for global tuberculosis (TB) control programmes. Although Serbia is a low incidence MDR TB country, with rate of <1/100.000, molecular epidemiological studies as well as demographic and epidemiological data indicate a high rate of active transmission of MDR-TB in the country.

The aims of our study were detection of mutations and their frequencies in genes conferring resistance to the first- and second-line anti-TB drugs, identification of molecular resistance markers, and assessment of transmissibility of MDR MTB strains isolated in Serbia.

The study included all MDR MTB strains isolated in Serbia from January 1<sup>st</sup> 2008 to May 31<sup>st</sup> 2014 (103 strains). Resistance mutations were detected by whole genome sequencing using synthesis and reversible terminators. Molecular strain clusters were defined by using a proposed maximum genetic distance of 12 single-nucleotide polymorphisms between at least two isolates.

In total, 170 mutations were detected in 33 genes associated with resistance to the anti-TB drugs. The most frequent resistance mutations were S450L *rpoB*, S315T *katG*, Q497R *embB*, K43R *rpsL*, V7G *pncA*, and A576T *embA*. As much as 12 resistance mutations were significantly associated with clustering of the strains, while compensatory mutations in *rpoA* and *rpoC* genes were detected in genomes of 82% clustered MDR isolates.

The molecular markers of resistance identified in MDR MTB strains isolated in Serbia correspond to those recognized as resistance markers at global level, with exception of *gyrA* mutations. The study revealed that these mutations are not reliable markers of resistance to fluoroquinolones in MDR MTB strains isolated in Serbia, which restricts application of commercially available tests for rapid detection of extensively drug-resistant TB in our country. A total of 12 resistance mutations did not interfere with transmissibility of MDR MTB isolates. Detection of compensatory mutations in majority of clustered MDR MTB strains further confirmed high transmission capacity of MDR MTB strains circulating in Serbia.

**KEY WORDS:** *Mycobacterium tuberculosis*, multidrug-resistant tuberculosis, resistance mutations

**SKRINING REKTALNE FLORE NA FLUOROHINOLONSKU REZISTENCIJU PRE  
TRANSREKTALNE BIOPSIJE PROSTATE  
SKRINING OF RECTAL FLORA ON FLUOROQUINOLONE RESISTANCE BEFORE  
TRANSECTRAL PROSTATE BIOPSY**

Kovačević-Jovanović Vesna

Aleksić Đorđe

Opšta bolnica „Medigroup“, Beograd

**UVOD:** Nakon transrektalne biopsije prostate kao najčešće korišćene metode za dijagnostiku karcinoma prostate, mogu se razviti infektivne komplikacije kao infekcije urinarnog trakta, prostatitis, epididimo-orhitis i sepsa. Najčešći izvor patogena u ovim slučajevima su kotaminacija/inokulacija mikroorganizama iz rektuma. U preventivne svrhe se koriste različiti profilaktički protokoli, koje najčešće čini primena antibiotika iz grupe fluorohinolona. Tokom prethodne decenije došlo je do povećanja infektivnih komplikacija u velikoj meri zbog otpornosti na fluoro-hinolone u urološkoj populaciji pacijenata. Naime, smatra se da bakterije otporne na fluorokinolone u rektalnom svodu mogu biti u neto u prostatu i krvotok putem biopsijske igle koja prolazi kroz kontaminirani rektalni zid. Skrining rektalne flore na hinolonsku rezistenciju pre biopsije prostate omogućava primenu ciljanog režima antibiotika.

Da bi se ispitala prevalenca rezistentnih bakterija u određenoj populaciji, rađene su mnogobrojne studije koje su se susrele sa problemom brojnosti i raznovrsnosti crevne flore. Iz tog razloga krenulo se sa korišćenjem selektivnih medija, kao što je MacConkey bujon/agar koji sadrže ciprofloksacin. Sve bakterije koje raste na MacConkey-u sa ciprofloksacinom pretpostavljeno je da su otporne na fluorohinolone i dalje su bile podvrgnute testiranju osetljivosti. Na ovaj način je pokazano da prevalencija bakterija otpornih na fluorokinolone u rektumu u vreme biopsije prostate ide i do 22%.

Ukratko, otpornost na fluorokinolone postaje suštinski problem koji uzrokuje značajne infekcije kod muškaraca koji prolaze kroz relativno rutinsku proceduru. Skrining rektalne flore na hinolonsku rezistenciju pre biopsije prostate omogućava primenu ciljanog režima antibiotika i na taj način se obezbeđuje individualizovani pristup izboru antibiotske profilakse.

**CILJ:** U cilju procene preovlađujuće stope rezistentnih sojeva u rektalnoj flori, kao i efikasnost ciljane antibiotske terapije za sprečavanje komplikacija nakon navedene procedure, u Opštoj bolnici Medigroup smo od decembra 2017. godine pokrenuli projekat prikupljanja i obrade rektalnih briseva uroloških pacijenata.

**METOD:** Dve nedelje pre biopsije prostate, dobijeni rektalni brisevi su inokulisani direktno na Chromagar i MacConkey agar koji sadrži 10 mg/mL ciprofloksacina i inkubirani aerobno na 33°C 24 sata. Svi izolati su dalje okarakterisani (identifikacija i ispitivanje antibiotske osetljivosti). Nakon toga rezultati antimikrobne osetljivosti korišćeni su za izradu prilagođenog režima antibiotske profilakse. Prikupljene su kliničke informacije o infektivnim komplikacijama u roku od 30 dana od biopsije.

U pokušaju da se identifikuje optimalan pristup selekciji, izvedene su studije kako bi se utvrdilo da li je 10 mg / ml ciprofloksacina optimalna koncentracija antibiotika za korišćenje.

**REZULTATI:** Prosečna starost ispitivanih pacijenata je bila 69,7 godina (52-88 godina). Rezultati su pokazali prisustvo fluoro-hinolon-rezistentne *E. coli* u 10 % ispitanika. Šema osetljivosti na antibiotike za rektalnu izolate rezistentne na fluorohinolone, pokazala je visok nivo rezistencije na ampicilin i trimetoprim-sulfametoksazol, dok je rezistencija na amikacin i imipenem ostala veoma niska. U ovom periodu nisu identifikovane zarazne komplikacije.

**ZAKLJUČAK:** Rektalne kulture dobijene prije biopsije, koristeći selektivne medije za identifikaciju Enterobacteriaceae otpornih na fluorohinolone, olakšavaju ciljanu antibiotsku profilaksu i izgledaju da su visoko efikasne u smanjenju zaraznih komplikacija. Naša studija se u ovom trenutku odnosi na mali broj pacijenata, ali pokazuje da je lokalna incidenca otpornosti na fluorokinolone visoka. Korišćenje selektivnih medija za izolaciju ovih bakterija omogućava



efikasan ciljani program antibiotika. Potrebne su dalja istraživanja kako bi se razmotrile razlozi za neuspeh ciljane profilakse.

**KLJUČNE REČI:** rektalna flora, biopsija prostate, rezistencija

Reference:

Loeb S, Carter HB, Berndt SI, Ricker W, Schaeffer EM. Complications after prostate biopsy: data from SEER-Medicare. *The Journal of urology* 2011, 186(5):1830-1834.

Young JL, Liss MA, Szabo RJ. Sepsis due to fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* after transrectal ultrasound-guided prostate needle biopsy. *Urology* 2009, 74(2):332-338.

Liss MA, Chang A, Santos R, et al. Prevalence and significance of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in patients undergoing transrectal ultrasound-guided prostate needle biopsy. *The Journal of urology*. 2011, 185(4):1283-1288.

Taylor AK, Zembower TR, Nadler RB, et al. Targeted Antimicrobial Prophylaxis Using Rectal Swab Cultures in Men Undergoing Transrectal Ultrasound Guided Prostate Biopsy is Associated With Reduced Incidence of Postoperative Infectious Complications and Cost of Care. *The Journal of urology* 2012;187(4):1275-1279.

Liss MA, Peebles AN, and Peterson EM. Detection of Fluoroquinolone-Resistant Organisms from Rectal Swabs by Use of Selective Media Prior to a Transrectal Prostate Biopsy. *Clinical Microbiology* 2011, 49 (3): 1116–1118.

Farrell JJ, Hicks JL, Wallace SE, and Seftel AD. Impact of preoperative screening for rectal colonization with fluoroquinolone-resistant enteric bacteria on the incidence of sepsis following transrectal ultrasound-guided prostate biopsy. *Res Rep Urol*. 2017, 24 (9):37-41.

Liss MA, Johnson JR, Porter SB et al. Clinical and Microbiological Determinants of Infection After Transrectal Prostate Biopsy *Clinical Infectious Diseases*, 2015, 60 (7):979-87.

**SKRINING OF RECTAL FLORA ON FLUOROQUINOLONE RESISTANCE BEFORE  
TRANSECTRAL PROSTATE BIOPSY**

Kovačević-Jovanović Vesna

Aleksić Đorđe

General Hospital "Medigroup", Belgrade

**INTRODUCTION:** Following a transrectal prostate biopsy as the most commonly used method for the diagnosis of prostatic carcinoma, infectious complications such as urinary tract infections, prostatitis, epididymy-orchitis and sepsis can be developed. The source of pathogens in these cases are contamination/inoculation of microorganisms from the rectum. The most important preventive approach is the application of various prophylactic protocols, most frequently fluoroquinolones. Over the past decade there were several reports of an increase in infective complications due to fluoroquinolone resistance in the urologic population. Namely, these bacteria can be introduced into the prostate and bloodstream by the biopsy needle traversing the contaminated rectal wall. Screening of rectal flora to fluoroquinolone resistant strains prior to biopsy allows a targeted antibiotic regime.

For this reason, the use of selective media, such as the MacConkey broth/agar containing ciprofloxacin has been initiated. All bacteria growing on MacConkey with cipro agar was presumed to be resistant to ciprofloxacin and then would undergo susceptibility testing. Using this screening method, it was shown that the prevalence of fluoroquinolone resistant bacteria in the rectum at the time of prostate biopsy was up to 22%,

In short, resistance to fluoroquinolone becomes a major problem that causes significant infections in men who undergo a relatively routine procedure. Screening of the rectal flora to quinolone resistance before prostate biopsy allows the application of the target antibiotic regimen and that provides an individualized approach to antibiotic prophylaxis.

**OBJECTIVE:** In our clinic, from December 2017, we started to collect rectal swabs from patients before transrectal prostate biopsy, in order to evaluate the prevailing rate of resistant strains in the rectal flora and the effectiveness of targeted antibiotic therapy.

**Methods:** Two weeks before prostate biopsy the rectal swabs were inoculated directly to Chromagar and MacConkey agar containing 10 mg/ml of ciprofloxacin and incubated aerobic at 33C for 24 hours. All isolates are further characterized (identification and testing of antibiotic sensitivity). Subsequently, the antimicrobial sensitivity results were used to produce a customized antibiotic prophylaxis regimen that was applied before the biopsy. Data of infectious complications within 30 days of biopsy has been collected.

*In attempt* to identify the optimal approach of selection, studies have been carried out to determine if 10 mg / ml of ciprofloxacin is the optimal antibiotic concentration for use.

**Results:** The average age of patients examined was 69.7 years (52-88 years). The results showed the presence of fluoroquinolone-resistant *E. coli* in 10% of subjects. The antibiotic susceptibility test for rectal fluoroquinolone-resistant isolates showed a high level of resistance to ampicillin and trimethoprim sulfamethoxazole, while resistance to amikacin and imipenem remained very low. In this period, no complications were established.

**CONCLUSION:** Rectal cultures obtained before the prostate biopsy, using selective media for the resistance of Enterobacteriaceae to fluoroquinolone, facilitate targeted antibiotic prophylaxis and appear to be highly effective in reducing infectious complications. Our study currently refers to a small number of patients, but it shows that the local incidence of fluoroquinolone resistance is high. The use of selective isolation media for these bacteria provides an effective target antibiotic program. Further research is needed to consider the reasons for the failure of targeted prophylaxis.

**KEY WORDS:** rectal flora; prostate biopsy; resistance

**REFERENCES:**

Loeb S, Carter HB, Berndt SI, Ricker W, Schaeffer EM. Complications after prostate biopsy: data from SEER-Medicare. *The Journal of urology* 2011, 186(5):1830-1834.

Young JL, Liss MA, Szabo RJ. Sepsis due to fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* after transrectal ultrasound-guided prostate needle biopsy. *Urology* 2009, 74(2):332-338.

Liss MA, Chang A, Santos R, et al. Prevalence and significance of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in patients undergoing transrectal ultrasound-guided prostate needle biopsy. *The Journal of urology*. 2011, 185(4):1283-1288.

Taylor AK, Zembower TR, Nadler RB, et al. Targeted Antimicrobial Prophylaxis Using Rectal Swab Cultures in Men Undergoing Transrectal Ultrasound Guided Prostate Biopsy is Associated With Reduced Incidence of Postoperative Infectious Complications and Cost of Care. *The Journal of urology* 2012;187(4):1275-1279.

Liss MA, Peebles AN, and Peterson EM. Detection of Fluoroquinolone-Resistant Organisms from Rectal Swabs by Use of Selective Media Prior to a Transrectal Prostate Biopsy. *Clinical Microbiology* 2011, 49 (3): 1116–1118.

Farell JJ, Hicks JL, Wallace SE, and Seftel AD. Impact of preoperative screening for rectal colonization with fluoroquinolone-resistant enteric bacteria on the incidence of sepsis following transrectal ultrasound-guided prostate biopsy. *Res Rep Urol* 2017, 24 (9):37-41.

Liss MA, Johnson JR, Porter SB et al. Clinical and Microbiological Determinants of Infection After Transrectal Prostate Biopsy. *Clinical Infectious Diseases*, 2015, 60 (7): 979-87.

**ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI LOKALNIH IZOLATA *BORRELIA AFZELII* NA HUMANI SERUM, *IN VITRO***

***IN VITRO* SENSITIVITY OF LOCAL ISOLATES OF *BORRELIA AFZELII* TO HUMAN SERUM**

Veinović Gorana

[gorana.veinovic@imi.bg.ac.rs](mailto:gorana.veinovic@imi.bg.ac.rs)

Ćakić Sanja, Sukara Ratko, Mihaljica Darko, Tomanović Snežana

Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja, Centar izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima, Grupa za medicinsku entomologiju, Beograd Republika Srbija

**UVOD:** Lajmska borelijoza je najčešća krpeljima prenosiva bolest u Evroaziji i Severnoj Americi, a prouzrokuje je spiralna bakterija iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato. U Evropi, *B. afzelii* je najčešće detektovana vrsta borelija u krpeljima vrste *Ixodes ricinus*, a takođe i najčešće izolovana vrsta iz humanog materijala.

**CILJ:** Cilj ove studije je bio da se ispita osetljivost 14 različitih sojeva *B. afzelii*, izolovanih iz krpelja *I. ricinus* sa teritorije Republike Srbije, na humani serum, *in vitro*.

**METOD :** Za ispitivanje osetljivosti borelija na humani serum, primenjen je "direct killing" test. Sojevi su kultivisani u *Barbour-Stoennes-Kelly-H* podlozi do postizanja koncentracije  $1-2 \times 10^7$  /mL, a potom su napravljene serije razblaženja 1:10, 1:50 i 1:90. Za dobijanje humanog seruma, pulirani su serumi 4 zdrave odrasle osobe a za dobijanje toplotom inaktivisanog seruma (TIS), humani serum je inkubiran 45 minuta na 56°C. U bazene mikrotitracionih ploča dodate su: kultura ispitivanog soja *B. afzelii*, i jednake količine kulture i humanog seruma ili TIS; ploče su zatim inkubirane 1, 3, i 5 sati na 33 °C pod anaerobnim uslovima. Nakon inkubacija, kulture su pregledane mikroskopiranjem u tamnom polju.

**REZULTAT:** Kako bi se ispitala osetljivost 14 različitih sojeva *B. afzelii* na humani serum, procenjena je njihova pokretljivost i morfologija nakon 1, 3, i 5 sati inkubacije po dodavanju 50% humanog seruma. TIS u kojem je komplement inaktivisan, kao i kultura ispitivanog soja, dodati su kao kontrola. Nije postojala razlika u pokretljivosti i morfologiji pojedinačnih sojeva borelija nakon dodavanja humanog seruma u poredjenju sa TIS i kulturom, ukazujući na to da su svi testirani sojevi *B. afzelii* bili rezistentni na humani serum.

**ZAKLJUČAK:** Prvi put u Republici Srbiji, ispitana je *in vitro* osetljivost izolata *B. afzelii* na humani serum. Rezultati ukazuju da su svi testirani lokalni sojevi rezistentni na humani serum čime smo potvrdili njihov patogeni potencijal.

**KLJUČNE REČI:** *Borrelia afzelii*, humani serum, osetljivost

**IN VITRO SENSITIVITY OF LOCAL ISOLATES OF *BORRELIA AFZELII* TO HUMAN SERUM**

Veinović Gorana

[gorana.veinovic@imi.bg.ac.rs](mailto:gorana.veinovic@imi.bg.ac.rs)

Ćakić Sanja, Sukara Ratko, Mihaljica Darko, Tomanović Snežana

Center for zoonoses transmitted by food and vectors, University of Belgrade, Institut for Medical Research, Laboratory for Medical entimology, Belgrade, Serbia

**INTRODUCTION:** Lyme borreliosis, caused by the spiral-shaped bacterium of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, is the most common tick-borne disease in Eurasia and North America. In Europe, *B. afzelii* is the most common species found in *Ixodes ricinus* ticks and most frequently isolated from human material.

**AIM;**The aim of the present study was to determine sensitivity of 14 different *B. afzelii* strains isolated from *I. ricinus* ticks from the Republic of Serbia to human serum, *in vitro*.

**METHOD:** The direct killing assay was used to investigate sensitivity of *Borrelia*, *in vitro*. All strains were cultured in *Barbour-Stoenner-Kelly-H* media until they reached  $1-2 \times 10^7$  cells/mL and subsequently passaged at 1:10, 1:50, and 1: 90 dilutions. Serum samples from 4 healthy individuals were pooled for human serum while heat-inactivated serum (HIS) was generated by incubating human serum at 56°C for 45 minutes. The equal amounts of culture of tested *B. afzelii* strains and human serum or HIS were mixed in microtiter plates and incubated at 33°C for 1, 3, and 5 h under anaerobic conditions. After incubation, all cultures were examined by *dark-field microscopy*.

**RESULT:** In order to evaluate sensitivity, motility and morphology of 14 different *B. afzelii* strains were assessed after 1, 3 and 5 h after addition of 50% human serum. HIS (in which complement was inactivated) and culture were added as a control. There was no difference in motility and morphology of individual *Borrelia* strains, after addition of human serum as compared to HIS and culture, indicating that all *B. afzelii* strains were resistant to human serum.

**CONCLUSION:** This study is the first report in the Republic of Serbia on *in vitro* sensitivity of *B. afzelii* isolates to human serum. The results indicate that our local *B. afzelii* strains are serum-resistant and pathogen to humans.

**KEY WORDS:** *Borrelia afzelii*, human serum, sensitivity

**SESIJA: INTRAHOSPITALNE**

**INFEKCIJE**

**SESSION: INTRAHOSPITAL**

**INFECTIONS**

**PREDAVANJA PO POZIVU/INVITED**

**LECTURES**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
sa međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO

## NADZOR NAD MULTIPLOREZISTENTNIM BAKTERIJAMA U BOLNIČKOJ SREDINI

Tambić Andrašević Arjana

[arjana.tambic@bfm.hr](mailto:arjana.tambic@bfm.hr)

Klinika za infektivne bolesti, Zagreb, Hrvatska

Rezistencija na antibiotike je postao vodeći svjetski problem, još uvijek nedovoljno prepoznat u javnosti ali često i u stručnim krugovima. Rezistencija se prvenstveno razvija među bakterijama koje čine normalnu humanu mikrobiotu i uzrokuju infekciju samo kad dospiju u primarno sterilne prostore te je to razlog zašto se rezistencija najvećim dijelom neprimjetno širi i do izražaja najviše dolazi u bolničkoj sredini, prvenstveno u jedinicama intenzivnog liječenja. Velika i često neopravdana uporaba antibiotika je glavni pokretač nastanka multiplorezistentnih sojeva no propusti u kontroli bolničkih infekcija omogućuju širenje jednom nastalih rezistentnih klonova. Osnova kontrole bolničkih infekcija su standardne mjere predostrožnosti koje se odnose na sve pacijente bez obzira na dijagnozu. Danas nije upitno da je higijena ruku osnova standardnih mjera no Svjetska zdravstvena organizacija (World Health Organization, WHO) posebnu pažnju posvećuje edukaciji o momentima kada treba obaviti higijenu ruku što se u praksi često ne razumije. Pacijenti kolonizirani ili inficirani multiplorezistentnim bakterijama zahtijevaju dodatno i primjenu mjera kontaktne izolacije koja se idealno provodi u jednokrevetnim sobama no u nedostatku takvih uvjeta mjere kontaktne izolacije mogu se primjenjivati i na zonu pacijenta u višekrevetnoj sobi no tada zahtijevaju još bolju edukaciju i savjesnost zdravstvenih djelatnika. Ponašanje zdravstvenih djelatnika uvelike je uvjetovano strategijama na lokalnoj, nacionalnoj i internacionalnoj razini. WHO nudi preporuke što treba organizirati na nacionalnoj razini kroz niz dokumenata koji su od WHO strategije početkom 2000-tih evoluirali do WHO akcijskog plana koji još uvijek prati osnovne strateške ciljeve no od pojedinih država traži preciznije planiranje konkretnih aktivnosti koje vode tim ciljevima. Praćenje rezistencije i potrošnje antibiotika te incidencije bolničkih infekcija prvi je korak u planiranju drugih aktivnosti poput edukacije, razvoja smjernica za racionalnu uporabu antibiotika i provođenja javnih kampanja. Rano otkrivanje pojave bakterija s novim mehanizmima rezistencije te koordiniranje svih aktivnosti na razini intersekcijskog tijela nužno je za učinkovito sprječavanje širenja takvih sojeva.

**ACINETOBACTER SPP, EPIDEMIOLOGIJA, ZNAČAJ IZOLACIJE U BOLNIČKOJ SREDINI I MERE  
PREVENCIJE**

**ACINETOBACTER SPP, EPIDEMIOLOGY, SIGNIFICANCE OF ISOLATION IN THE HOSPITAL  
ENVIRONMENT AND PREVENTION MEASURES**

Mioljević Vesna

Služba za bolničku epidemiologiju i higijenu ishrane, Klinički centar Srbije

[vesna.mioljevic@gmail.com](mailto:vesna.mioljevic@gmail.com)

**UVOD:** Rezistencija ili otpornost bakterija na antibiotike nastaje kada određeni antibiotici izgube svoju sposobnost da zaustave rast i razmnožavanje bakterija. Rezistencija može biti urođena i stečena. Jedan od uzroka nastanka rezistencije na antibiotike je prekomerna i neracionalna upotreba antibiotika. Rezistencija bakterija na antibiotike je globalni problem. U Evropi se prate bakterije od velikog epidemiološkog značaja kao što su: *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomicin rezistentni enterokok (VRE), enterobakterije, rezistentne na 3. generaciju cefalosporina i karbapeneme, *Pseudomonas aeruginosa* *Acinetobacter baumannii*, rezistentni na karbapeneme i *Streptococcus pneumoniae* rezistentan na penicilin.

**CILJ I METOD:** Upoznavanje sa osnovnim epidemiološkim aspektima kolonizacije i infekcije *Acinetobacter* spp.

Preporuke Centra za kontrolu i prevenciju bolesti ([www.cdc.gov/getsmart/healthcare](http://www.cdc.gov/getsmart/healthcare). [www.cdc.gov/getsmart/healthcare](http://www.cdc.gov/getsmart/healthcare))

**REZULTATI:** Mere prevencije i kontrole MDROs mogu se grupisati u nekoliko kategorija: racionalna upotreba antibiotika, primena standardnih i kontaktaktnih mera prevencije, edukacija i dekolonizacije. Epidemiološki nadzor je važna komponenta kontrole MDRO koja omogućava otkrivanje novonastalih MDRO, praćenje epidemioloških trendova i merenje efikasnosti primenjenih mera. U svrhu epidemiološkog nadzora koriste se različite metode u okviru strategije MDRO nadzora, što podrazmeva i monitoring mikrobioloških rezultata dobijenih u sklopu rutinske kliničke prakse.

**ZAKLJUČAK:** U bolničkoj sredini posebno je važno sprečiti transmisiju MDRO uzročnika, odnosno kolonizaciju pacijenata MDRO bakterijama a samim tim i nastanak i širenje bolničkih infekcije.

U borbi protiv antimikrobne rezistencije neophodan je timski rad i multidisciplinarni pristup rešavanju ovog globalnog problema.

**KLJUČNE REČI:** *Acinetobacter* spp, rezistencija, prevencija, epidemiologija



**ACINETOBACTER SPP, EPIDEMIOLOGY, SIGNIFICANCE OF ISOLATION IN THE HOSPITAL  
ENVIRONMENT AND PREVENTION MEASURES**

Mioljević Vesna

Department of Hospital Epidemiology and Nutrition Hygiene, Clinical Center of Serbia  
[vesna.mioljevic@gmail.com](mailto:vesna.mioljevic@gmail.com)

**INTRODUCTION:** Resistance or antibiotic resistance to bacteria occurs when certain antibiotics lose their ability to stop growth and propagation of bacteria. Resistance can be innate and acquired. One of the causes of antibiotic resistance is the overuse and irrational use of antibiotics. Resistance to antibiotic bacteria is a global problem. In Europe, bacteria of great epidemiological significance are being monitored: Staphylococcus aureus (MRSA), vancomycin resistant enterococci (VRE), enterobacteria resistant to 3rd generation cephalosporin and carbapenem, Pseudomonas aeruginosa Acinetobacter baumannii, resistant to carbapenems and Streptococcus pneumoniae resistant to penicillin.

**OBJECTIVE AND METHODS:** Introduction to basic epidemiological aspects of colonization and infection of Acinetobacter spp. Recommendations of the Center for Disease Control and Prevention ([www.cdc.gov/getsmart/healthcare](http://www.cdc.gov/getsmart/healthcare)).

**RESULTS:** The various types of interventions used to control MDROs may be grouped into several categories. These include judicious use of antimicrobials, surveillance (routine and enhanced), standard and contact precautions, education and decolonization. Surveillance is an important component of any MDRO control program, allowing detection of newly emerging pathogens, monitoring epidemiologic trends, and measuring the effectiveness of interventions. Multiple MDRO surveillance strategies have been employed, ranging from surveillance of clinical microbiology laboratory results obtained as part of routine clinical practice.

**CONCLUSION:** Preventing infections will reduce the burden of MDROs in healthcare settings. Prevention of antimicrobial resistance depends on appropriate clinical practices that should be incorporated into all routine patient care.

**KEY WORDS:** Acinetobacter spp, MDR, prevention, epidemiology

**SESIJA: INTRAHOSPITALNE**

**INFEKCIJE**

**SESSION: INTRAHOSPITAL**

**INFECTIONS**

**USMENE PREZENTACIJE/ORAL**

**PRESENTATIONS**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
sa međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO

### ANTIMICROBIAL USE AND INFECTIONS IN LONG-TERM CARE FACILITY

Petrovska Basovska Branka  
[branka.petrovska@yahoo.com](mailto:branka.petrovska@yahoo.com)

Kakaraskoska Boceska Biljana, Dugagjin Osmani, Cvetkovikj Snezana, Coneva Elizabeta, Memeti Shaban

Institute of Public Health of Republic Macedonia – Skopje

**INTRODUCTION:** Weakened health defense mechanisms of the residents in long-term care facilities contribute to the wide antimicrobial use and high occurrence of infection. Antimicrobials are often used empirically and that increases the occurrence of multiresistant organisms.

**AIM:** To demonstrate the antimicrobial use and intra-hospital infections in one long-term care facility in Republic of Macedonia.

**MATERIAL AND METHODS:** 220 residents from one mixed long-term care facility were included in point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. Standardized questionnaire from European Center for Disease Prevention and Control - Stockholm, Sweden was used. The data was collected face-to-face from the health workers in the facility.

**RESULTS:** Total number of residents with antimicrobial(s) were 23 (10,45%). Antimicrobial use subdivided by class was: beta-lactams (13,8%); cephalosporins and other beta-lactams (34,5%); macrolides, lincosamides, streptogramins (6,9%); aminoglycosides (13,8%); quinolones (24,1%) and other antimicrobials (6,9%). Total number of reported infections was 7 urinary tract infections (2 confirmed and 5 probable urinary tract infections).

**CONCLUSION:** Prevention of the infections and management measures of antibiotic stewardship in long-term care facilities is essential.

**KEY WORDS:** antimicrobial, infection, long-term care facility

**SESIJA: POSTER PREZENTACIJA**

**MEDICINSKA MIKROBIOLOGIJA**

**SESSION: POSTER PRESENTATION-**

**MEDICAL MICROBIOLOGY**

**XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE**  
sa međunarodnim učešćem  
**MIKROMED 2018 REGIO**

**12<sup>TH</sup> SERBIAN MICROBIOLOGISTS CONGRESS**  
with international participation  
**MICROMED 2018 REGIO**

**SINDROM PFAPA - PRIKAZ SLUČAJA- RACIONALNA PRIMENA ANTIBIOTIKA KAO  
IMPERATIV SAVREMENE KLINIČKE PRAKSE  
PFAPA SYNDROME-CASE REPORT – RATIONAL USE OF ANTIBIOTICS AS IMERATIVE OF  
MODERN CLINICAL PRACTISE**

Jovanović Gordana <sup>1</sup>

[gordana69@sbb.rs](mailto:gordana69@sbb.rs), [jovanovic.gordana1969@gmail.com](mailto:jovanovic.gordana1969@gmail.com)

Popović Radmila <sup>1</sup>, Obradović Vladimir <sup>2</sup>, Ranković Vladimir <sup>3</sup>, Arsenijević Snežana <sup>4</sup>,

1 Odeljenje za mikrobiologiju Opšte bolnice Valjevo

2 Služba za uho, grlo i nos opšte bolnice Valjevo

3 Služba za pedijatriju Opšte bolnice Valjevo

4 Odeljenje za infektivne bolesti Opšte bolnice Valjevo

**UVOD:** bolest opisana prvi put 1987. godine

**Periodic Fever Aphthous stomatitis Pharyngitis Adenitis-** sindrom- skraćeno **PFAPA**

jeste sindrom koji se javlja u dečjem uzrastu, a karakterišu ga naizmenična pojava povišene telesne temperature, upala grla s aftama u usnoj šupljini i uvećane limfne žlezde vrata. Praktično postavljanje dijagnoze se vrši tako što se detetu da mala doza kortikosteroida na koju telesna temperatura spadne.

**CILJ RADA:** Kroz prikaz kliničkog slučaja, ukazati na neophodnost racionalne upotrebe antibiotika u savremenoj kliničkoj praksi.

**METODOLOGIJA:** Pacijentkinja stara 3 godine primljena na Odeljenje pedijatrije, Opšte bolnice Valjevo početkom decembra 2017. Dijagnoza na prijemu: Convulsiones febriles, Tonsillitis acuta non specificata. Na prijemu leukociti i sedimentacija povišeni.

Posle uključene antikonvulzivne i antibiotske terapije detetu se stanje stabilizovalo. Uvidom u prethodne istorije bolesti utvrđeno da se radi o detetu koje ORL specijalisti naše bolnice već duže vremena prate. Dete ima stariju sestru koja je u istom uzrastu imala sličan problem i kojoj se stanje posle tonsilektomije potpuno stabilizovalo. Pet meseci ranije dete se, s povišenom temperaturom i izraženim aftama, javlja najpre pedijatru koji uključuje ceftriaxon, ali temperatura ni posle nekoliko dana ne opada a potom i ORL specijalisti. Dete ima zapaljenje krajnika praćeno svakih mesec dana povišenom telesnom temperaturom, stalno je pod antibiotskom terapijom. Objektivnim pregledom specijaliste za uho, grlo i nos, uočene aftozne plaže na tonzilama. Nakon primenjene kortiko terapije nalaz zadovoljavajući, indikovana tonsiloadektomija

**REZULTAT:** Na konsultaciju infektologa, pred otpust s pedijatrije u decembru prošle godine, u Mikrobiološkoj laboratoriji urađen zapaljenski marker prokalcitonin čija je vrednost iznosila 0,41 ng/ ml. Vrednosti CRP a na ulazu u bolnicu su bile 103,5 a kontrolna vrednost kad se dete stabilizovalo iznosila je 42,9. PROKALCITONIN kao zapaljenski marker se u Mikrobiološkoj laboratoriji Opšte bolnice Valjevo radi od 2010. godine. Prokalcitonin je prohormon kalcitonina, polipeptidni prekurzor od 115 aminokiselinskih ostataka. U većini komparativnih studija dokazano je da je PCT > 1ng/ml specifičniji i osetljiviji marker infekcije i imunoloških zbivanja od CRP a , interleukina i INF $\alpha$ , vrednosti iznad 1 ng/ml mogu ukazivati na težu kliničku sliku bakterijskih infekcija, meningitisa i sepse ali i lokalizovanih bakterijskih infekcija. U tom smislu se smatralo da će i u ovom slučaju biti od veće dijagnostičke vrednosti.

Na osnovu vrednosti prokalcitonina kao i na osnovu prethodnih kliničkih podataka infektolog je u ovom ataku bolesti sugerisao nastavak antibiotske terapije. Detetu je 12.03 2018. urađena tonsiloadektomija posle čega se stanje potpuno stabilizovalo.

**ZAKLJUČAK:** Klackalica na relaciji imunološka zbivanja i terapijsko profilaktička upotreba antibiotika je delikatna. Rad je prikazao osobit sindrom dečjeg uzrasta, i ukazao da multidisciplinarni pristup u medicini dovodi do racionalizacije u potrošnji antibiotika.

**KLJUČNE REČI:** PFAPA sindrom, Antibiotska terapija, Prokalcitonin

**PFAPA SYNDROME-CASE REPORT – RATIONAL USE OF ANTIBIOTICS AS IMERATIVE OF  
MODERN CLINICAL PRACTISE**

Jovanović Gordana <sup>1</sup>

[gordana69@sbb.rs](mailto:gordana69@sbb.rs), [jovanovic.gordana1969@gmail.com](mailto:jovanovic.gordana1969@gmail.com)

Popović Radmila <sup>1</sup>, Obradović Vladimir <sup>2</sup>, Ranković Vladimir <sup>3</sup>, Arsenijević Snežana <sup>4</sup>,

1 Microbiology Department of Valjevo

2 Otorhinolaryngology Department of Valjevo General hospita

3 Pediatric Department of Valjevo General hospital

4 Department for Infective Disaeses of Valjevo General hospital

**INTRODUCTION:** PFAPA syndrome ( first introduction of desease was in 1987) is Periodic Fever syndrome, with Aphthous Stomatitis, Pharyngitis and Adenitis, typically manifested among children. Diagnosis is clinical including treatment with small doses of glucocorticoides which leads to body temperature falling down.

**OBJECTIVE:** the case of PFAPA syndrome at 3 year old girl pointed at the importance of rational use of antibiotics in modern clinical practise

**METHODOLOGY:** A three year old girl was taken to Valjevo general hospital at Pediatric Department in December 2017 with symptoms of febrile convulsiones and high temperature. Leucocytes at peripheral blood and CRP were increased. After anticonvulsiones and antibiotics treatment child was taken in stabile state. Rewieving medical history we found that patient was at Pediatric Department five months earlier because of febrile aphtous stomatitis disease and after that was permanently treated and monitored by otorhinolaryngology physicians. Periodic fever disease of child manifested with febris every month, constantly treated with antibiotics. After small doses of glucocorticoid therapy occured a fall in body temperature. Adenotonsillectomy was indicated.

Imunological marker of disease procalcitonin was done at Microbiology laboratory of Valjevo General Hospital, after infectology consultation in December attack of disease. It was 0,41. As a marker of infection procalcitonin was doing in our laboratory since 2010. Value of CRP fell down from 103,5 to 42,9. Procalcitonin was used as more sensitive and specific marker of imunological and infecitive disease occuring in the body, and its values >1ng/ml are more predictive at most of comparative studies than CRP, interleucin, and interferon  $\alpha$  According to the value of procalcitonin, infectologist suggested antibiotics treatment in this attack of disease. Although child was adenotonsilectomied in February 2018. After that, patient's condition was completely resolved.

**CONCLUSION:** We report an unusual child syndrome and present multidisiplinary approach to medicine which leads to consumption of antibiotics rationalization.

**KEY WORDS :** PFAPA syndrome, Antibiotics therapy, Procalcitonin

**IN VITRO DJELOTVORNOST FOSFOMICIN-GLUKOZA-6-FOSFATA U ODNOSU NA  
TRIMETOPRIM-SULFAMETOKSAZOL  
IN VITRO EFFECTIVNESS OF FOSFOMYCIN-GLUCOSE-6-PHOSPHATE COMPARED TO  
TRIMETHOPRIM-SULPHAMETOXAZOLE**

Babić Demir

[demirbabic@gmail.com](mailto:demirbabic@gmail.com)

JU Opća bolnica Bugojno, Bosna i Hercegovina

**UVOD:** Na području Bosne i Hercegovine jedino je registrovan peroralni oblik fosfomicina (Monural, Zambon), iako u svijetu postoji i intravenozni oblik kojim se pored urinarnih mogu liječiti i druge infekcije. Fosfomicin se u pravilu korisiti kao jedna megadoza antibiotika od 3 grama, a u slučaju kada je potrebno duže liječenje ova doza se može ponoviti svaka 3 dana.

**CILJ:** Kirby-Bauer metodom ispitati *in vitro* djelotvornosti fosfomicin-glukoza-6-fosfata (200µg) u odnosu na trimetoprim-sulfametoksazol (1,25-23,75 µg) koji je za razliku od fosfomicina jedan od najčešće korištenih antibiotika za liječenje urinarnih infekcija, ima znatan stepen rezistencije i duži period terapije. Rezistencija oba antibiotika na području Gornjovrbaske regije je prvi put praćena u ovom radu.

**METODE:** U mikrobiološkom laboratoriju JU Opća bolnica Bugojno, Bosna i Hercegovina u periodu od septembra 2017. do marta 2018. godine ispitano je 216 izolata *Escherichia coli* dobivenih iz uzoraka urina.

**REZULTAT:** Od ukupnog broja izolata *E.coli* - 98,61% je pokazalo osjetljivost na fosfomicin-glukoza-6-fosfat, dok je 57,40% izolata osjetljivo na trimetoprim-sulfametoksazol. Kada su u pitanju ESBL sojevi, 100% izolata je osjetljivo na fosfomicin, a 100% rezistentno na kotrimoksazol.

**ZAKLJUČAK:** Fosfomicin-glukoza-6-fosfat na području Gornjovrbaske regije ima izuzetno nizak stepen rezistencije, te se pokazao znatno efikasniji od kotrimoksazola. Istraživanjem *in vitro* efikasnosti fosfomicina zaključujemo da se isti može korisiti u empirijskoj terapiji akutnog nekompliciranog cistitisa.

**KLJUČNE RIJEČI:** fosfomicin, trimetoprim-sulfametoksazol, rezistencija

**IN VITRO EFFECTIVNESS OF FOSFOMYCIN-GLUCOSE-6-PHOSPHATE COMPARED TO  
TRIMETHOPRIM-SULPHAMETOXAZOLE**

Babić Demir

[demirbabic@gmail.com](mailto:demirbabic@gmail.com)

General Hospital Bugojno, Bosnia and Hercegovina

**INTRODUCTION:** In Bosnia and Herzegovina fosfomycin is only registred as oral form of antibiotic (Monural, Zambon), although in other countires there is intravenous form which is used for treatment of other types of infections, not only UTI. Fosfomycin (Monural) is used as one megadose containing 3 grams of antibiotic, but in cases when longer treatment is need, this dose can be repeated every three days.

**AIM:** To examine *in vitro* effectivness of fosfomycin-glucose-6-phosphate (200µg) compared to trimethoprim-sulphametroxazole (1,25-23,75 µg) by Kirby-Bauer method. Trimethoprim-sulphametroxazole is more often used for treatment of UTI than fosfomycin, even though it has higher antimicrobial resistance and longer treatment period. This is the first research of antimicrobial susceptibility of these two antibiotics in Gornjovrbaska region.

**METHODS:** A total of 216 isolates of *Eschericia coli* from urine samples were examined by Kirby-Bauer method in Microbiology laboratory at JU Opća bolnica Bugojno from September 2017 to March 2018.

**RESULTS:** 98,61% of *E.coli* isolates were susceptible to fosfomycin-glucose-6-phosphate, while 57,40% were susceptible to trimethoprim-sulphametroxazole. 100% of isolated ESβL strains were susceptible to fosfomycin. On the other side, 100% of these strains were to trimethoprim-sulphametroxazole.

**CONCLUSION:**Fosfomycin showed low resistance level and proved to be more efficient than trimethoprim-sulphametroxazole. By this research, it can be concluded that fosfomycin can be used in empirical treatment of acute uncomplicated cystitis.

**KEYWORDS:** Fosfomycin, trimethoprim-sulphametroxazole, susceptibility



**IDENTIFIKACIJA *CANDIDA SPP.* IZOLATA U SLUČAJEVIMA VULVOVAGINALNE KANDIDOZE  
IDENTIFICATION OF *CANDIDA SPP.* ISOLATES IN CASES OF VULVOVAGINAL CANDIDOSIS**

Kovačević-Jovanović Vesna

Milosavljević-Labus Nevena

Opšta bolnica "Medigroup", Beograd

**UVOD:** Vulvovaginalna kandidoza je gljivična infekcija vagine/vulve od koje pati tri četvrtine žena najmanje jednom tokom svog života. Najčešći uzročnik vulvovaginitisa je *Candida albicans*, a drugi mogući patogeni uključuju non-*albicans* izolate. Identifikacija vrsta *Candida* je važna zbog povećanja infekcija uzrokovanih vrstama koje nisu *Candida albicans*, uključujući vrste koje su otporne na određene antimikotične lekove.

**CILJ:** Cilj ovog ispitivanja je određivanje prevalencije *Candida albicans* i non-*albicans* izolata u slučajevima vulvovaginitisa kod žena koje su posetile službu ginekologije medicinske platforme „Medigroup“. Takođe, studija evaluira komercijalno dostupne hromogene podloge za identifikaciju *Candida spp.* u rutinskoj mikrobiološkoj laboratoriji.

**METOD:** 698 vaginalnih briseva je sakupljeno od žena sa simptomima vaginalne infekcije starosti od 15-75 godina, tokom perioda od januara 2018 do kraja februara 2018 godine. Vaginalni bris je inokulisan na Sabouraud dextrose agar i inkubiran aerobno na 33°C 48 sati. Kolonije su potom subkultivisane na hromogeni *Candida* agar (HiChrome *Candida* Differential agar, ProMedia). Za sve pacijentkinje su bili dostupni podaci o starosti, kliničkoj slici, drugim bolestima i terapiji kroz jedinstveni informacioni sistem.

**REZULTATI:** Rezultati ispitivanja su pokazali da od ukupno obrađenih 698 vaginalnih briseva 128 (18,3 %) je bilo pozitivno na *Candida spp.* Predominantna vrsta je bila *Candida albicans* 99/128 (77,3 %). Sledeće non-*albicans* vrste su izolovane: *Candida glabrata* 20/128 (15,6 %), *Candida krusei* 8/128 (6,3 %), *Candida tropicalis* 1/128 (0,28 %). Ukupan broj izolata non-*albicans* vrsta je bio 28/128 (21,9 %).

**ZAKLJUCAK:** Rezultati su pokazali da petina izolata pripada non-*albicans* vrstama. Preporuka je da se definitivna mikrobiološka dijagnoza uradi za pacijentkinje sa rekurentnim infekcijama, odnosno onima kod kojih inicijalni tretman nije dao rezultate. Takođe, ova studija preporučuje upotrebu hromogenih medija koji pomažu u ranoj i lakoj identifikaciji *Candida spp.* na nivou vrste.

**KLJUČNE REČI:** Vaginalna kandidoza, *Candida albicans*, non-*albicans* species

## IDENTIFICATION OF *CANDIDA SPP.* ISOLATES IN CASES OF VULVOVAGINAL CANDIDOSIS

Kovačević-Jovanović Vesna

Milosavljević-Labus Nevena

General hospital "Medigroup", Belgrade

**INTRODUCTION:** Vulvovaginal candidosis is a fungal infection of the vagina/vulva from which three quarters of women are affected at least once during their lifetimes. The most common cause of vulvovaginitis is *Candida albicans* and other possible pathogens include non-albicans isolates. Identification of *Candida* species is important due to increase in infections caused by species other than *Candida albicans*, including species that are resistant to certain antimycotics.

**AIM:** This study aimed to determine the prevalence of *Candida albicans* and non-albicans isolates in cases of vulvovaginal candidiasis among women attending Gynecology department of Medigroup Health Care Platform. Also, this study evaluate the commercially available chromogenic media for the identification of *Candida spp.* in a routine microbiology laboratory.

**METHODS:** 698 samples of high vaginal swabs were collected from women with symptoms of vaginal infection aged between 15- 75 years old during the period from January 2018 to the end of February 2018. They were separately inoculated on Sabouraud's dextrose agar and incubated aerobically at 33°C for 48 hours. Colonies then were subcultured on chromogenic *Candida* agar (HiChrome *Candida* Differential agar, ProMedia). A detailed clinical history with regards to the age of the patient, underlying diseases, other co morbid conditions and therapy through a unique information system are available for all patients.

**RESULTS:** The laboratory examination results showed that out of 698 high vaginal swabs, 128 (18,3 %) were positive for *Candida Spp.* *Candida albicans* was the predominant species 99/128, (77.3 %). The following non-albicans species were isolated: *Candida glabrata* 20/128 (15.6 %), *Candida krusei* 8/128 ( 6.3 %), *Candida tropicalis* 1/128 (0.28 %). The overall isolation of non-albicans species was 28/128 (21.9 %).

**CONCLUSION:** The results showed that one-fifth of the isolates belong to non-albicans species. It is recommended that a definitive microbiological diagnosis should be done for patients with recurrent infections, or those failing initial treatment. Also, this study recommends the use of chromogenic media which aids in early and easy species level identification of *Candida spp.* at the level of the species.

**KEY WORDS:** Vaginal candidosis, *Candida albicans*, non-albicans species

**MIKOTIČNI KERATITIS UZROKOVAN FEOHIFOMICETOM ALTERNARIA ALTERNATA  
MYCOTIC KERATITIS CAUSED BY FEOHIFOMYCETE ALTERNARIA ALTERNATA**

Džamić M. Aleksandar <sup>1</sup>

[aleksandar.dzamic@med.bg.ac.rs](mailto:aleksandar.dzamic@med.bg.ac.rs)

Stanojlović Svetlana<sup>2</sup>, Cvetković Milan<sup>1</sup>, Mijatović Stefan<sup>1</sup>, Stojković Milenko<sup>2</sup>, Mitrović Sanja<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorija za parazitologiju-mikologiju, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd

<sup>2</sup>Klinika za očne bolesti KCS, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd

**UVOD:** Filamentozne mikromicete iz roda *Alternaria* spadaju u retke uzročnike mikotičnog keratitisa, koji je obično povezan sa oslabljenom imunošću površine oka, prethodnom operacijom ili traumom. U terapiji keratomikoza često se koriste, sa većim ili manjim uspehom, antimikotici iz grupe azola i ehinokandina.

**OPIS SLUČAJA:** 51-godišnji muškarac sa zamućenjem rožnjače desnog oka, primljen je na Kliniku za očne bolesti KBC Zvezdara. Promeni na rožnjači prethodila je povreda nastala pre četiri meseca. Pacijentu je mikrobiološkim pregledom strugotine rožnjače utvrđena plesan *Alternaria alternata*, nakon čega je lečen flukonazolom, ali bez terapijskog uspeha. Kao hitan slučaj, zbog infiltrata rožnjače, pacijent je primljen na Kliniku za očne bolesti KCS, gde je urađena keratektomija plaka i započeta terapija rastvorom amfotericina B. Uzorak tkiva rožnjače za mikološku analizu je inokulisan u SDB i poslat u Laboratoriju za parazitologiju-mikologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Nakon tri dana inkubacije (28° C) i pojave zamućenja, uzorak je presejan na SDA i PDA, inkubiran pet dana i na osnovu kulturelnih i mikroskopskih karakteristika (LCB), identifikovana vrsta *Alternaria alternata*. Na osnovu disk difuzionog metoda antimikograma (CLSI) utvrđena je osetljivost izolata na vorikonazol, intermedijerna osetljivost na amfotericin B i rezistencija na flukonazol. Prethodna lokalna terapija rastvorom amfotericina B (0,15% 4×/dan) nije dovela do kliničkog poboljšanja, pa je prema rezultatima antimikograma u terapiju uveden i vorikonazol (6×/dan). Uz navedene antimikotike, lečenje je nastavljeno i moksifloksacinom (4×/dan), nafazolinom (6×/dan) i atropinom (1% 1×/dan), u vidu kapi za oči. Nakon 20 dana terapije i poboljšanja kliničkog nalaza, pacijent je otpušten na kućno lečenje.

**ZAKLJUCAK:** Kao redak uzročnik mikotičnog keratitisa, *Alternaria alternata* često je rezistentna na flukonazol. Primena kombinovane terapije na osnovu rezultata antimikograma ključna je za uspešno lečenje.

**KLJUČNE REČI:** *Alternaria alternata*, keratitis, vorikonazol

## MYCOTIC KERATITIS CAUSED BY FEOHIFOMYCETE *ALTERNARIA ALTERNATA*

Džamić M. Aleksandar <sup>1</sup>

[aleksandar.dzamic@med.bg.ac.rs](mailto:aleksandar.dzamic@med.bg.ac.rs)

Stanojlović Svetlana<sup>2</sup>, Cvetković Milan<sup>1</sup>, Mijatović Stefan<sup>1</sup>, Stojković Milenko<sup>2</sup>, Mitrović Sanja<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Parasitology-Mycology, Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Ophthalmology clinic, Clinical Center of Serbia, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

**INTRODUCTION:** Filamentous micromycetes from the genus *Alternaria* belong to the rare causative agents of mycotic keratitis, which is usually associated with weakened eye surface immunity, previous surgery or trauma. Treatment of keratomycosis often includes azole and echinocandin antifungals, with more or less success.

**CASE DESCRIPTION:** 51 year old male with blurred cornea of the right eye, was admitted to the Clinic for Eye Diseases CHC „Zvezdara”. The corneal change was preceded by injury four months ago. After microbiological examination of corneal scraping, mold *Alternaria alternata* was identified, and treatment with fluconazole started, but without success. As an emergency, due to corneal infiltrate, the patient was admitted to the Clinic for Eye Diseases CCS, where plaque keratectomy was made and treatment with amphotericin B solution started. The corneal tissue sample for mycological analysis was inoculated into SDB and sent to the Laboratory for Parasitology-Mycology, Medical Faculty, Belgrade. After three days of incubation (28°C) and blur occurrence, the sample was streaked on SDA and PDA, incubated for five days, and based on the culture and microscopic characteristics (LCB), *Alternaria alternata* was identified. Using disk diffusion method (CLSI) for antifungal susceptibility testing (AFST), susceptibility of the isolate to voriconazole, intermediate susceptibility to amphotericin B and resistance to fluconazole was determined. Previous local therapy with amphotericin B solution (0.15% 4×/day) did not lead to clinical improvement, and voriconazole (6×/day) was introduced, according to AFST results. Along with the mentioned antifungals, treatment was continued with moxifloxacin (4×/day), nafazolin (6×/day) and atropine (1% 1×/day), as eye drops. After 20 days of therapy and clinical improvement, the patient was discharged for home treatment.

**CONCLUSION:** As a rare cause of mycotic keratitis, *Alternaria alternata* is often resistant to fluconazole. The use of combination therapy based on AFST results is essential for successful treatment.

**KEYWORDS:** *Alternaria alternata*, keratitis, voriconazole

OSJETLJIVOST URINARNIH IZOLATA *ESCHERICHIA COLI* I *KLEBSIELLA SPP.* NA  
ANTIMIKROBNE LIJEKOVE U VANBOLNIČKOJ POPULACIJI  
ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *ESCHERICHIA COLI* AND *KLEBSIELLA SPP.* URINARY  
ISOLATES IN OUTPATIENTS

Đukarić Bojan <sup>1</sup>

[bojandjukaric23@gmail.com](mailto:bojandjukaric23@gmail.com)

Marković Tatjana<sup>1</sup>, Šmitran Aleksandra<sup>2</sup>, Jeinić Ljiljana<sup>1</sup>, Tomić Stanka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>JZU "Institut za javno zdravstvo Republike Srpske" Banja Luka, BiH

<sup>2</sup>Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, Republika Srpska, BiH

**UVOD:** Infekcije urinarnog sistema spadaju među najčešće bakterijske infekcije i kao takve su jedan od najčešćih razloga za primjenu antibiotiske terapije. Kao najčešći gram negativni uzročnici se detektuju bakterije iz porodice *Enterobacterales* (*Escherichia coli* i *Klebsiella spp.*).

**CILJ:** Cilj rada je da se utvrdi učestalost i antimikrobna osjetljivost uropatogenih izolata *E. coli* i *Klebsiella spp.* izolovanih iz urina vanbolničkih pacijenata.

**MATERIJAL I METODE:** U toku šestomjesečnog perioda (01.10.2017. – 31.03.2018.) u Laboratoriji za ispitivanje uzoraka urina Službe za mikrobiologiju Instituta za javno zdravstvo Republike Srpske u Banjoj Luci urađeno je ukupno 13056 urinokultura. Ispitivanje osjetljivosti je izvedeno disk difuzionom metodom za 8 antimikrobnih lijekova (amoksisilin, amoksisilin+klavulanska kiselina, cefaleksin, gentamicin, ciprofloksacin, norfloksacin, nitrofurantoin i trimetoprim/sulfometaksazol) u skladu sa preporukama Evropskog komiteta za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove (EUCAST).

**REZULTATI:** Od ukupnog broja ispitanih urina, detektovano je 2063 (15,8%) urina sa signifikantnom bakteriurijom. Najčešće izolovane gram negativne bakterije su bile *E. coli* (66,31%) i *Klebsiella spp.* (9,6%). Kod *E. coli* je utvrđena najmanja osjetljivost na amoksisilin+klavulanska kiselina (testiran samo kod djece uzrasta do 14 godina) i amoksisilin, i to po 47%. Procenat osjetljivih izolata na ciprofloksacin (testiran samo kod odraslih muških osoba) i trimetoprim/sulfometoksazol je bio nešto veći, 51% i 64% redom. Visok procenat osjetljivosti je uočen na norfloksacin (76%), gentamicin (85%), cefaleksin (89%) i nitrofurantoin (97%). Kod testiranih izolata *Klebsiella spp.* najmanji procenat osjetljivosti je utvrđen na amoksisilin+klavulanska kiselina (testiran samo kod djece uzrasta do 14 godina) i ciprofloksacin (testiran samo kod odraslih muških osoba) i to po 15%. Osjetljivost na cefaleksin iznosi 42%, na trimetoprim/sulfometaksazol 55%, a na gentamicin i norfloksacin 56% i 62% redom.

**ZAKLJUČAK:** Neophodno je konstantno praćenje kretanja antimikrobne rezistencije kao i unapređivanje postojećih smjernica za terapiju infekcija urinarnog trakta. Izradu preporuka za empirijsku terapiju trebalo bi zasnivati na periodično provedenim studijama na lokalnom nivou.

**KLJUČNE RIJEČI:** *E. coli*, *Klebsiella spp.*, antimikrobna rezistencija.

**ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF ESCHERICHIA COLI AND KLEBSIELLA SPP. URINARY ISOLATES IN OUTPATIENTS**

Đukarić Bojan <sup>1</sup>

[bojandjukaric23@gmail.com](mailto:bojandjukaric23@gmail.com)

Marković Tatjana<sup>1</sup>, Šmitran Aleksandra<sup>2</sup>, Jeinić Ljiljana<sup>1</sup>, Tomić Stanka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Public Health Institute of the Republic of Srpska, Banja Luka, BiH

<sup>2</sup>Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Republic of Srpska, BiH

**INTRODUCTION:** Urinary tract infections are among the most frequently encountered bacterial infections and thus represent one of the most common reasons for administration of antibiotic treatment. The most common Gram-negative disease-causing agents are detected from the family *Enterobacteriales* (*Escherichia coli* and *Klebsiella spp.*).

**AIM:** The aim of this study is to determine frequency and antimicrobial susceptibility of uropathogenic isolates of *E. coli* and *Klebsiella spp.* isolated from outpatient urine samples.

**MATERIALS AND METHODS:** During the six-month period (01.10.2017 – 31.03.2018), a total of 13056 urine culture tests were carried out in the Sample Testing Laboratory within the Department of Microbiology of the Public Health Institute of the Republic of Srpska in Banja Luka. Susceptibility testing was carried out using disc diffusion method for 8 antimicrobials (amoxicilin, amoxicilin+clavulanic acid, cefalexin, gentamicin, ciprofloxacin, norfloxacin, nitrofurantoin and trimethoprim/sulfomethaxazole) in accordance with the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

**RESULTS:** Of the total number of urine samples examined, 2063 (15.8%) urine samples with significant bacteriuria were detected. The most frequently isolated Gram-negative bacteria were *E. coli* (66.31%) and *Klebsiella spp.* (9.6%). *E. coli* was found to have the lowest susceptibility to amoxicilin+clavulanic acid (tested population were children under the age of 14) and amoxicilin, 47% each. The percentage of susceptible isolates to ciprofloxacin (tested population were male adults) and trimethoprim/sulfomethoxazole was slightly higher, 51% and 64% respectively. A large susceptibility percentage was observed to norfloxacin (76%), gentamicin (85%), cefalexin (89%) and nitrofurantoin (97%). At *Klebsiella spp.* tested isolates, the lowest susceptibility percentage was seen at amoxicilin+clavulanic acid (tested population were children under the age of 14) and ciprofloxacin (tested population were male adults), 15% each. Susceptibility to cefalexin accounts for 42%, trimethoprim/sulfometaxazole 55%, and gentamicin and norfloxacin 56% and 62% respectively.

**CONCLUSION:** It is necessary to constantly monitor the movement of antimicrobial resistance as well as to improve current treatment guidelines on urinary tract infections. Draft guidelines on empirical therapy should be based on periodical studies conducted at the local level.

**KEY WORDS:** *E. coli*, *Klebsiella spp.*, antimicrobial resistance.

**OSETLJIVOST NA ANTIBIOTIKE GRAM NEGATIVNIH BAKTERIJA UZROČNIKA  
VANBOLNIČKIH INFEKCIJA URINARNOG TRAKTA U BEOGRADU  
ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF GRAM-NEGATIVE BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM  
OUTPATIENTS WITH URINARY TRACT INFECTIONS IN BELGRADE**

Vuksanović Pavle

[pavlius3@yahoo.com](mailto:pavlius3@yahoo.com)

Damjanović Aleksandar<sup>1</sup>, Šijak Papadimitriou Milena<sup>2</sup>, Gajić Ina<sup>3</sup>, Kekić Dušan<sup>3</sup>, Popović Sunčica<sup>3</sup>,  
Mijač Vera<sup>3</sup>, Opavski Nataša<sup>3</sup>

1. Gradski zavod za javno zdravlje Beograd
2. Mikrobiološka laboratorija Marković, Beograd
3. Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Beograd

**UVOD:** Infekcije urinarnog trakta (IUT) su česte u svim uzrasnim grupama. Nekomplikovane IUT se leče empirijski, a zbog neadekvatnog korišćenja antibiotika došlo je do izrazitog porasta rezistencije bakterija.

**CILJ:** Cilj ovog rada je bio da se ispita osetljivost izazivača IUT na antibiotike kod ambulantnih pacijenata u Beogradu.

**MATERIJAL I METODE:** Istraživanje je obuhvatilo 261 soj izolovan od ambulantnih pacijenata sa kliničkim simptomima IUT tokom dvomesečnog perioda u 2017. i 2018. godini. Osetljivost bakterija na 14 antibiotika je ispitana disk difuzionom metodom antibiograma, a produkcija beta laktamaza proširenog spektra dejstva (ESBL) kombinovanim disk testom.

**REZULTATI:** Većina sojeva je izolovana od odraslih pacijenata (95%), posebno ženskog pola, starijih od 60 godina (51%). Najčešće izolovani uropatogeni su bile enterobakterije (92%): *Escherichia coli* (76%), *Klebsiella-Enterobacter* spp. (7%) i *Proteus mirabilis* (6%). *E. coli* je pokazivala najveći nivo rezistencije na ampicilin (35,6%), trimetoprim-sulfametoksazol (26,2%) i ciprofloksacin (22,5%), dok je rezistencija na sve tri generacije cefalosporina bila niža i podjednaka – 11% na cefuroksim, cefpodoksim i ceftriakson; 11,6% na cefadroksil i 12,6% na cefaleksin i cefahlor. Sojevi *E. coli* su bili osetljivi na fosfomicin (98,7%), nitroksolin (99,4%) i nitrofurantoin (99,5%). ESBL produkujući sojevi su bili najviše zastupljeni među izolatima *Klebsiella-Enterobacter* spp. (63%) i *P. mirabilis* (76%), dok je 11% sojeva *E. coli* bilo ESBL pozitivno.

**ZAKLJUCAK:** U ovoj studiji je pokazano da je *E. coli* najčešći izazivač IUT u vanbolničkoj sredini, kao i da njena rezistencija na aminopeniciline, trimetoprim-sulfametoksazol i ciprofloksacin prelazi 20%. Stoga bi u empirijskoj terapiji akutnog nekomplikovanog cistitisa trebalo izbegavati ove antibiotike. Osetljivosti *E. coli* na fosfomicin, nitrofurantoin i nitroksolin je bila visoka, te se oni mogu preporučiti kao lekovi prvog izbora. U slučajevima kada se oni ne mogu koristiti, cefalosporini predstavljaju prihvatljivu alternativu. Zabrinjavajuća je pojava ESBL produkujućih sojeva *Klebsiella-Enterobacter* spp. i *P. mirabilis*. u visokom procentu kod vanbolničkih pacijenata.

**KLJUCNE RECI:** Infekcije urinarnog trakta, Gram negativne bakterije, antibiotici



**ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF GRAM-NEGATIVE BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM  
OUTPATIENTS WITH URINARY TRACT INFECTIONS IN BELGRADE**

Vuksanović Pavle

[pavlius3@yahoo.com](mailto:pavlius3@yahoo.com)

Damjanović Aleksandar<sup>1</sup>, Šijak Papadimitriou Milena<sup>2</sup>, Gajić Ina<sup>3</sup>, Kekić Dušan<sup>3</sup>, Popović Sunčica<sup>3</sup>,  
Mijač Vera<sup>3</sup>, Opavski Nataša<sup>3</sup>

1. Institute of Public Health of Belgrade

2. Laboratory Marković, Belgrade

3. Institute for microbiology and immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

**INTRODUCTION:** Urinary tract infections (UTIs) are among the most common infections in all age groups. Uncomplicated UTIs are usually treated empirically, but due to overuse of antibiotics rise in bacterial resistance has been observed.

**AIM:** The aim of this study was to determine antibiotic susceptibility pattern of urinary pathogens in outpatient population in Belgrade.

**MATERIAL AND METHODS:** The study included 261 isolates of uropathogens collected over a two-month period during 2017 and 2018 from patients with clinical presentation of UTIs. Susceptibility to 14 antimicrobial agents was tested using disk diffusion method, while production of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) was detected by combined-disk test.

**RESULTS:** Majority of strains were isolated from adults (95%), mostly from female patients older than 60 years (51%). Enterobacteriaceae (92%) prevailed with *Escherichia coli* being the most frequent (73.0%), followed by *Klebsiella-Enterobacter* spp. (7%) and *Proteus mirabilis* (6%). Among *E. coli* isolates the highest rates of resistance were found to ampicillin (35.6%), trimethoprim-sulfamethoxazole (26.2%) and ciprofloxacin (22.5%), while resistance to the first, second and third generation of cephalosporins was lower: from 11% to cefuroxime, cefpodoxime, ceftriaxone, 11.6% to cefadroxil to 12.6% to cephalexin and cefaclor. However, *E. coli* isolates were highly susceptible to fosfomycin (98.7%), nitroxolin (99.4%) and nitrofurantoin (99.5%). ESBL producing isolates were most commonly found in *Klebsiella-Enterobacter* spp. (63%) and *P. mirabilis* (76%), while 11% *E. coli* isolates were ESBL positive.

**CONCLUSION:** This study documented that *E. coli* remains the most common pathogen in community-acquired UTIs. The resistance rates of *E. coli* to aminopenicillins, trimethoprim-sulfamethoxazole and ciprofloxacin exceeded 20% and they should be avoided for empiric treatment of acute uncomplicated cystitis in our country. *E. coli* remained highly susceptible to nitrofurantoin, nitroxolin and fosfomycin, and these antibiotics should be considered the drugs of first choice. In accordance with our results, cephalosporins could be used as acceptable alternatives. High rate of ESBL producing isolates especially in *Klebsiella-Enterobacter* spp. and *P. mirabilis* among outpatients is particularly worrisome.

**KEY WORDS:** Urinary tract infection, Gram-negative bacteria, antibiotics



REZISTENCIJA PSEUDOMONAS AERUGINOSA NA ANTIBIOTIKE, DVADESETOGODISNJI  
PRESEK  
RESPONSION OF PSEUDOMONAS AERUGINA ON ANTIBIOTICS, TWENTY-ANNUAL  
SURVIVOR

Stanković Nedeljковиć Natasa <sup>1</sup>

[natasasn@yahoo.com](mailto:natasasn@yahoo.com)

Bogdanović Tatjana<sup>2</sup>, Antić Zvezdana <sup>2</sup>, Vidić Goran <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Opšta bolnica „Aleksinac“, Aleksinac, Beograd

<sup>2</sup> Dom zdravlja „Aleksinac“, Aleksinac, Beograd

**UVOD:** *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) spada među najčešće uzročnike hopsiralnih infekcija i najrezistentnije bakterije.

**CILJ:** Ciljevi rada su određivanje prisutstva *P.aeruginosa* u bolesničkim materijalima, amulantnog i bolničkog porekla i ispitivanje osetljivosti na antibiotike.

**METOD:** Ispitivani uzorci bolesničkih materijala su zasejavani na krvne agar ploče, Endo agar, glikozni bujon i tiolikat (osim briseva grla i nosa) i podloge za obogaćenje su presejavane. *P.aeruginosa* je identifikovan pomoću standardnih laboratorijskih metoda. Izrada antibiograma je vršena na osnovu EUCAST standarda na piperacilin-tazobaktam, imipenem, meropenem, doripenem, ceftazidim, cefepim, amikacin, gentamicin, tobramicin, netilicin, levofloksacin i ciprofloksacin.

**REZULTAT:** Ispitivanje je obuhvatilo 159 izolata (111 ambulantnog porekla i 48 bolničkog), kultivisana tokom 2017. Ispitivanu grupu činilo je 58,76% muškaraca i 42,13% žena, a 37% ispitanika je bilo starosti između 70 godina i 80. 67,29% izolata je kultivisano iz briseva rana, 10,06 iz urinokultura, 8,16% iz sputuma, a manji procenat iz briseva uva, oka, jezika, a dva izolata iz briseva površina u bolnici. Izolati su bili najosetljiviji na i piperacilin-tazobaktam (85,61%), imipenem, meropenem (85,41), pa ertrapenem 74,21%, amikacin 73,33% i ciprofloksacin 57,37%. Najrezistentniji su bili na gentamicin. 1,27% izolata je bilo rezistentno na sve antibiotike, osim na kolistin. 2,7% izolata ambulantnog porekla je produkovalo metalo beta laktamaze, a 8,33% bolničkog. Tokom 1998. godine *P.aeruginosa* je izazivo 18,18% infekcija ambulantnih rana i 10,5% bolničkih, a u 2003. čak 61,03% ambulantnih i 14,4% bolničkih. Tokom 2017. god izazivao je oko 32% infekcija rana. U 2003. svi izolati su bili osetljivi na piperacilin-tazobaktam, a 96,42% na amikacin i 91,6% na ceftazidim.

**ZAKLJUCAK:** *P.aeruginosa* je najčešće kultivisan iz briseva rana, uglavnom starijih ispitanika. Izolati su bili najosetljiviji na piperacilin-tazobaktam i karbapeneme, a najrezistentiji na gentamicin. Rezistencija izolata na antibiotike bolničkog porekla je bila visa u odnosu na ambulantne izolate. Rezistencija na antibiotike se tokom poslednje dve decenije drastično smanjila.

**KLJUCNE RECI:** *Pseudomonas*, rezistencija, antibiotik

RESPONSION OF PSEUDOMONAS AERUGINA ON ANTIBIOTICS, TWENTY-ANNUAL  
SURVIVOR

Stanković Nedeljko<sup>1</sup> Natasa<sup>1</sup>

[natasasn@yahoo.com](mailto:natasasn@yahoo.com)

Bogdanović Tatjana<sup>2</sup>, Antić Zvezdana<sup>2</sup>, Vidić Goran<sup>1</sup>

<sup>1</sup> General Hospital,, Aleksinac,, Aleksinac

<sup>2</sup> Health Center,, Aleksinac,, Aleksinac

**INTRODUCTION:** *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) falls among the most common causes of hospital infections and the most resistance bacteria.

**OBJECTIVE:** The objectives of the work are to determine the presence of *P.aeruginosa* in sickness, ambulant and hospital origin, and antibiotic susceptibility testing.

**METHOD:** The tested samples are seeded on blood agar plates, Endo agar, glyucose broth and thiocolate (except throat and nose swabs) and enrichment media are sifted. *P.aeruginosa* has been identified using standard laboratory methods. The preparation of the antibiogram was based on the EUCAST standard for piperacillin-tazobactam, imipenem, meropenem, doripenem, ceftazidime, cefepime, amikacin, gentamicin, tobramycin, netilycin, levofloxacin and ciprofloxacin.

**RESULT:** The study included 159 isolates (111 outpatient and 48 hospital), cultivated during 2017. 58.76% of men and 42.13% of women were interviewed, while 37% of subjects were between the age of 70 and 80. 67, 29% of the isolates were cultured from wound swabs, 10.06 from urinculture, 8.16% from sputum, and a smaller percentage of swabs of the ear, eye, tongue, and two isolates from the swabs of the hospital site. Isolates were most sensitive to piperacillin-tazobactam (85.61%), imipenem, meropenem (85.41), ertrapenem 74.21%, amikacin 73.33%, and ciprofloxacin 57.37%. The most appreciable were gentamicin. 1,27% of the isolates were resistant to all antibiotics, except for colistin. 2.7% of the outpatient isolates produced beta-lactamase metal, and 8.33% of the hospital. During 1998, *P.aeruginosa* was caused 18.18% of outpatient infections and 10.5% of patients, and in 2003 as many as 61.03% of outpatients and 14.4% of hospital patients. During 2017, it caused about 32% of wound infections. In 2003, all isolates were sensitive to piperacillin-tazobactam, and 96.42% on amikacin and 91.6% on ceftazidime.

**CONCLUSION:** *P.aeruginosa* is most commonly cultivated from swabs of wounds, mostly older patients. Isolates were most sensitive to piperacillin-tazobactam and carbapenems, and most resistance to gentamicin. Resistance to isolates on antibiotics of hospital origin was visa versus ambulatory isolates. Resistance to antibiotics has drastically decreased over the last two decades.

**KEY WORDS:** *Pseudomonas*, resistance, antibiotic

UPRAVLJANJE INFEKTIVNIM MEDICINSKIM OTPADOM U INSTITUTU ZA TRANSFUZIJU  
KRVI SRBIJE  
MEDICAL WASTE MENAGMENT IN BLOOD TRANSFUSION INSTITUTE

Milosavljević Slavica

[itks.slavica.milosavljevic@gmail.com](mailto:itks.slavica.milosavljevic@gmail.com)

Martinović Biljana, Savić Olivera

Institut za transfuziju krvi Srbije , Beograd

**UVOD :** Medicinski otpad se definiše kao sav otpad koji se generiše u zdravstvenim institucijama, istraživačkim ustanovama i laboratorijama. On predstavlja heterogenu mešavinu otpada koji ima karakteristike komunalnog i visoko rizičnog/opasnog otpada, koji pokriva 10–25% ukupno generisanog otpada.

U procesu obavljanja svoje osnovne zdravstvene delatnosti prikupljanja, obrade, prerade i distribucije krvi i produkata od krvi, tj. proteinskih derivata krvi (lekovi humanog porekla), kao i pružanja specijalnih zdravstvenih usluga, Institut generiše specifičnu vrstu medicinskog otpada različitih kategorija, i to: biološki otpad, patoanatomski otpad, **infektivni otpad** i potencijalno infektivni otpad.

**CILJ :** Uspostaviti adekvatne modele upravljanja ovom vrstom otpada koje treba prilagoditi i proizvedenim količinama i mestima njihovog nastanka.

**METOD :** Institut za transfuziju krvi izvršio je nabavku uređaja „NEWSTER“ za sterilizaciju infektivnog i potencijalno infektivnog otpada svih kategorija, uključujući i opasan medicinski otpad. Proces sterilizacije se obavlja termičkim i hemijskim putem, tj. pri temperaturi od 155° C u vlažnoj sredini, sa dodatkom natrijum hipohlorita.

**REZULTATI :** U periodu od 01. 01. 2017. godine do 01.01.2018. godine Institut za transfuziju krvi Srbije je generisao sledeće kategorije otpada u količini od 27.900 kg, nakon obrade u uređaju za mrvljenje i sterilizaciju količina otpada je iznosila 24.800 kg. Od toga je najveći deo činio biološki otpad (oko 16,5 T), zatim infektivni i potencijalno infektivni otpad (oko 11 T) dok je količina ostalog otpada (patoanatomski otpad i posude sa oštrim predmetima) iznosila oko 0,5 T.

Obradeni otpad je sterilan, suv, smrvljen, neprepoznatljiv, ima potencijal energenta, pa se može koristiti kao izvor energije i kao takav spada u kategoriju komunalnog otpada. Sistem autoklaviranja za sterilizaciju medicinskog otpada garantuje redukciju mikroorganizama (1preživeli od 10<sup>10</sup>) i smanjuje zapreminu medicinskog otpada od 30-75%.

**ZAKLJUČAK :** Pravilno upravljanje medicinskim otpadom sprečava nastanak i širenje infekcija, povređivanja, profesionalna oboljenja kod zdravstvenih radnika i drugih lica i omogućava zaštitu životne okoline.

## MEDICAL WASTE MENAGMENT IN BLOOD TRANSFUSION INSTITUTE

Milosavljević Slavica

[itks.slavica.milosavljevic@gmail.com](mailto:itks.slavica.milosavljevic@gmail.com)

Martinović Biljana, Savić Olivera

Blood Transfusion Institute of Serbia

**INTRODUCTION:** Medical waste is defined as all the waste that is generated in medical institutions, research institutions and laboratories. It represents a heterogeneous mixture of waste that has characteristics of municipal and high-risk / hazardous waste, which covers 10-25% of the total waste generated.

In the process of performing its basic medical activity of collecting, processing and distribution of blood and blood products, ie. protein derivatives of blood (Medicines of human origin), as well as providing special medical services, Institute generates a specific type of medical waste of different categories, namely: biological waste, a post-mortem waste, infectious waste, and potentially infectious waste.

**OBJECTIVE:** To establish proper models of management of this type of waste that should be customized also to produced quantities and the places of their origin.

**METHODS:** The Blood Transfusion Institute purchased the device "Newster" for sterilization of infectious and potentially infectious waste of all categories, including hazardous medical waste. The sterilization process is performed by thermal or chemical means, ie. at a temperature of 155<sup>o</sup> C in a humid environment, with the addition of sodium hypochlorite.

**RESULTS:** In the period from 01. 01. 2017 to 01.01.2018. the Blood Transfusion Institute generated the following categories of waste in quantities of 27,900 kg, after processing in the device for grinding and sterilisation the amount of waste was 24,800 kg. Of which the largest part was biological waste (16.5 T), followed by an infectious and potentially infectious waste (about 11 T) and the quantity of other waste (pathoanatomical waste and containers with sharp objects) was around 0.5 T.

The processed waste is sterile, dry, crushed, unrecognizable, has the potential energy, and can be used as an energy source and as such falls under the category of municipal waste. System autoclave for sterilizing medical waste guarantees a reduction of microorganisms (1 survived out of 10<sup>12</sup>) and reduces the volume of medical waste by 30-75%.

**CONCLUSION:** Proper management of medical waste prevents the emergence and spread of infections, injuries, professional diseases in health care workers and other persons and enables environment protection.

**PRIMENA LOGISTIČKOG MODELOVANJA U ISTRAŽIVANJU HIV EPIDEMIJE U SRBIJI**  
**APPLICATION OF LOGISTIC MODELING IN ASSESING HIV EPIDEMIC IN SERBIA**

Jovanović Luka <sup>1</sup>

[lukabgd01137@gmail.com](mailto:lukabgd01137@gmail.com)

Šiljić Marina<sup>1</sup>, Ćirković Valentina<sup>1</sup>, Salemović Dubravka<sup>2</sup>, Pešić-Pavlović Ivana<sup>3</sup>, Ranin Jovan<sup>2</sup>,  
Jevtović Đorđe<sup>2</sup>, Stanojević Maja<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

<sup>2</sup> Klinika za infektivne i tropske bolesti, Klinički centar Srbije, Odeljenje HIV/AIDS, Beograd  
Srbija

<sup>3</sup> Laboratorija za virusologiju, Centar za mikrobiologiju, Klinički centar Srbije, Beograd, Srbija

**UVOD:** Praćenje lokalne epidemije infekcije virusom humane imunodeficijencije (HIV) korišćenjem kvalitetnih epidemioloških podataka može da pruži ključne informacije za ciljano vođenje javno-zdravstvenih intervencija i evaluaciju trendova HIV epidemije umnogim zemljama. Prema aktuelnim procenama, u Srbiji oko 2700 (2200-3300) osoba živi sa HIV-om i ne uočava se pad incidencije HIV infekcije, uprkos inicijative Svetske zdravstvene organizacije pod nazivom "90/90/90" koja je pokrenuta 2015. Godine i ima za cilj da se HIV epidemija zaustavi do 2030. godine.

**CILJ:** Cilj naše studije je bio analiza kretanja HIV epidemije u Srbiji u periodu od 1984. do 2016. godine, primenom logističkog modela i procena budućeg trenda do 2030. godine.

**METOD:** Slaganje logističkog regresionog modela sa podacima je sprovedeno pomoću softvera NLREG (verzija 6.6). U kreiranju modela korišćeni su podaci Instituta za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut" o novodijagnostikovanim slučajevima HIV infekcije u Srbiji kao i osnovni demografski podaci u periodu od 1984. do 2016. godine, dostupni na veb sajtu Instituta kao i u godišnjim izveštajima Evropskog centra za kontrolu bolesti.

**REZULTAT:** U periodu između 1984. i 2016. godine kumulativna učestalost novih slučajeva iznosila je 3590 u opštoj populaciji i 2785 u populaciji muškaraca koji imaju seksualne odnose sa muškarcima (MSM). Oba seta podataka su uspešno logistički modelirana, pokazujući ranu ekspancionalnu fazu krive rasta. Na osnovu predloženog modela može se očekivati da će do 2030. godine broj novodijagnostikovanih slučajeva HIV infekcije nastaviti da raste i to naročito vezano za MSM transmisiju.

**ZAKLJUČAK:** Rezultati ove studije ukazuju da je HIV epidemija u Srbiji još uvek u ekspancionalnoj fazi rasta, posebno u populaciji MSM. Dalja istraživanja i primena ciljanih preventivnih mera su neophodni kako bi se promenili trendovi rasta HIV epidemije u Srbiji.

**KLJUČNE REČI:** HIV, Epidemiologija, Logističko modelovanje

## APPLICATION OF LOGISTIC MODELING IN ASSESING HIV EPIDEMIC IN SERBIA

Jovanović Luka <sup>1</sup>

[lukabgd01137@gmail.com](mailto:lukabgd01137@gmail.com)

Šiljić Marina<sup>1</sup>, Ćirković Valentina<sup>1</sup>, Salemović Dubravka<sup>2</sup>, Pešić-Pavlović Ivana<sup>3</sup>, Ranin Jovan<sup>2</sup>,  
Jevtović Đorđe<sup>2</sup>, Stanojević Maja<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> Clinic for Infectious and Tropical Diseases, Clinical Center of Serbia, Department of HIV/AIDS,  
Belgrade, Serbia

<sup>3</sup> Clinical Virological laboratory, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia

**INTRODUCTION:** The study of the local epidemic of HIV infection using accurate surveillance data may provide essential information in guiding public health interventions and monitoring epidemic trends in many countries. According to the current estimates, the number of people living with HIV in Serbia is around 2700 (2200-3300) and no decrease in the incidence of HIV has been noted, in spite of the “90/90/90” initiative by World Health Organization launched in 2015, aimed to end the HIV epidemic by 2030.

**GOAL:** The aim of our study was to analyse the growth of the HIV epidemic in Serbia in the period 1984-2016, by fitting the logistic model and to evaluate future trends of the national HIV epidemic.

**METHODS:** To fit the logistic curve NLREG (ver. 6.6) software was used. Epidemiological data including the number of newly diagnosed cases and basic demographic data for the period 1984 to 2016 were obtained from the website of the Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanovic Batut” and ECDC HIV/AIDS surveillance reports.

**RESULTS:** In the period 1984 -2016 cumulative frequency of new cases was 3590 in general population and 2785 among men who have sex with men (MSM). Both datasets fit the logistic growth model, showing early exponential phase of the growth curve. According to the suggested model, by the year 2030 the number of newly diagnosed HIV cases in Serbia will continue to grow, in particular in the MSM population

**CONCLUSION:** The results of this study imply that HIV epidemic in Serbia still remains in the exponential growth phase, especially in the MSM population. Further investigations and targeted preventive interventions are needed in order to change the curves of the national HIV epidemic in Serbia.

**KEY WORDS:** HIV, Epidemiology, Logistic modelling

**PRISUSTVO ACINETOBACTER SPP. U BOLESNIČKIM MARIJALIMA I REZISTENCIJA NA  
ANTIBIOTIKE**  
**PRESENCE OF ACINETOBACTER SPP. IN PATIENT' S MATERIALS AND RESISTANCE ON  
ANTIBIOTICS**

Bogdanović Tatjana <sup>1</sup>

[tatjanabogdanovic@gmail.com](mailto:tatjanabogdanovic@gmail.com)

Stanković Nedeljko<sup>2</sup>, Antić Zvezdana <sup>1</sup>, Milošević Sanja<sup>2</sup>

1 Dom zdravlja "Aleksinac", Aleksinac

2 Opšta bolnica "Aleksinac", Aleksinac

**UVOD:** *Acinetobacter spp.* spada u veoma rasprostranjene bakterije, koje mogu da se nađu svuda u našem okruženju, vodama, zemlji i u hrani. Na žalost, često i u bolničkoj sredini, najprisutniji je u jedinicama intenzivne nege. Kolonizuje kožu zdravih ljudi, na drugim delovima tela se ređe sreće kao komezal. Čest je uzročnik bolničkih infekcija na mekim tkivima i urinarnom traktu, vezanih za medicinske intervencije. Spada u najrezistentnije bakterije, sve češće je rezistentan i na karbapeneme.

**CILJ:** Ciljevi rada su bili utvrđivanje prisustva *Acinetobacter sp.* u pojedinim vrstama bolesničkih materijala, ambulantnog i bolničkog porekla i ispitivanje osetljivosti na antibiotike. **Metod:** Ispitivani bolesnički materijali su zasejavani na krvne, edno agar ploče i podloge za obogaćenje. Identifikacija je vršena standardnim laboratorijskim postupcima. Izrada antibiograma je vršena po EUCAST standradu na: imipenem, meropenem, doripenem, amikacin, gentamicin, tobramicin, netilmicin, levofloksacin i ciprofloksacin.

**REZULTAT:** Ispitivanje je obuhvatilo 20 izolata bolničkog porekla i 44 ambulantnog, 57,58% kod muškaraca i 42,42% kod žena. Ispitanici su najčešće bili starosti između 60 i 70 godina (36,36%) i između 70 i 80 (24,24%). Izolati su kultivisani iz: briseva rana 81,25% (95% bolničkih i 75% ambulantnih), briseva grla (3,12%), sputuma (9,38%), jezika (3,13%), oka i urinokulture 1,56%. 45% izolata bolničkog porekla i 13,6% izolata je proizvelo metalo  $\beta$  laktamaze. Najveći broj bolničkih izolata je bio osetljiv na imipenem, meropenem i doripenem (47,37%), piperacilin-tazobaktam (47%), ciprofloksacin (26,67%) i amikacin (18,75%), a izolati ambulantnog porekla na imipenem, meropenem i doripenem (65,71%), ciprofloksacin (60,53%) i piperacilin-tazobaktam (59,38%). 17,19% izolata je bilo rezistentno na sve testirane antibiotike osim na kolistin.

**ZAKLJUCAK:** *Acinetobacter sp.* je najčešće kultivisan iz briseva rana. Visok procenat, naročito izolata bolničkog porekla proizvodi metalo beta laktamaze. Izolati su najosetljiviji na imipenem, meropenem, doripenem, piperacilin-tazobaktam i ciprofloksacin.

**KLJUČNE REČI:** *Acinetobacter*, rezistencija, antibiotic



PRESENCE OF ACINETOBACTER SPP. IN PATIENT' S MATERIALS AND RESISTANCE ON  
ANTIBIOTICS

Bogdanović Tatjana <sup>1</sup>

[tatjanabogdanovic@gmail.com](mailto:tatjanabogdanovic@gmail.com)

Stanković Nedeljковиć Natasa<sup>2</sup>, Antic Zvezdana<sup>1</sup>, Milosevic Sanja<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Health Center Aleksinac, Aleksinac

<sup>2</sup> General hospital "Aleksinac", Aleksinac<sup>2</sup>

**INTRODUCTION:** *Acineobacter spp.* belongs to very widespread bacteria, which can be found everywhere in our environment, water, soil and food. Unfortunately, often in the hospital environment, it is most common in intensive care units. Colonizes the skin of healthy people, in other parts of the body less happier than the comedy. It is often the cause of hospital infections on soft tissues and urinary tract related to medical interventions. It belongs to the most resistant bacteria, it is more and more resistant to carbapenems.

**OBJECTIVE:** The objectives of the work were to determine the presence of *Acinetobacter sp.* in certain types of samples, ambulatory and hospital origin and antibiotic susceptibility testing.

**METHOD:** The tested materials are seeded on blood agar plate, Endo agar plate and enrichment medium. The identification was carried out by standard laboratory procedures. The production of the antibiogram was carried out according to the EUCAST standard on: imipenem, meropenem, doripenem, amikacin, gentamicin, tobramycin, netilmicin, levofloxacin and ciprofloxacin.

**RESULT:** The study included 20 isolates of hospital origin and 44 outpatient's, 57.58% in men and 42.42% in women. The examinees were most often between the ages of 60 and 70 (36.36%) and between 70 and 80 (24.24%). Isolates were cultured from: wound swabs 81.25% (95% hospital and 75% outpatient's), throat swabs (3.12%), sputum (9.38%), tongues (3.13%), eye and urin , 56%. 45% of isolates of hospital origin and 13.6% of the isolates produced metallic  $\beta$  lactamases. The majority of hospital isolates were susceptible to imipenem, meropenem and doripenem (47.37%), piperacillin-tazobactam (47%), ciprofloxacin (26.67%) and amikacin (18.75%), and isolates of ambulatory origin at imipenem , meropenem and doripenem (65.71%), ciprofloxacin (60.53%) and piperacillin-tazobactam (59.38%). 17.19% of the isolates were resistant to all tested antibiotics except for colistin.**Conclusion:** *Acinetobacter sp.* is most often cultivated from wound swabs. A high percentage, especially isolates of hospital origin, produces metal beta lactamase. Isolates are most sensitive to imipenem, meropenem, doripenem, piperacillin-tazobactam, and ciprofloxacin.

**KEY WORDS:** *Acinetobacter*, resistance, antibiotic



**VALIDACIJA METODE ODREĐIVANJA MIKROBIOLOŠKOG KVALITETA KARBOCISTEINA  
VALIDATION OF METHOD FOR MICROBIOLOGICAL QUALITY OF CARBOCISTEINE API**

Popovska Ilina

[ipopovska@Alkaloid.com.mk](mailto:ipopovska@Alkaloid.com.mk)

Dimitrovska Jelena, Kostovski Vladimir, Kikovska-Stojanovska Ema, Jovanovska-Klincarska  
Ivana, Ugarkovic Sonja

ALKALOID AD Skopje, R. Makedonija

**UVOD:** Karbocistein ((R) -2-amino-3 - [(karboksimetil) tio] propanojska kiselina) spada u grupu lekova pod nazivom "mukolitici". Kao aktivna supstanca ulazi uglavnom u gotovim doziranim oblicima kao što su oralni rastvori i kapsule.

**CILJ:** Razvijanje adekvatnog metoda sa ciljem određivanja mikrobiološkog kvaliteta Karbocisteina.

**METOD:** Validacija metode je sprovedena koristeći preporuke poglavlja 2.6.12 cEur.Ph. (8.0) za podobnost metode sa preporučenim test mikro-organizmima iz ATCC kolekcije: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* spp. *spizizenii*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* i *Aspergillus brasiliensis*. Metod određivanje TAMC (Ukupni broj aerobnih mikroorganizama) i TYMC (Ukupni kombinovani broj kvasaca/plesni) je metod brojenje porasta na ploči sa površinskim raspoređivanjem. Validacija metode je izvršena iz dilucije 1 u 10 (10 g karbocisteina u 90 mL Buffered Sodium Chloride Peptone Solution, pH 7.0) sa korekcijom pH sredine sa adekvatnom količinom 10 M NaOH u opsegu od pH 6 do 8 do kompletnog rastvaranja karbocisteina u puferu.

**REZULTATI:** Faktor prihvatljivosti dobijen poređenjem mikrobnog porasta iz grupe u prisustvu produkta sa kontrolnom grupom bez produkta za sve test mikroorganizme ne razlikuje se više od 2, kao i procenat "recovery" koji je preko 70% za sva upotrebljene mikroorganizme.

**ZAKLJUČAK:** Mikrobiološki kvalitet sirovina je kritičan parametar koji utiče na mikrobioloski kvalitet gotovih proizvoda. Na osnovu uspešnog testa razvijen je metod za pracenje mikrobioloskog kvaliteta karbocisteina.

**KLJUCNE RECI:** karbocistein, validacija, metod.

## VALIDATION OF METHOD FOR MICROBIOLOGICAL QUALITY OF CARBOCISTEINE API

Popovska Ilina

[ipopovska@Alkaloid.com.mk](mailto:ipopovska@Alkaloid.com.mk)

Dimitrovska Jelena, Kostovski Vladimir, Kikovska-Stojanovska Ema, Jovanovska-Klincarska  
Ivana, Ugarkovic Sonja

ALKALOID AD Skopje, Republic of . Makedonija

**INTRODUCTION:** Carbocisteine ((R)-2-amino-3-[(carboxymethyl)thio]propanoic acid) belongs to a group of medicines called “mucolytics”. As an active ingredient enters mostly in finished dosage forms such as oral solutions and capsules.

**AIM:** The aim of the article is development of suitable method for determination of the microbiological quality of Carbocisteine API.

**METHOD:** The challenge test as a part of the method validation was performed according to the recommendations of the chapter 2.6.12. from cEuropean Pharmacopoeia (8.0) with the test microorganisms from ATCC collection: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* spp. *spizizenii*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis*. The method used for determination of TAMC (Total Aerobic Microbial Count) and TYMC (Total combined yeast/moulds count) is plate count method (surface-spread method). The validation of the method was performed from dilution 1 in 10 (10 g Carbocisteine API in 90 mL Buffered sodium chloride peptone solution, pH 7.0) by adjusting the pH in the range of 6 to 8 with an adequate amount of 10 M NaOH until complete dissolving of Carbocisteine API in the buffer.

**RESULTS:** The obtained results of the microbial growth in the inoculated products have a mean count for all of the test microorganisms which is not differing by a factor greater than 2 from the controls without test material and the percent of recovery is above 70% for all of the used microorganisms.

**CONCLUSION:** Microbiological quality of the raw materials is critical parameter that has impact on the bioburden level of the finished products. The validated method is suitable for determination of microbiological quality of Carbocisteine API.

**KEY WORDS:** carbocisteine, validation, method.

**ANTI HBS TITAR KAO INDIKATOR PROCJEPLJENOSTI HEPATITIS B CIJEPVOM NA  
PODRUČJU GRADA ZAGREBA  
ANTI HBS TITRE AS INDICATOR OF VACCINATION WITH HEPATITIS B VACCINE IN THE  
CITY OF ZAGREB REGION**

Ptiček Vjekoslav

[vjekoslav.pticek@stampar.hr](mailto:vjekoslav.pticek@stampar.hr)

Knežević Jasna, Jarža-Davila Neda, Vraneš Jasmina

Nastavni zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Služba za kliničku mikrobiologiju,  
Mirogojska 16, 10000 Zagreb, Hrvatska

Virus hepatitisa B (HBV) je jedan od uzročnika akutne ili kronične upale jetre koji se najčešće prenosi zaraženom krvlju ili tjelesnim tekućinama te često ostaje neprepoznat zbog blage kliničke slike. Neliječenje dovodi do kroničnog oblika bolesti, a kod nekih pacijenata uzrokuje cirozu i rak jetre. Proširenost HBV-a je veća u zemljama nižeg socio-ekonomskog statusa, a Hrvatska spada u zemlju s intermedijarnom prevalencijom. Prevencija HBV infekcije provodi se općim i posebnim zaštitnim mjerama, a najvažnija mjera je cijepljenje. Pre-ekspozicijska profilaksa provodi se HB rekombinantnim cjepivom koje je u Hrvatsku uvedeno 1994. prvo samo za rizične skupine. Od 1999. godine rutinski se cijepi djeca u dobi od 12 godina, a od 2007. i sva dojenčad. Cilj ovog istraživanja je određivanje razlike u detekciji antiHBs protutijela (At), kao imunološkog odgovora na HBV cjepivo obzirom na dob, pri čemu prvu skupinu čine rođeni prije 1987. godine, a drugu skupinu osobe rođene 1987. godine i mlađe (12 godina u doba uvođenja cjepiva). Testiranja su provedena na imunoanalizatoru EVOLIS TwinPlus s Anti-HBs PLUS Monolisa testom. Tijekom razdoblja istraživanja od ukupno 806 uzoraka njih 466 (58%) je obrađeno na svih šest markera HBV-a, dok je kod 320 (42%) ispitanika tražen samo antiHBs. U 20 (2,5%) pacijenata detektiran je i neki drugi marker HBV infekcije izuzev antiHBs-At. Utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,01$ ) u prisutstvu antiHBs-At u testiranih osoba rođenih 1987. ili kasnije. U toj skupini 78% ispitanika bilo je pozitivno, za razliku od svega 41% pozitivnih u starijoj dobnoj skupini. U pacijenta u kojih je traženo samo određivanje antiHBs titra nije utvrđena statistički značajna razlika obzirom na dob jer je većinom bila riječ o testiranju rizične populacije koja je procijepljena nakon 1994. godine. U rizičnoj populaciji stoga je utvrđena procijepljenost od 81% u starijih i 91% u mlađih ispitanika. Dobiveni rezultati rezultat su uspješno provedene vakcinacije u Republici Hrvatskoj.

**KLJUČNE RIJEČI:** antiHBs-At, prevencija, cijepljenje

**ANTI HBS TITRE AS INDICATOR OF VACCINATION WITH HEPATITIS B VACCINE IN THE  
CITY OF ZAGREB REGION**

Ptiček Vjekoslav

[vjekoslav.pticek@stampar.hr](mailto:vjekoslav.pticek@stampar.hr)

Knežević Jasna, Jarža-Davila Neda, Vraneš Jasmina

TEACHING INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH „DR. ANDRIJA ŠTAMPAR“, Department of Clinical  
Microbiology, Zagreb, Croatia

Hepatitis B (HBV) is one of the causes of acute or chronic liver inflammation that is commonly transmitted by infected blood or body fluids and often remains unrecognized because of weak symptoms. Without treatment virus can lead to chronic illness, and in some patients can cause cirrhosis and liver cancer. Presence of HBV is higher in countries with lower socio-economic status. Croatia is country with intermediate prevalence. Essential in prevention of HBV infection is implementation of general and special protective measures. One of the most effective measures is vaccination. Pre-exposure prophylaxis in Croatia is performed with HB recombinant vaccine which is introduced in 1994, first for the high risk exposed persons only. Since 1999 children have been routinely vaccinated at age 12, and since 2007 all infants were vaccinated. Research goal was to determine difference between detection of anti-HBs antibodies (Abs) as immune responses to HBV vaccine considering the age, the older group of patients being born before 1987, and the second group was born in 1987 and later (12 years old when vaccine was introduced). Tests was performed on the EVOLIS TwinPlus immune analyser with Anti-HBs PLUS Monolisa test. During the study period total of 806 samples was tested, 466 (58%) for all six HBV markers, while 320 (42%) only for antiHBs. In 20 (2.5%) patients some other marker of HBV infection except for antiHBs-Abs was detected. Statistically significant difference ( $p < 0.01$ ) in presence of antiHBs-Abs was observed in tested persons born in 1987 or later. In this group, 78% of tested were positive, as opposed to only 41% antiHBs-Abs positive in the older age group. In patients requiring only detection of antiHBs-Abs, no statistically significant age-related difference was found because it was mostly a risk exposed population that was vaccinated after 1994. Therefore, in that group 81% antiHBs-Abs positive in older group and 91% positive in younger group was found. Observed differences are the result of successful vaccination in the Republic of Croatia.

**KEY WORDS:** antiHBs-Ab, prevention, vaccination

**SESIJA: VETERINARSKA**

**MIKROBIOLOGIJA**

**SESSION: VETERINARY**

**MICROBIOLOGY**

**PREDAVANJA PO POZIVU/**

**INVITED LECTURES**

**XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE**  
sa međunarodnim učešćem  
**MIKROMED 2018 REGIO**

**12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS**  
with international participation  
**MICROMED 2018 REGIO**

**MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA I FILOGENETSKA ANALIZA SOJEVA GOVEDEG  
HERPESVIRUSA 1 (BHV-1) IZOLOVANIH KOD GOVEDA NA TERITORIJI REPUBLIKE SRBIJE  
MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF BOVINE  
HERPESVIRUS 1 (BHV-1) STRAINS ISOLATED FROM CATTLE IN THE REPUBLIC OF SERBIA**

Nišavić Jakov <sup>1</sup>

[jakovmoni@vet.bg.ac.rs](mailto:jakovmoni@vet.bg.ac.rs)

Milić Nenad<sup>1</sup>, Radalj Andrea<sup>1</sup>, Knežević Aleksandra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

<sup>2</sup> Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**UVOD:** Govedi herpesvirus 1 (BHV-1) pripada rodu *Varicellovirus*, podfamiliji *Alphaherpesvirinae* i familiji *Herpesviridae*. Kod goveda izaziva infektivni goveđi rinotraheitis, odnosno infektivni pustulozni vulvovaginitis. Virus izaziva značajne ekonomske štete u govedarstvu.

**CILJ:** Cilj ispitivanja je bila molekularna detekcija i karakterizacija sojeva BHV-1 izolovanih kod goveda na teritoriji Republike Srbije i upoređivanje dobijenih sekvenci sa analognim sekvencama sojeva BHV-1 iz drugih geografskih regiona.

**METOD:** Ispitano je 110 uzoraka nosnih briseva poreklom od nevakcinisanih goveda iz različitih regiona u Republici Srbiji. Izolacija i identifikacija virusa BHV-1 vršena je korišćenjem ćelijske linije Vero. Metoda PCR je izvođena uz korišćenje prajmera za delove gena koji kodiraju sintezu glikoproteina B (gB) i timidin-kinaze (TK) BHV-1. Određivanje redosleda nukleotida dela TK i gB gena BHV-1 je vršena metodom direktnog sekvenciranja po Sanger-u, a dobijene nukleotidne sekvence su upoređivane sa analognim sekvencama delova prethodno navedenih gena referentnih i izolovanih sojeva BHV-1 dostupnih u banci gena (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

**REZULTAT:** Primenom metoda izolacije virusa i PCR, utvrđeno je prisustvo BHV-1 kod četiri uzorka nosnih briseva goveda. Filogenetska analiza dela gB gena je pokazala da su nukleotidne sekvence sojeva BHV-1 poreklom iz Srbije grupisane zajedno sa sojevima virusa poreklom iz Egipta i SAD. Nukleotidne sekvence dela TK gena četiri izolovana soja BHV-1 poreklom iz Srbije su međusobno imale visok stepen sličnosti i grupisane su zajedno na filogenetskom stablu, odnosno sa sojevima virusa poreklom iz SAD i Australije.

**ZAKLJUČAK:** Dobijeni rezultati su pokazali visok stepen sličnosti između sojeva BHV-1 poreklom iz Srbije i sojeva navedenog virusa poreklom iz drugih delova sveta. Pored toga, rezultati navedenih ispitivanja su ukazali na potrebu daljih opsežnijih istraživanja koja bi imala za cilj utvrđivanje prevalencije i molekularnih karakteristika sojeva BHV-1 kod goveda na teritoriji Republike Srbije.

**KLJUČNE REČI:** BHV-1, molekularna karakterizacija

**MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF BOVINE  
HERPESVIRUS 1 (BHV-1) STRAINS ISOLATED FROM CATTLE IN THE REPUBLIC OF SERBIA**

Nišavić Jakov<sup>1</sup>

[jakovmoni@vet.bg.ac.rs](mailto:jakovmoni@vet.bg.ac.rs)

Milić Nenad<sup>1</sup>, Radalj Andrea<sup>1</sup>, Knežević Aleksandra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade

<sup>2</sup>Faculty of Medicine, University of Belgrade

**INTRODUCTION:** Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is a member of the genus *Varicellovirus* of the *Alphaherpesvirinae* subfamily and *Herpesviridae* family. It is an important bovine pathogen causing infectious bovine rinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis and leads to major economic losses in the cattle industry.

**AIM:** Molecular detection and characterization of BHV-1 strains isolated from cattle originating from The Republic of Serbia and the comparison of obtained sequences with viral sequences from other geographic regions.

**METHOD:** A total of 110 nasal swabs from non-vaccinated animals raised in different regions of Serbia were examined. Vero cell line was used for virus isolation and identification. PCR was performed using primers for the parts of the BHV-1 genome coding the synthesis of glycoprotein B (gB) and thymidine kinase (TK). Partial sequencing of glycoprotein B (gB) and thymidine kinase (TK) genes of BHV-1 was performed according to Sanger sequencing method and the obtained nucleotide sequences were compared to analogous sequences of the mentioned genes available in GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

**RESULT:** BHV-1 was detected in four samples using virus isolation and PCR. The phylogenetic analysis of partial glycoprotein B (gB) gene nucleotide sequences of all four BHV-1 strains showed the clustering with BHV-1 strains isolated in Egypt and USA. Partial TK gene nucleotide sequences of Serbian BHV-1 strains were highly similar and grouped together in one branch along with BHV-1 strains from USA and Australia.

**CONCLUSION:** The obtained results showed a high level of similarity between BHV-1 strains from Serbia and other parts of the world. Moreover, these results provide a prerequisite for further detailed investigations aimed to establish the prevalence and molecular characteristics of BHV-1 strains in The Republic of Serbia.

**KEY WORDS:** BHV-1, molecular characterization

KUĆNI LJUBIMCI I ZOONOZE  
PETS AND ZOOSES

Radojičić Marina <sup>1</sup>

[marina.radojicic@vet.bg.ac.rs](mailto:marina.radojicic@vet.bg.ac.rs)

Markovic Maja <sup>1</sup>, Milic Nenad <sup>1</sup>, Kulisic Zoran <sup>1</sup>, Radalj Andrea <sup>1</sup>, Krnjaic Dejan <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Mnogi zdravstveni problemi ljudi predstavljaju direktnu posledicu intezivnog kontakta sa životinjama, pri čemu najmanje 75% novih infektivnih i pretećih infektivnih bolesti pripada zoonozama ili vektorski prenosivim bolestima. Kućni ljubimci na različite načine ljudima mogu preneti veliki broj infektivnih oboljenja. U najznačajnije zoonoze se svrstavaju infekcije izazvane virusom besnila, norovirusima, rotavirusima ili virusima influence, kao i veliki broj bakterijskih infekcija kao što su salmoneloza, kampilobakterioza, bruceloza i leptospiroza. Bakterijske zoonoze uključuju i bakterije koje se prenose ujedom ili putem ogrebotina kao što su *Pasteurella multocida* ili *Bartonella henselae*. Sve veći značaj pridaje se transmisiji meticilin rezistentnih sojeva *Staphylococcus aureus* (MRSA) između ljudi i životinja, a dokazan je i porast prevalencije ovih bakterija u izolatima poreklom iz kućnih ljubimaca. Ne treba zanemariti ni činjenicu da psi i mačke takođe mogu biti izvor gljivičnih infekcija kao što su sporotrihoza ili dermatofitoza. U najznačajnije zoonotske patogene parazitske etiologije spadaju uzročnici toksoplazmoze, đardioze, toksokarioze, onhokokoze i ehinokokoze. Pored toga, sa globalnim otopljanjem sve su rasprostranjenije i vektorski prenosive zoonoze izazvane sa: *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia felis*, *Borrelia burgdorferi*, *Dipylidium caninum*, *Leishmania infantum*, *Dirofilaria immitis* i *Dirofilaria repens* koje se putem krpelja, buva, peščanih mušica i komaraca prenose sa kućnih ljubimaca na ljude. S obzirom da veliki broj pomenutih zoonoza predstavlja pretnju po javno zdravlje, neophodno je pristupiti ovom problemu sa dve strane. Veterinari moraju upoznati vlasnike sa metodama prevencije infektivnih bolesti kućnih ljubimaca, a koje podrazumevaju odgovorno vlasništvo. S druge strane, lekari moraju imati u vidu mogućnost pojave zoonoza i savetovati pacijente u cilju sprečavanja infekcije ljudi. Primenom koncepta jedinstvenog zdravlja neophodno je uspostavljanje bliže saradnje lekara i veterinarara, a jačanjem epidemioloških i laboratorijskih ispitivanja moguće je utvrđivanje prisustva, raširenosti i rizika od pojave zoonoza ljudi poreklom od kućnih ljubimaca, a zajedničkim radom mogu se razviti i primeniti održive i efektivne mere zaštite zdravlja ljudi i životinja.

**KLJUČNE REČI:** kućni ljubimci, zoonoze, vektori, prevencija



## PETS AND ZOOSESES

Radojičić Marina <sup>1</sup>

[marina.radojicic@vet.bg.ac.rs](mailto:marina.radojicic@vet.bg.ac.rs)

Markovic Maja <sup>1</sup>, Milic Nenad <sup>1</sup>, Kulisic Zoran <sup>1</sup>, Radalj Andrea <sup>1</sup>, Krnjaic Dejan <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade

Many emerging health issues are linked to increasing contact between humans and animals, and it is estimated that at least 75% of emerging and re-emerging diseases are either zoonotic or vector-borne. Pets may transmit a variety of infectious diseases to humans. Viral diseases caused by rabies virus, noroviruses, rotaviruses or influenza viruses, as well as numerous bacterial infections such as salmonellosis, campylobacteriosis, brucellosis and leptospirosis present some of the most significant zoonoses linked to household pets. Bacterial zoonoses also include bacteria transmitted by bites or scratches like *Pasteurella multocida* or *Bartonella henselae*. More attention is paid to the transmission of methicilin resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA) between humans and animals, since the prevalence of these isolates from samples of animal origin is on the rise. Moreover, the fact that dogs and cats can be sources of serious fungal infections such as sporotrichosis or dermatophytosis shouldn't be overseen. Most important zoonotic parasites are the causative agents of toxoplasmosis, giardiasis, toxocariasis, onchocercosis and echinococcosis. One of the apparent consequences of global warming is the increased prevalence of vector borne zoonotic diseases caused by: *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia felis*, *Borrelia burgdorferi*, *Dipylidium caninum*, *Leishmania infantum*, *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* transmitted from animals to humans by ticks, fleas, phlebotomine sand flies and mosquitoes. Considering that many of the mentioned zoonoses pose a serious risk to public health, it is essential to address this problem from two sides. Veterinarians must instruct the owners on necessary preventive measures implying responsible pet ownership. On the other hand, physicians must maintain awareness of pet infectious diseases and counsel patients to prevent human infection. By strengthening epidemiologic and laboratory investigations that assess the role of environmental influences, this partnership can help develop and apply sustainable and effective community health interventions.

**KEY WORDS:** pets, zoonoses, vectors, prevention

**OCENA I RANGIRANJE RIZIKA OD MIKROBIOLOŠKIH HAZARDA U KONTEKSTU REVIZIJE  
INSPEKCIJE MESA  
RISK ASSESSMENT AND RANKING OF MICROBIOLOGICAL HAZARDS IN THE CONTEXT OF  
MEAT INSPECTION REVISION**

Blagojević Bojan

[blagojevic.bojan@yahoo.com](mailto:blagojevic.bojan@yahoo.com)

Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman veterinarske medicine, Novi Sad

**UVOD:** Zvanična veterinarska inspekcija mesa pati od mnogih mana – najznačajnija je što danas nije zasnovana na oceni rizika u pogledu zaštite javnog zdravlja od alimentarnih bolesti. Stoga je u toku revizija inspekcije mesa u Evropi.

**CILJ:** Veliki napori su u skorije vreme uloženi u ocenu i rangiranje rizika od mikrobioloških hazarda sa ciljem prioritizacije hazarda na koje budući sistem inspekcije i osiguranja bezbednosti mesa treba da bude fokusiran.

**METOD:** Metodi variraju od kvalitativnih, preko semi-kvantitativnih do potpuno kvantitativnih. Ulazni podaci za ocenu rizika su uglavnom vezani za incidenciju bolesti ljudi izazvane identifikovanim hazardom, težinu posledica date bolesti, doprinos određene vrste mesa ukupnim slučajevima bolesti izazvanih datim hazardom, prevalenciju datog hazarda na ohlađenim trupovima u klanici, kao i za uticaj procedura aktuelne inspekcije mesa na kontrolu identifikovanog hazarda.

**REZULTAT:** Prema ocenama i rangiranjima rizika koje je sprovedla Evropska agencija za bezbednost hrane, prioritetni biološki hazardi za javno zdravlje koji treba da budu predmet budućih veterinarskih kontrola bezbednosti mesa u Evropi su: *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Toxoplasma gondii* i *Trichinella* spp. u mesu svinja; *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* i ESBL-AmpC gen-noseće bakterije u mesu živine; patogene *Escherichia coli* i *S. enterica* u mesu goveda; patogene *E. coli* i *T. gondii* mesu ovaca i koza; *Trichinella* u mesu konja; *T. gondii* u mesu farmskih jelena; i *Salmonella* spp. i *T. gondii* u mesu farmskih divljih svinja. Slični rezultati su dobijeni i rangiranjima rizika koje je sprovedlo nekoliko različitih istraživačkih grupa u Evropi.

**ZAKLJUČAK:** Identifikacija hazarda i ocena i rangiranje rizika treba da se redovno revidiraju i sprovode na regionalnom nivou kada novi podaci postanu dostupni jer novi hazardi mogu da se pojave, ali i zbog mogućnosti da hazardi koji su trenutno ocenjeni kao nisko-prioritetni postanu relevantni u budućnosti ili u određenim regionima.

**KLJUČNE REČI:** ocena rizika, inspekcija mesa, biohazard.

**RISK ASSESSMENT AND RANKING OF MICROBIOLOGICAL HAZARDS IN THE CONTEXT OF  
MEAT INSPECTION REVISION**

Blagojević Bojan

[blagojevic.bojan@yahoo.com](mailto:blagojevic.bojan@yahoo.com)

University in Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of Veterinary Medicine

**INTRODUCTION:** Official veterinary meat inspection suffers many drawbacks – the main one is that it is nowadays not risk-based in respect of public health protection from food-borne diseases. Therefore, meat inspection revision is ongoing in Europe.

**AIM:** Significant efforts have been recently invested into risk assessment and ranking of microbiological hazards with an aim of prioritisation of hazards that should be targeted by future meat inspection and meat safety assurance system.

**METHOD:** Methods vary from qualitative, through semi-quantitative, to fully quantitative methods. Inputs for risk assessment mostly include data on incidence of disease in humans due to the identified hazard, severity of the disease, source attribution, prevalence of the hazard on chilled carcasses in abattoirs, as well as on the impact of current meat inspection procedures on control of the identified hazard.

**RESULT:** According to the risk assessments and rankings performed by the European Food Safety Authority, prioritised biological public health hazards for future veterinary meat safety controls in Europe are *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp. in pig meat; *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and ESBL-AmpC gene-carrying bacteria in poultry meat; pathogenic *Escherichia coli* and *S. enterica* in bovine meat; pathogenic *E. coli* and *T. gondii* in meat of sheep and goats; *Trichinella* in horse meat; *T. gondii* in farmed deer meat; and *Salmonella* spp. and *T. gondii* in farmed wild boar meat. Similar results were obtained through risk rankings performed by several different research groups in Europe.

**CONCLUSION:** Hazard identification and risk assessment and ranking should be regularly revisited and performed at regional level when new data become available as new hazards might emerge and since hazards that presently are of low-priority might become more relevant in the future or in some regions.

**KEYWORDS:** risk assessment, meat inspection, biohazards.

**FENOTIPIZACIJA, GENOTIPIZACIJA I OSETLJIVOST NA ANTIMIKROBNE LEKOVE  
SALMONELLA SPP. IZOLOVANIH SA TRUPOVA ZAKLANIH SVINJA SA ASPEKTA  
BEZBEDNOSTI HRANE**

Kureljušić Jasna

Naučni institut za veterinarstvo Srbije

Kontaminacija svinjskog mesa može nastati u različitim fazama, počev od same farme pa potom u klanici tokom proizvodnje. Svi činioци u proizvodnji bi trebalo da koriste dobru proizvodnu praksu kako bi se smanjio potencijalni rizik za potrošače. Ukoliko se fokus interesovanja usmeri samo ka klanicama i liniji proizvodnje može se desiti da interventne mere koje se tu preduzimaju ne budu dovoljne za prevazilaženje kontaminacije salmonelom. Isto tako, nepoštovanje dobre proizvodne prakse može rezultirati povećanom kontaminacijom, iako su na farmi preduzimate sve preventivne mere i dobra proizvodna praksa. Iz tih razloga se celokupan proces proizvodnje mora posmatrati kao jedan jedinstveni sistem čiji je cilj dobijanje kvalitetnog i zdravstveno bezbednog mesa sa najnižim mogućim hazardom za potrošača.

Cilj ovog rada je da se utvrdi zastupljenost salmonela u uzorcima briseva sa trupova svinja u različitim fazama proizvodnje i sadržaja ileuma, izvrši njihova fenotipizacija, genotipizacija i utvrdi osetljivost na antimikrobne lekove.

Najčešće izolovani serotip bio je *S. Derby* (90,74%), potom *S. Infantis* (5,56%) i *S. Typhimurium* (3,7%). *S. Derby* je izolovana iz briseva posle omamljivanja, nakon obrade i iz sadržaja ileuma, dok je *S. Infantis* bila utvrđena samo u uzorcima briseva posle omamljivanja. *S. Typhimurium* je bila izolovana samo iz sadržaja ileuma kod dve svinje (3,7%).

Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih serotipova salmonela na antimikrobne lekove disk difuzionom metodom pokazali su da su ispitivani izolati salmonela bili osetljivi na pet antimikrobnih lekova (ceftazidim, ciprofloksacin, sulfametoksazol-trimetoprim, meropenem i gentamicin), a rezistentni na tetraciklin. Rezistencija se kretala od 7,41% za ampicilin i hloramfenikol, do 12,96% za nalidiksinsku kiselinu.

Ispitivanje osetljivosti izolovanih salmonela na antimikrobne lekove pomoću E-test traka obuhvatilo je ukupno 30 izolata *Salmonella* spp., od čega 23 izolata *S. Derby*, 3 izolata *S. Infantis* i 4 izolata *S. Typhimurium*. Svi ispitani izolati salmonela su osetljivi na četiri antimikrobna leka (ceftazidim, trimetoprim, meropenem i gentamicin), a rezistentni na tetraciklin. Rezistencija se kretala od 10% za ampicilin, 14,4% za hloramfenikol, 20% za ciprofloksacin i do 23,3% za nalidiksinsku kiselinu.

Genotipizacijom je bilo obuhvađeno 20 izolata *S. Derby*, tri izolata *S. Infantis* i četiri izolata *S. Typhimurium*. Kod *S. Derby* su utvrđena 2 PFGE profila međusobne sličnosti od 98%. Prvi profil SDERXB0001, kome su pripadali izolati 13, 31, 46, 55, 65, 79, 111, 116, 125, 137, 142, 151, 155, 159, 164, 168, 171, 178, i drugi profil SDERXB0002 kome su pripadali izolati 4 i 10. Izolati unutar ova dva profila su imali 100% međusobne sličnosti.

Kod *S. Infantis* utvrđen je jedan profil, SINFXB0001 kome su pripadala sva tri izolata (10,22,43). Kod *S. Typhimurium* je utvrđen takođe samo jedan profil STYPXB0001 kome su pripadala sva četiri izolata.

**SESIJA: PRIMENJENA  
MIKROBIOLOGIJA U  
BIOTEHNOLOGIJI  
SESSION: APPLIED MICROBIOLOGY  
IN BIOTECHNOLOGY**

**PREDAVANJA PO POZIVU/  
INVITED LECTURES**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
sa međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO

## BIOLOŠKI POTENCIJAL ODABRANIH VRSTA MAKROMICETA OBOGAĆENIH SELENOM

Pantić Milena

Matijašević Danka, Miletić Dunja, Sknepnek Aleksandra, Nikšić Miomir

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Katedra za tehnološku mikrobiologiju, Beograd, Srbija

**UVOD:** Industrijski gajene gljive imaju veoma izraženu nutritivnu vrednost i predstavljaju bogat izvor esencijalnih aminokiselina, vitamina, mineralnih materija, ugljenih hidrata, proteina kao i važnih sekundarnih metabolita. Tokom višegodišnjih istraživanja dokazano je da gljiva može uspešno usvojiti selen iz čvrstog supstrata ili tečne podloge u koncentraciji koja može da zadovolji dnevne potrebe čoveka. Kapacitet usvojivosti selena zavisi od vrste gljive, hranljive podloge, ekoloških parametara kao i od oblika i koncentracije u kom je selen dodat u podlogu. Kako gljive sadrže brojne bioaktivne komponente u vidu primarnih i sekundarnih metabolita, dodatno selenom obogaćene pečurke moguće je koristiti u svežem i sušenom stanju ili kao potencijalni dijetetski suplement. Ispitana je biološka aktivnost selenom obogaćenih gljiva *Coriolus versicolor* i *Pleurotus ostreatus*. Kao izvori selena upotrebljena su organska jedinjenja u obliku selenskog kvasca i selenouree, kao i Se(IV)- i Se(VI)-modifikovani zeoliti.

**MATERIJAL I METODE:** Od dobijenih selenom obogaćenih plodonosnih tela i micelijuma pripremljeni su metanolni ili vreli vodeni polisaharidni ekstrakti, a zatim je izvršena analiza njihovih antioksidativnih i antimikrobnih svojstava. Za određivanje antioksidativnog potencijala u *in vitro* uslovima, korišćene su tri različite metode. Uzorci su poređeni na osnovu sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala, sposobnosti heliranja Fe (II) jona i redukcione sposobnosti. Antimikrobni potencijal određen je na osnovu mikrodilucione metode i zatim potvrđen primenom elektronske mikroskopije.

**REZULTATI I DISKUSIJA:** U istraživanjima su korišćeni metanolni ekstrakti dobijeni iz plodonosnog tela gljive *C. versicolor* sa sadržajem selena 93.39 i 97.85 µg/g suve mase kada je dodavana selenourea, odnosno selenski kvasac. Submerznim gajenjem gljive usvojene su znatno više koncentracije selena, 2084.00 i 1200 µg/g suve biomase pri dodatku selenskog kvasca i selenouree. Kada je selen dodat u supstrat u obliku Se(IV)- i Se(VI)-modifikovanih zeolita, njegov sadržaj u plodonosnim telima *C. versicolor* je bio oko 110.8 µg/g i 105.6 µg/g, a u *P. ostreatus* 81.2 i 59.5 µg/g računato na suhu masu uzorka. Komercijalni soj gljive *Pleurotus ostreatus* obogaćene selenom dodatkom selenskog kvasca sadržao je selen u koncentraciji 137.8 µg/g suve mase plodonosnog tela i korišćen je za ispitivanje aktivnosti vrelih polisaharidnih ekstrakata. Hemijskom karakterizacijom ekstrakata utvrđeno je da je sadržaj ukupnih ugljenih hidrata, naročito β-glukana, ukupnih proteina, flavonoida i fenola u gljivama obogaćenim selenom bio viši u odnosu na kontrolu kod većine uzoraka. Značajan procenat selena (do oko 30%) u odnosu na ukupan selen usvojen je u obliku selenometionina.

a. Antimikrobni potencijal ekstrakata

Svi ispitivani ekstrakti sa i bez povećanog sadržaja selena pokazali su jače antimikrobno delovanje na Gram pozitivne u odnosu na Gram negativne bakterije. Metanolni ekstrakti dobijeni iz gljiva obogaćenih zeolitnim selenom delovali su mikrobicidno na *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* i *Rhodococcus equi*. Za metanolni ekstrakt izolovan iz gljive *C. versicolor*, odgajene na supstratu sa dodatkom selena u vidu Se(VI)-modifikovanog zeolita utvrđeno je baktericidno dejstvo na 15 od 19 testiranih bakterija. Metanolni ekstrakti plodonosnih tela gljive *C. versicolor* obogaćene selenouream i selenskim kvascem ispoljili su mikrobicidno dejstvo na sve testirane Gram negativne bakterije, osim na *Escherichia coli* H7:O157. Na ovu bakteriju uspešno su delovali metanolni ekstrakti dobijeni iz micelijuma gljive gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj selenouream. SEM (skenirajuća elektronska mikroskopija) i TEM (transmisiona elektronska mikroskopija) mikrografije ćelija *Staphylococcus aureus* tretiranih metanolnim ekstraktima ukazuju da je došlo do deformisanja bakterijske ćelije, oštećenja citoplazmatične membrane i gubitka njene propustljivosti. Posledica dejstva ekstrakata na ćelije *Salmonella* Enteritidis je pucanje ćelijskog

zida i gubitak ćelijskog materijala. Baktericidna aktivnost vrelih vodenih polisaharidnih ekstrakata iz *P. ostreatus* obogaćene seleom iz kvasca bila je najizraženija protiv Gram pozitivne bakterije *S. aureus*, dok su među Gram negativnim bakterijama, najosetljivije bile *Sal. Enteritidis* i *Pseudomonas aeruginosa*.

b. Antioksidativni potencijal ekstrakata

Selenom obogaćeni ekstrakti su pokazali poboljšana antioksidativna svojstva. Utvrđeno je da se kod skoro svih ekstrakata antioksidativni potencijal povećavao sa povećanjem koncentracije. Metanolni ekstrakt plodonosnog tela gljive *C. versicolor* obogaćene selenoureom vezivao je čak 99.42 % slobodnih DPPH radikala. Sličnu efikasnost su imali i ekstrakti dobijeni iz micelijuma. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji (2,5 mg ml<sup>-1</sup>) ekstrakti izolovani iz gljive *P. ostreatus* obogaćene SeIV- i SeVI-zeolitima vezivali su 62,5% odnosno 65,7% DPPH radikala. Ova aktivnost za gljivu *C. versicolor* iznosila je oko 92%. Sposobnost vezivanja radikala vrelih vodenih polisaharidnih ekstrakata gljive *P. ostreatus* obogaćene selenom iz kvasca dostizala je vrednost od 70.3%. Utvrđene EC<sub>50</sub> vrednosti za sve ispitivane ekstrakte bile su niske, ispod 1 mg/ml ukazujući na izraženu sposobnost hvatanja DPPH radikala. Njihove aktivnosti bile su izraženije od aktivnosti standarda (+) - katehina i  $\alpha$  - tokoferola.

Svi ekstrakti dobijeni iz gljive *P. ostreatus* obogaćene zeolitnim selenom su pokazali dobru redukciju sposobnost (EC<sub>50</sub> < 1,8 mg/ml). Dobijene EC<sub>50</sub> vrednosti za ekstrakte gljive *C. versicolor* su se kretale u opsegu od 1,86 – 2,90 mg/ml. Svi metanolni ekstrakti dobijeni iz ove dve gljive obogaćene organskim selenom pokazale su jaču aktivnost u odnosu na kontrolne uzorke bez povećanog sadržaja selena. Pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji od 20 mg/ml, aktivnost je bila bolja u odnosu na standard askorbinske kiseline. Ekstrakti plodonosnih tela su pokazali nešto nižu sposobnost redukcije (Fe<sup>3+</sup>) jona u odnosu na ekstrakte micelijuma. EC<sub>50</sub> vrednost za vrele vodene ekstrakte dobijene iz bukovače bila je visoka, >20 mg/ml.

Metanolni ekstrakti dobijeni iz plodonosnih tela gljive *C. versicolor* pokazali su izrazitu sposobnost heliranja Fe<sup>2+</sup> jona, značajno bolju u odnosu na standard limunske kiseline. Uzorak obogaćen selenom iz kvasca pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 10 mg/ml helirao je oko 89.19 % jona gvožđa. Suprotno, najlošiji pri najvišoj testiranoj koncentraciji pokazao se ekstrakt micelijuma obogaćenog selenskim kvascem. Kod ekstrakata iz gljiva obogaćenih selenom u vidu zeolita, pri koncentraciji od 2,5-5 mg/ml helirajuća aktivnost je bila veća do 28% u odnosu na kontrolne uzorke bez povećanogsadržaja selena.

Regresiona analiza je pokazala da je antioksidativni potencijal, u zavisnosti od vrste ekstrakta i primenjene metode, u korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola i flavonoida, kao i sa sadržajem ukupnih polisaharida i  $\beta$ -glukana kao glavnih nosioca aktivnosti. Istom analizom je kod metode sposobnosti heliranja jona gvožđa ustanovljena i visoka korelacija sa sadržajem ukupnog selena.

c. Uticaj selena na aktivnost enzima antioksidativnog sistema zaštite

U svežim plodonosnim telima gljiva *P. ostreatus* i *C. versicolor* obogaćenih selenom iz Se(IV)- i Se(VI)-modifikovanog zeolita ispitan je uticaj selena na aktivnost enzima antioksidativnog sistema zaštite. Dobijeni rezultati za obe gljive ukazuju na jaču aktivnost enzima superoksid-dismutaze kod selenom obogaćenih gljiva u odnosu na kontrolne neobogaćene uzorke. Kod gljive *P. ostreatus* ustanovljena je i jača aktivnost glutation-peroksidaze, dok je gljiva *C. versicolor* ukazala na jaču aktivnost katalaze pod uticajem povećane koncentracije selena u plodonosnim telima.

**ZAKLJUČAK:** Dobijeni rezultati ukazuju na to da vreli vodeni i metanolni ekstrakti dobijeni iz selenom bogaćenih gljiva generalno imaju poboljšanu antibakterijsku i antioksidativnu aktivnost. Ekstrakti gljiva se kao smeše različitih jedinjenja mogu smatrati potencijalnim agensom za sprečavanje rasta mikroorganizama poreklom iz hrane. Takođe, u prehrambenoj industriji se mogu koristiti kao zamena sintetičkih antioksidanasa. Zahvaljujući dobrim biološkim svojstvima, gljive obogaćene selenom mogu biti iskorišćene u terapeutske svrhe za dobijanje dijetetskih suplemenata. Enzimskim ispitivanjem utvrđeno je da obogaćene gljive duži vremenski period zadržavaju kvalitet, aromu i boju.

**REFERENCE:**

1. Duvnjak D. (2017). Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Srbija.
2. Duvnjak D, Pantić M, Pavlović V, Nedović V, Lević S, Matijašević D, Sknepnek A, Nikšić M. (2016). Advances in batch culture fermented *Coriolus versicolor* medicinal mushroom for the production of antibacterial compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies (IFSET)* 34: 1-8.
3. Kozarski M, Klaus A, Nikšić M, Jakovljević D, Helsper JPF, van Griensven LJLD. (2011). Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry* 129: 1667–1675.
4. Matijašević D. (2017). Uticaj Se(IV)- i Se(VI)- modifikovanog zeolita na antioksidativno i antimikrobno dejstvo gljiva *Pleurotus ostreatus* i *Coriolus versicolor*. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Srbija.
5. Matijašević D, Pantić M, Rašković B, Pavlović V, Duvnjak D, Sknepnek A, Nikšić M. (2016). The antibacterial activity of *Coriolus versicolor* methanol extract and its effect on ultrastructural changes of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Enteritidis*. *Frontiers in Microbiology* 7 (online).
6. Savić M. (2014). Akumulacija i transformacija selena u industrijskim gljivama. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Srbija.
7. Savić M, Klimaszewska M, Bamburowicz-Klimkowska M, Suchocki P, Nikšić M, Szutowski M, Wroczynski P, Turlo J. (2016). A Search for the Optimum Selenium Source to Obtain Mushroom-Derived Chemopreventive Preparations. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 18: 279-289.



**DISTRIBUCIJA UGLJOVODONIČNIH BIOMARKERA TOKOM MIKROBIOLOŠKE  
BIODEGRADACIJE NAFTNIH ZAGAĐUJUĆIH SUPSTANCI  
DISTRIBUTION OF HYDROCARBON BIOMARKERS DURING MICROBIOLOGICAL  
BIODEGRADATION OF OIL**

Ilić V. Mila

Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Zagađenje životne sredine sirovom naftom i njenim derivatima posledica je ljudskog delovanja, odnosno posledica vađenja, transporta, prerade i korišćenja nafte. Biodegradacija je uklanjanje štetnih supstanci iz zemljišta, površinskih i podzemnih voda pomoću mikroorganizama i predstavlja savremeni trend za sanaciju ovakvih zagađenja. Biomarkeri predstavljaju kompleksna jedinjenja koja se nalaze u nafti, a koja su po strukturi identična ili vrlo bliska jedinjenjima koja postoje u biosferi. Koriste se kao parametri starosti sirovih nafti, ali i kao parametri biodegradacionih procesa jer pokazuju veću otpornost na razgradnju usled dejstva mikroorganizama. Gasnohromatografska-masenospektrometrijska analiza se koristi u proceni sastava i distribucije ugljovodoničnih jedinjenja nafti i njenih derivata. Praćenjem određenih jonskih fragmentograma, na početku i kraju experimentalnog postupka mogu se, sa sigurnošću, dobiti rezultati mikrobiološke degradacije naftnih zagađujućih supstanci.

Biomarkeri, biodegradacija

**DISTRIBUTION OF HYDROCARBON BIOMARKERS DURING MICROBIOLOGICAL  
BIODEGRADATION OF OIL**

Ilić V. Mila

Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

The pollution of the environment by crude oil and its derivatives is a consequence of human activity, that is, the consequence of the extraction, transport, processing and use of oil. Biodegradation is process of removing harmful substances from the soil, surface and groundwater by microorganisms and represents a perfect trend for remediation of such pollution. Biomarkers are complex compounds found in petroleum, which are identical in structure or very close to the compounds existing in the biosphere. They are used as parameters of maturity of crude oil, but also as parameters of biodegradation processes because they show greater resistance to degradation due to the action of microorganisms. Gas chromatographic-masspectrometric analysis is used in the estimation of the composition and distribution of hydrocarbon compounds of petroleum and its derivatives. By monitoring certain ionic fragmentograms, at the beginning and end of the experimental procedure, the results of microbiological degradation of petroleum pollutants can be safely obtained.

Biomarkers, biodegradation

**KAKO DO MIKROORGANIZAMA SA NAJVEĆIM POTENCIJALOM ZA BIOREMEDIJACIJU  
POLICIKLIČNIH AROMATIČNIH UGLJOVODONIKA?  
HOW TO ASSESS THE BIOREMEDIATION POTENTIAL OF MICROORGANISMS FOR  
POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS?**

Milić Jelena  
[jelenamilic@chem.bg.ac.rs](mailto:jelenamilic@chem.bg.ac.rs)

Institut za hemiju tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu

Ubrzani razvoj tehnoloških procesa i industrijalizacija doveli su do iscrpljivanja prirodnih resursa i degradacije životne sredine. Dalji privredni rast u skladu sa današnjim potrebama čovečanstva mora biti usmeren ka poštovanju principa i načela koncepta održivog razvoja što podrazumeva primenu savremenih tehnologija uz čuvanje prirodnih dobara i životne sredine. Od izuzetne važnosti je čišćenje zagađenja koja su proistekla iz korišćenja starih i neadekvatnih tehnologija. Jedan od ciljeva održivog razvoja predstavlja korišćenje „prirodnog kapitala“ - tačnije pojava u prirodi koje je potrebno implementirati u razvoj savremenih tehnologija. U skladu sa tim, jedna od najboljih tehnika za čišćenje kontaminiranih lokacija od naftnih zagađujućih supstanci je postupak bioremedijacije koji koristi prirodne mehanizme, odnosno metaboličke putanje za uklanjanje štetnih supstanci iz životne sredine.

Imajući u vidu da se kontaminirane lokacije nalaze u sredinama sa različitim karakteristikama kao što su vrsta i koncentracija zagađujuće supstance, matriks (voda, vazduh, sediment, zemljište), klimatski uslovi, vremenska izloženost zagađujućoj supstanci – a sve su to i parametri koji mogu uticati na rast mikroorganizama, izbor katabolički kometnenthin mikroorganizama za svako pojedinačno zagađenje jedan od ključnih koraka ka kreiranju strategije bioremedijacionog čišćenja zagađene sredine. U ovom radu će biti predstavljene najbolje strategije za izbor mikroorganizama sa najvećim potencijalom za bioremedijaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika korišćenjem metoda izolovanja i selekcije najpotententnijih sojeva uz testiranje rasta na različitim ugljovodoničnim supstratima i to merenjem enzimske aktivnosti, bakterijskog rasta, ali i brzim metodama koje omogućavaju pouzadane rezultate u kratkom vremenskom periodu. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da je pristup koji kombinuje tri metode najefektniji za odedivanje bioremedijacionog potencijala mikroorganizama.

**HOW TO ASSESS THE BIOREMEDIATION POTENTIAL OF MICROORGANISMS FOR  
POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS?**

Milić Jelena

[jelenamilic@chem.bg.ac.rs](mailto:jelenamilic@chem.bg.ac.rs)

Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, University of Belgrade

Rapid development of technological processes and industrialization led to the natural resource depletion and environmental degradation. Further economic growth should follow human development needs, but must be directed towards respecting the concept of sustainable development, which implies the application of modern technologies with the preservation of natural resources and the environment. It is extremely important to clean the pollution that resulted from the use of old and inadequate technologies. One of the goals of sustainable development is the use of "natural capital" - a natural phenomena that needs to be implemented in new technologies. Accordingly, one of the best techniques for cleaning contaminated sites from petroleum pollutants is a bioremediation process that uses natural mechanisms such as metabolic pathways to remove harmful substances from the environment. Bearing in mind that contaminated sites are located in environments with different characteristics such as the type and concentration of the pollutant, matrix (water, air, sediment, soil), climatic conditions, weather conditions, exposure to pollutants - these are all parameters that can affect growth of microorganisms, and choosing an catabolically competent microorganisms for each individual pollution is one of the key steps towards creating a bioremediation pollution strategy for the polluted environment. In this paper, the best strategies for selecting microorganisms with the highest potential for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons will be presented using the methods such as isolation and selection of the most potent strains, the growth tests on various hydrocarbon substrates, enzymatic activity, bacterial growth, as well as rapid qualitative methods that enable the reliable results in a short period of time. According to obtained results it can be concluded that combining three of different methods was most effective aprooach in determination of bioremediation potential for PAHs.

**BIOAKTIVNI PRINCIPI MAKROGLJIVA – PERSPEKTIVE U ALTERNATIVNOJ TERAPIJI**  
**BIOACTIVE PRINCIPLES OF MACROFUNGI – PERSPECTIVES IN ALTERNATIVE THERAPY**

Karaman Maja

[maja.karaman@dbe.uns.ac.rs](mailto:maja.karaman@dbe.uns.ac.rs), [maja.karaman@gmail.com](mailto:maja.karaman@gmail.com)

Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju,  
Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Srbija

**UVOD:** Gljive su bile i ostale predmet interesovanja i obožavanja ljudske civilizacije, a mnogobrojni zapisi o njihovom lekovitom dejstvu potiču još od davnina. Makrogljive su vidljive golim okom, taksonomski pripadnici razdela ph. Basidiomycota i ph. Ascomycota (oko 20,000 vrsta), široko raspostranjene, sa mesnatim i jestivim plodnim telima, hipogeičnim ili epigeičnim. Bioaktivni metaboliti gljiva su pretežno sekundarni metaboliti raznovrsnih hemijskih struktura, obično male-molekulske mase, koji deluju u veoma niskim koncentracijama, a potiču iz tri različita izvora: plodnih tela, micelije i ekstracelularnih medijuma potopljenih kultura.

**CILJ:** Cilj rada je bio da se utvrde bioaktivni potencijali, njihova antimikrobna aktivnost, antioksidantna i antiradikalska aktivnost i inhibicija enzima AChE, kao i hemijski sastav odabranih autohtonih vrsta makrogljiva (*Ganoderma applanatum*, *Amanita strobiliformis*, *Stereum hirsutum*, *Stereum subtomentosum*, *Flammulina velutipes*, *Bjerkandera adusta*, *Pleurocybella porrigens* i *Coprinus comatus*) sa planinskih područja Srbije (Tara, Stara planina, Kopaonik, Fruška gora), radi eventualne primene u alternativnoj terapiji infekcija i Alchajmerove bolesti.

**METOD:** Fenolni profil ekstrakata (vodenih, metanolnih i etanolnih) je utvđen primenom HPLC/MS-MS, dok je ukupni sadržaj polifenola, FRAP i antiradikalska aktivnost (ABTS, DPPH, NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikala) utvrđena spektrofotometrijskim metodama i polarografskom metodom HPMC, a anti-Asc radikalska aktivnost primenom EPR spektroskopije.

**REZULTAT:** Svi ekstrakti su pokazali antimikrobnu, antioksidantnu (FRAP, HPMC) i antiradikalsku (DPPH, anti-Asc) aktivnost. Vrsta *S. hirsutum* je bila najaktivnija (47,50%), a *A. strobiliformis* najslabija u anti-Asc radikalskoj aktivnosti (16,30%). Hinska kiselina, amentoflavon i protokatehinska kiselina mogu biti jedinjenja odgovorna za tu bioaktivnost. Svi ekstrakti pokazali su AChE inhibitorne aktivnosti, a *S. subtomentosum* je bio najaktivniji. HPLC-MS/MS analiza fenolnog profila ekstrakta detektovala je prisustvo galne kiseline i eskuletina. Potvrđena je i AChE inhibitorna aktivnost ekstrakata *C. comatus* iz potopljenih kultura.

**ZAKLJUČAK:** Sekundarni metaboliti analiziranih vrsta mogu igrati značajnu ulogu kao prirodni izvori medicinski značajnih jedinjenja, uključujući i AChE inhibitore. Hemijski sastav vrsta gljiva značajno zavisi od izolata i uslova staništa.

**KLJUČNE REČI:** makrogljive, bioaktivnost, fenoli

## BIOACTIVE PRINCIPLES OF MACROFUNGI – PERSPECTIVES IN ALTERNATIVE THERAPY

Karaman Maja

[maja.karaman@dbe.uns.ac.rs](mailto:maja.karaman@dbe.uns.ac.rs), [maja.karaman@gmail.com](mailto:maja.karaman@gmail.com)

University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, Trg Dositeja  
Obradovića 2, Novi Sad, Serbia

**INTRODUCTION:** Fungi were and remain an object of interest and worship of human civilization, while numerous records of their medicinal effect have come from ancient times. Macrofungi are visible to the naked eye, taxonomically are members of ph. Basidiomycota and ph. Ascomycota (about 20,000 species), widely distributed, with meaty and edible fruiting bodies, hypogeous or epigeic. Bioactive metabolites of fungi are predominantly secondary metabolites of various chemical structures, usually of small molecular weights, acting at very low concentrations, and come from three different sources: fruiting bodies, mycelium and extracellular media of submerged cultures.

**THE AIM.** The aim of this study was to determine the bioactive potentials, their antimicrobial activity, the antioxidant and antiradical activity and the inhibition of AChE enzymes, and the chemical composition of selected autochthonous macrofungal species (*Ganoderma applanatum*, *Amanita strobiliformis*, *Stereum hirsutum*, *Stereum subtomentosum*, *Flammulina velutipes*, *Bjerkandera adusta*, *Pleurocybella porrigens* and *Coprinus comatus*) originated from the mountainous regions of Serbia (Tara, Stara Planina, Kopaonik, Fruška gora), for possible application in alternative therapy of infections and Alzheimer's disease.

**METHOD:** The phenolic profile of the extracts (aqueous, methanolic and ethanolic) was determined using HPLC/MS-MS, while the total content of polyphenols, FRAP and antiradical activity (ABTS, DPPH, NO, O<sub>2</sub>- radicals) was determined by spectrophotometric methods and the polarographic method HPMC, and anti-Asc radical activity using EPR spectroscopy.

**RESULTS:** All extracts showed antimicrobial, antioxidant (FRAP, HPMC) and antiradical (DPPH, anti-Asc) activity. The species *S. hirsutum* was the most active (47.50%), and *A. strobiliformis* was the weakest in anti-Asc radical activity (16.30%). Quinic acid, amentoflavone and proto-catechinic acid may be the compounds responsible for this bioactivity. All extracts showed AChE inhibitory activity and *S. subtomentosum* was the most active. HPLC-MS/MS analysis of the phenolic profile of the extract detected the presence of gallic acid and esculetin. The AChE inhibitory activity of *C. comatus* extracts from submerged cultures was also confirmed.

**Conclusion.** Secondary metabolites of the species analyzed can play a significant role as natural sources of medically important compounds, including AChE inhibitors. The chemical composition of mushroom species depends significantly on the isolates and habitat conditions.

**KEYWORDS:** macrofungi, bioactivity, phenols

**SESIJA: BIOTEHNOLOGIJA**

**SESSION: BIOTECHNOLOGY**

**POSTER PREZENTACIJE/ POSTER**

**PRESENTATIONS**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
sa međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> SERBIAN MICROBIOLOGISTS CONGRESS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO

ISPITIVANJE MIKROBIOLOŠKIH KARAKTERISTIKA SEDIMENTA ZAGADJENOG  
UGLJOVODONICIMA NAFTE NA LOKALITETU TOPLANE NOVI BEOGRAD  
DETERMINATION OF MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SEDIMENT POLLUTED  
WITH PETROLEUM HYDROCARBONS AT THE SITE OF HEATING PLANT "NOVI BEOGRAD"

Žeradjanin Aleksandra<sup>1,2</sup>  
[adjuric@chem.bg.ac.rs](mailto:adjuric@chem.bg.ac.rs)

Lugonja Nikoleta<sup>1</sup>, Joksimović Kristina<sup>2,3</sup>, Miletić Srdjan<sup>1</sup>, Spasić Snežana<sup>1</sup>, Gojgić-Cvijović  
Gordana<sup>1</sup>, Vrvic Miroslav M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centar za hemiju – Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu,

<sup>2</sup>Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

<sup>3</sup>Inovacioni centar Hemijskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

<sup>4</sup>Brem Group d.o.o.

**UVOD:** Zagadjenje naftom i naftnim derivatima predstavlja visok rizik po čoveka i životnu sredinu. Do zagadjenja može doći tokom eksploatacije, transporta i skladištenja nafte, ali i pri akcidentalnim izlivanjima. Tehnologijom bioremedijacije - upotrebom mikroorganizama kao agensa za uklanjanje zagadjenja sediment i voda se mogu vratiti u prvobitno stanje. Pre procesa bioremedijacije potrebno je utvrditi broj autohtonih mikroorganizama u sedimentu, a zatim ih okarakterisati biohemijskim testovima i molekularnim metodama. Neki rodovi bakterija, kao što su *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, gljiva - *Candida*, *Aureobasidium* i *Aspergillus* sa visokom efikasnošću razlažu naftu i naftne derivate. Preliminarna istraživanja obavljena na lokalitetu Toplane Novi Beograd, potvrdila su postojanje naftnog zagadjenja kako u sedimentu tako i u podzemnim vodama i postojanje potrebe za sanacijom i remedijacijom terena.

**CILJEVI:** Određivanje različitih fiziološko-biohemijskih grupa mikroorganizama sedimenta na opštim i selektivnim podlogama.

**METODE:** U radu je korišćen sediment sa tri različite tačke na lokaciji Toplane Novi Beograd. Kao podloge za određivanje broja mikroorganizama korišćeni su: Hranljivi agar (Torlak) za bakterije; Sladni agar (Torlak) za gljive; mineralni agar sa dizelom D2 na 1 L (UG) za mikroorganizme koji razlažu ugljovodonike, *Pseudomonas* isolation agar (PIA) za bakterije roda *Pseudomonas*, M3 za bakterije rodova *Nocardia* i *Rhodococcus*. U uzorcima je pored mikrobiologije praćen i sadržaj ukupnih ugljovodonika nafte gasnom hromatografijom.

**REZULTATI:** U uzorcima sedimenta određen je broj mikroorganizama (CFU/g): ukupne bakterije  $1,0-4,0 \times 10^6$ ; kvasci i plesni  $2,5 \times 10^2-1,2 \times 10^5$ ; bakterije roda *Pseudomonas*  $2,2 \times 10^3-5,5 \times 10^4$ ; mikroorganizmi koji razlažu ugljovodonike  $2,2 \times 10^4-1,2 \times 10^5$ ; bakterije rodova *Nocardia* i *Rhodococcus*  $2,3 \times 10^3-3,6 \times 10^5$ . Ukupan sadržaj ugljovodonika nafte varira između 2760-28865 mg/kg suve supstance.

**ZAKLJUČAK:** U ispitivanim uzorcima je prisutan veliki udeo degradera ugljovodonika u ukupnom broju mikroorganizama. Upotreba selektivnih podloga je omogućila izolovanje čistih kultura koje će u narednim koracima biti identifikovane molekularnim metodama. Planirano je da se ove kulture koriste za eksperimente biodegradacije.

**KLJUČNE REČI:** sediment, naftni zagadjivač, mikroorganizmi degraderi



**DETERMINATION OF MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SEDIMENT POLLUTED WITH PETROLEUM HYDROCARBONS AT THE SITE OF HEATING PLANT "NOVI BEOGRAD"**

Žeradžanin Aleksandra<sup>1,2</sup>

[adjuric@chem.bg.ac.rs](mailto:adjuric@chem.bg.ac.rs)

Lugonja Nikoleta<sup>1</sup>, Joksimović Kristina<sup>2,3</sup>, Miletić Srdjan<sup>1</sup>, Spasić Snežana<sup>1</sup>, Gojgić-Cvijović Gordana<sup>1</sup>, Vrvić Miroslav M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Scientific Institution, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, National Institute, University of Belgrade

<sup>2</sup>Faculty of Chemistry, University of Belgrade

<sup>3</sup>Innovation center of the faculty of chemistry, University of Belgrade

<sup>4</sup>Brem Group d.o.o.

**INTRODUCTION:** Pollution with petroleum and petroleum products poses a high risk to the human environment, thus affecting all life. Pollution may occur during the exploitation, transportation and storage of petroleum, but also in accidental spills. Bioremediation technology-using microorganisms as an agent for removing pollution, sediment and water can be restored to its original state. Before the bioremediation process, it is necessary to determine the number of autochthonous microorganisms in the sediment. Preliminary research carried out at the site of heating plant "Novi Beograd" confirmed the existence of petroleum pollution both in sediment and in groundwater.

**OBJECTIVES:** Determination of different physiological-biochemical groups of microorganisms from sediment on general and selective medium.

**METHODS:** In this work we used sediment from three points at the site of heating plant "Novi Beograd". For the determination of number of microorganisms next medium were used: Nutrient agar (Torlak) for bacteria; Malt agar (Torlak) for fungi; mineral base medium containing 2 g of standard D2 diesel fuel in 1 L of medium for microorganisms degraders of hydrocarbons, Pseudomonas isolation agar for bacteria of the genus *Pseudomonas*, M3 for bacteria of the genera *Nocardia* and *Rhodococcus*. In addition to microbiology, we determined content of the total petroleum hydrocarbon.

**RESULTS:** Number of microorganisms (CFU/g) was determined: total bacteria  $1.0-4.0 \times 10^6$ ; yeasts and molds  $2.5 \times 10^2-1.2 \times 10^5$ ; bacteria of the genus *Pseudomonas*  $2.2 \times 10^3-5.5 \times 10^4$ ; microorganisms that degrade petroleum  $2.2 \times 10^4-1.2 \times 10^5$ ; bacteria of the genera *Nocardia* and *Rhodococcus*  $2.3 \times 10^3-3.6 \times 10^5$ . The total content of hydrocarbons varies between 2760-28865 mg/kg of dry substance.

**CONCLUSION:** High number of hydrocarbons degrading microorganisms is present in the tested samples. The use of selective medium has made it possible to isolate pure cultures that will be identified in molecular methods in the next steps. It is planned that these cultures are used for biodegradation experiments.

**KEYWORDS:** sediment, petroleum pollutant, microorganisms degraders

**ELEKTROHEMIJSKI SINTETIZOVANI BIOAKTIVNI KOMPOZITI ZA MEDICINSKE PRIMENE  
ELECTROCHEMICALLY SYNTHESIZED BIOACTIVE COMPOSITES AIMED FOR MEDICAL  
APPLICATIONS**

Janković Ana <sup>1</sup>

[ajankovic@tmf.bg.ac.rs](mailto:ajankovic@tmf.bg.ac.rs)

Nešović Katarina<sup>1</sup>, Stevanović Milena<sup>1</sup>, Došić Marija<sup>2</sup>, Kojić Vesna<sup>3</sup>, Vukašinović-Sekulić Maja<sup>1</sup>,  
Mišković-Stanković Vesna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

<sup>2</sup>Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina (ITNMS), Beograd, Srbija

<sup>3</sup>Medicinski fakultet, Onkološki institut Vojvodine, Sremska Kamenica, Srbija

Elektrohemijske metode su korišćene za sintezu različitih kompozita namenjenih za aplikacije u medicini kao antibakterijske prevlake na koštanim titanskim implantatima ili kao visoko efikasni antimikrobni hidrogelovi za ubrzano zarastanje rana.

Prvi sintetisani materijal je kompozitna prevlaka hidroksiapatita (HAP) sa prirodnim polimerom hitozanom (CS) koja uključuje antibiotik gentamicin, dobijena metodom elektroforetskog taloženja (EPD). EPD se izvodi pri konstantnom naponu na pločicama čistog titana iz vodene suspenzije. Na ovaj način dobijena porozna homogena prevlaka ima poboljšanu mehaničku čvrstoću i povoljne antibakterijske osobine. Prevlaka HAP/CS/Gent okarakterisana je difrakcijom X-zraka (XRD), infracrvenom spektroskopijom sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) i skenirajućom elektronskom mikroskopijom (FE-SEM). Dobijeni rezultati potvrdili su formiranje nove kompozitne prevlake HAP/CS/Gent. Citotoksičnost prema dvema vrstama ćelijskih linija ispitana je korišćenjem testa isključivanja tripan plave boje (DET) i MTT testa za procenu ćelijske metaboličke aktivnosti. Prevlaka sa antibiotikom (HAP/CS/Gent) pokazala je dobru antibakterijsku aktivnost protiv *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, dok je istovremeno zadržala nisku citotoksičnost, što ukazuje na visok potencijal za biomedicinske primene.

Drugi sintetisani materijal je biokompatibilni nanokompozitni hidrogel polivinil-alkohol/hitozan/grafen (PVA/CHI/Gr) sa nanočesticama srebra (AgNPs). AgNPs su dobijene *in situ* elektrohemijskom sintezom u matrici nabubrela hidrogelova PVA/CHI/Gr. Korišćene su dve koncentracije CHI (0,1 mas.% and 0,5 mas.%), u cilju ispitivanja uticaja sadržaja CHI na svojstva nanokompozitnih hidrogelova. Nanokompoziti Ag/PVA/CHI/Gr su dalje karakterisani metodom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM), Raman spektroskopije i rendgenske fotoelektronske spektroskopije (XPS). Opuštanje srebra je praćeno tokom 28 dana, a dobijeni profili ukazuju na postepeno kontrolisano otpuštanje tokom ovog perioda. Antibakterijska aktivnost prema *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* je potvrđena agar-difuzionim testom, dok je citotoksičnost ispitana direktnim testom isključenja sa bojom tripan-plavo (DET).

Ključne reči: elektrohemijska sinteza, biokompoziti, antibakterijska svojstva

## ELECTROCHEMICALLY SYNTHESIZED BIOACTIVE COMPOSITES AIMED FOR MEDICAL APPLICATIONS

Janković Ana <sup>1</sup>

ajankovic@tmf.bg.ac.rs

Nešović Katarina<sup>1</sup>, Stevanović Milena<sup>1</sup>, Đošić Marija<sup>2</sup>, Kojić Vesna<sup>3</sup>, Vukašinović-Sekulić Maja<sup>1</sup>,  
Mišković-Stanković Vesna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Institute for Technology of Nuclear and other Mineral Raw Materials (ITNMS) Belgrade

<sup>3</sup>Faculty of Medicine, Institute for Oncology of Vojvodina, Sremska Kamenica, Belgrade

Electrochemical methods were employed for synthesis of various composites intended for applications in medicine as antibacterial coatings on titanium bone implants or as highly efficient antimicrobial hydrogels for accelerated wound healing.

The first synthesized material is a composite coating of hydroxyapatite (HAP) with natural polymer chitosan (CS) which includes an antibiotic gentamicin, obtained by the method of electrophoretic deposition (EPD). EPD was carried out at the constant voltage on pure titanium plates from an aqueous suspension. Thus assembled porous homogenous coating would gain improved mechanical strength and favorable antibacterial properties. HAP/CS/Gent coating was characterized by X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), and field emission scanning electron microscopy (FE-SEM). Obtained results confirmed the formation of a new composite coating HAP/CS/Gent. Cytotoxicity against two types of cell lines was investigated using trypan blue dye-exclusion test (DET) and MTT assay for assessing cell metabolic activity. The antibiotic loaded coating (HAP/CS/Gent) exhibited good antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, while preserving low cytotoxicity, indicating the high potential for biomedical applications.

The second synthesized material is biocompatible poly(vinyl alcohol)/chitosan/graphene (PVA/CHI/Gr) nanocomposite hydrogel loaded with silver nanoparticles (AgNPs). AgNPs were produced by *in situ* electrochemical synthesis in the pre-swollen PVA/CHI/Gr hydrogel matrix. Two concentrations of CHI (0.1 wt% and 0.5 wt%) were used in order to investigate the influence of CHI content on the properties of nanocomposite hydrogels. The Ag/PVA/CHI/Gr nanocomposites were further characterized by scanning electron microscopy (SEM), Raman spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Silver release was monitored for 28 days and the obtained profiles indicate slow controlled release over chosen time period. Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was confirmed by disc-diffusion tests, while low cytotoxicity was confirmed using trypan blue dye-exclusion test (DET).

**KEYWORDS:** electrochemical synthesis, biocomposites, antibacterial properties

**INOVATIVNO GRANULISANO ORGANOMINERALNO MULTIKOMPOZITNO ĐUBRIVO NA  
BAZI VERMIKOMPOSTA ZA STIMULISANJE RESPIRACIJE ZEMLJIŠTA – STUDIJA NA MICRO-  
OXYMAX RESPIROMETRU**

**INNOVATIVE GRANULATED MULTICOMPOSITE FERTILIZER BASED ON VERMICOMPOST  
FOR STIMULATING SOIL RESPIRATION DURING BIOREMEDIATION - A STUDY ON THE  
MICRO-OXYMAX RESPIROMETER**

Joksimović Kristina <sup>1</sup>

[kjoksimovic@chem.bg.ac.rs](mailto:kjoksimovic@chem.bg.ac.rs)

Žeradjanin Aleksandra<sup>2</sup>, Lješević Marija<sup>2</sup>, Lončarević Branka<sup>2</sup>, Jakovljević Dragica<sup>2</sup>, Gojgić-  
Cvijović Gordana<sup>2</sup>, Beškoski Vladimir<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Inovacioni centar Hemijskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

<sup>2</sup>Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu

<sup>3</sup>Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**UVOD:** Porast broja stanovništva dovodi do povećane aktivnosti na poljoprivrednom zemljištu da bi se obezbedila najveća moguća količina hrane zadovoljavajućeg kvaliteta. Zbog dugogodišnje intenzivne poljoprivredne proizvodnje bez neophodne remineralizacije, danas je za najveći deo obradivog zemljišta karakterističan nedostatak minerala. Proizvođači nekontrolisanom upotrebom neorganskih đubriva dovode do zagađenja životne sredine i eutrofikacije. Korišćene đubriva i hemijskih proizvoda za zaštitu biljaka od bolesti, insekata i korova dovodi do taloženja organskih i neorganskih supstanci u zemljištu, čija koncentracija može postati otrovna za biljke i mikroorganizme koji potpomažu biljni rast. Primena organo-mineralnih multikompozitnih đubriva (Organomineral multicomposite fertilizers-OMMF) dovodi do stimulacije autohtonih mikroorganizama zemljišta i dodatno omogućava biljkama lakše preuzimanje hranljivih supstanci, stimulišući njihov rast. OMMF je mešavina vermikomposta i mineralnih komponenti sjedinjenih u obliku granula obogaćenih korisnim mikroorganizmima.

**CILJ:** Razvoj inovativnih granuliranih multikompozitnih đubriva zasnovanih na vermikompostu i ispitivanje njegove metaboličke aktivnosti.

**METOD:** Polisaharid levan, dobijen pomoću soja *Bacillus licheniformis* NS032, upotrebljen je kao adheziv u proizvodnji granula. Granule OMMF obogaćene su mikroorganizmima roda *Bacillus*, *Azotobacter* i vrste *Mycorrhizae* za koje je utvrđeno da imaju stimulatívni efekat na rast biljaka. Za ispitivanje metaboličke aktivnosti u zemljištu obogaćenim OMMF, korišćen je Micro-Oxymax Respirometer (Columbus Instruments, Ohio, SAD) za istovremeno i kontinuirano merenje kiseonika i ugljen-dioksida.

**REZULTATI:** Analiza respiracije zemljišta upotrebom Micro-Oxymax respirometra pokazala je da granulirani OMMF kada se primenjuje na poljoprivredno zemljište intenzivira aktivnost mikrobne zajednice za više od 90% u poređenju sa kontrolnim uzorkom, više od 30% u poređenju sa NPK đubrivom i više od 20% u poređenju sa stajnjakom.

**ZAKLJUČAK:** Mikrobiološki pokazatelji ukazuju na visok stepen preživljavanja upotrebljenih mikroorganizama *Bacillus* sp., *Azotobacter* sp. i vrste *Mycorrhizae*. Prednost OMMF ogleda se u granuliranoj formi što omogućava njegovo korišćenje pomoću poljoprivrednih mašina na velikoj površini.

Ova studija realizovana je uz podršku programa Pokreni se za Nauku 2017.

**KLJUČNE REČI:** Vermikompost, respiracija, mikrobna aktivnost.

**INNOVATIVE GRANULATED MULTICOMPOSITE FERTILIZER BASED ON VERMICOMPOST  
FOR STIMULATING SOIL RESPIRATION DURING BIOREMEDIATION - A STUDY ON THE  
MICRO-OXYMAX RESPIROMETER**

Joksimović Kristina <sup>1</sup>

[kjoksimovic@chem.bg.ac.rs](mailto:kjoksimovic@chem.bg.ac.rs)

Žeradjanin Aleksandra<sup>2</sup>, Lješević Marija<sup>2</sup>, Lončarević Branka<sup>2</sup>, Jakovljević Dragica<sup>2</sup>, Gojgić-  
Cvijović Gordana<sup>2</sup>, Beškoski Vladimir<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Innovation center of the Faculty of chemistry, University of Belgrade

<sup>2</sup> Scientific Institution, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, National Institute,  
University of Belgrade

<sup>3</sup> Faculty of Chemistry, University of Belgrade

**INTRODUCTION:** The increase in the number of the population leads to increased activity on agricultural land in order to ensure the highest possible quantity of food of satisfactory quality. The use of fertilizers and chemical products for the protection of plants leads to the precipitation of organic and inorganic substances in the soil, the concentration of which can become toxic to plants and microorganisms that promote plant growth. The use of organomineral multicomposit fertilizers-OMMF leads to the stimulation of autochthonous soil microorganisms and additionally enables the plants to easily obtain nutrients. OMMF is a mixture of vermicompost and mineral components combined in the form of granules enriched with beneficial microorganisms.

**OBJECTIVES:** Development of innovative granular multicomposite fertilizers based on vermicompost and metabolic activity testing.

**METHODS:** Polysaccharide levan, obtained by the *Bacillus licheniformis*, is used as an adhesive in the production of granules. OMMF granules are enriched with microorganisms of the genus *Bacillus*, *Azotobacter* and *Mycorrhizae*, which have been shown to have a stimulating effect on plant growth. Micro-Oxymax Respirometer (Columbus Instruments, Ohio, USA) was used to test the metabolic activity in OMMF enriched soil for the measurement of the O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> gases.

**RESULTS:** Analysis of soil respiration using Micro-Oxymax Respirometer showed that granulated OMMF when applied to agricultural soil intensifies the activity of the microbial community by more than 90% compared to the control sample, more than 30% compared to NPK fertilizers and more than 20% compared to manure.

**CONCLUSION:** Microbiological indicators indicate a high degree of survival of the microorganisms used *Bacillus sp.*, *Azotobacter sp.* and *Mycorrhizae*. The advantage of OMMF is reflected in its granular form, which allows its use in conventional agricultural machinery on a large surface.

This study was carried out with the support of the Start Up for Science program 2017.

**KEYWORDS:** Vermicompost, respiration, microbial activity.

**SESIJA: EKOLOŠKA**

**MIKROBIOLOGIJA**

**SESSION: ECOLOGICAL**

**MICROBIOLOGY**

**PREDAVANJA PO POZIVU/**

**INVITED LECTURES**

**XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE**  
**sa međunarodnim učešćem**  
**MIKROMED 2018 REGIO**

**12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS**  
**with international participation**  
**MICROMED 2018 REGIO**

**INTEGRAZE MOBILNIH INTEGRONA KLASA 1 BAKTERIJA: OD KLINIKE DO ZAŠTITE  
ŽIVOTNE SREDINE**  
**INTEGRASES OF CLASS 1 MOBILE INTEGRONS: FROM CLINICS TO ENVIRONMENTAL  
PROTECTION**

Jovčić Branko <sup>1,2</sup>

[bjovcic@bio.bg.ac.rs](mailto:bjovcic@bio.bg.ac.rs)

Novović Katarina<sup>2</sup>, Filipić Brankica<sup>2,3</sup>, Kaljević Jovana<sup>2</sup>, Stojilković Boris<sup>2</sup>, Nemanja Mirković<sup>2</sup>,  
Malešević Milka<sup>2</sup>, Kojić Milan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd

<sup>2</sup> Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Beograd

<sup>3</sup> Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd

Mobilni integroni klase 1 su genetički elementi od izuzetnog značaja za brzo širenje, prostorno i vremenski, rezistencije na antibiotike. Svoju ulogu ostvaruju ugradnjom i funkcionalnom ekspresijom egzogenih okvira čitanja čiji produkti obezbeđuju rezistenciju na antibiotike. Funkcionalnost mobilnih integrona obezbeđuje tirozinska rekombinaza IntI1, kodirana sa *intI1* gena lociranog u integronu. Svi do danas opisani klinički mobilni integroni klase 1 karakterišu se izuzetnom očuvanošću nukleotidne sekvence *intI1* gena. Uprkos trenutno važećoj hipotezi da svi klinički integroni klase 1 sadrže identičan *intI1* gen, u našoj laboratoriji je identifikovana nova varijanta ovog gena u kliničkim izolatima vrste *Achromobacter xylosoxidans*. Sekvenciranjem genoma tih izolata definisali smo genomsku lokalizaciju i genetičko okruženje nove varijante gena za integrazu klase 1.

Osim značaja u kliničkoj mikrobiologiji, pokazano je da *intI1* gen može da se koristi kao marker antropogenog zagađenja zahvaljujući povezanosti sa genima za rezistenciju na antibiotike, dezinficijense i toksične metale, prisustvu u velikom broju patogenih i nepatogenih bakterija, brzim promenama zastupljenosti u određenoj sredini i potencijalu horizontalnog genskog transfera, kao i očuvanosti nukleotidne sekvence. Dodatno, *intI1* gen je prisutan komensalima čoveka i domaćih životinja usled čega je visoko zastupljen u otpadnim vodama, a ima nisku zastupljenost u sredinama koje nisu izložene antropogenom delovanju. U našoj studiji smo ispitivali antropogeni uticaj na mikrobiološke zajednice sedimenata glacijalnih jezera zapadnog Balkana, koristeći kvantifikaciju *intI1* gena i gena za rezistenciju na antibiotike u uzorcima metagenomske DNK kao markere zagađenja. Ovim pristupom smo pokazali da je *intI1* gen bio najzastupljeniji u jezeru za koje je pretpostavljeno da je najizloženije antropogenom uticaju, dok je bio najmanje zastupljen u jezeru udaljenom od ljudskih naselja koje nije izloženo aktivnostima čoveka.

**INTEGRASES OF CLASS 1 MOBILE INTEGRONS: FROM CLINICS TO ENVIRONMENTAL  
PROTECTION**

Jovčić Branko <sup>1,2</sup>

[bjovcic@bio.bg.ac.rs](mailto:bjovcic@bio.bg.ac.rs)

Novović Katarina<sup>2</sup>, Filipić Brankica<sup>2,3</sup>, Kaljević Jovana<sup>2</sup>, Stojilković Boris<sup>2</sup>, Nemanja Mirković<sup>2</sup>,  
Malešević Milka<sup>2</sup>, Kojić Milan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Biology, University of Belgrade

<sup>2</sup> Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, National Institute, University of Belgrade

<sup>3</sup> Faculty of Pharmacy, University of Belgrade

Class 1 mobile integrons are genetic elements that play crucial role in the rapid dissemination of antibiotic resistance worldwide, due to capturing of gene cassettes from a pool of resistance genes, as well as association with diverse mobile elements. The class 1 integrons are widely distributed in pathogens from clinical settings and they have spread to nearly all species of Gram-negative pathogens. The hallmark of class 1 integrons is their *intI1* gene that encodes tyrosine recombinase (IntI1) that processes insertion and excision of gene cassettes within the integron. All clinical mobile integrons class 1, described up to day, share highly conserved the *intI1* gene sequence. However, we identified and characterized novel variant of the *intI1* gene among *Achromobacter xylosoxidans* clinical isolates. Genome sequencing enabled us to get insight into genomic localization and association with antibiotic resistance genes of novel *intI1* gene variant. In addition to the importance of mobile integrons class 1 in clinical settings, the *intI1* gene was proposed as a proxy for anthropogenic pollution due to: link to the antibiotic, disinfectants and toxic metals resistance genes, presence in variety of pathogenic and non-pathogenic bacteria, rapid change of abundance and horizontal gene transfer potential, high conservation of nucleotide sequence. Beside that, this gene is universally present and highly abundant in commensal bacteria of humans and domestic animals, with high representation in waste streams and low abundance in less affected environments. Our aim was to explore the anthropogenic impact on selected Western Balkans glacial lake sediments by quantifying the antibiotic resistance genes and the *intI1* gene in the metagenomic DNA samples. We showed that the abundance of *intI1* gene was the highest in lake that was most exposed to anthropogenic impact, while the least abundant in the remote lake negligibly affected by human activity.



**BIOAUTOGRAFSKA ANALIZA I DETEKCIJA ANTIMIKROBNIH JEDINJENJA POREKLOM IZ  
RAZLIČITIH PRIRODNIH IZVORA  
BIOAUTOGRAPHIC ANALYSIS AND DETECTION OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS FROM  
DIFFERENT NATURAL SOURCES**

Dimkić Ivica

Berić Tanja, Stanković Slaviša

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Studentski trg 16, 11000 Beograd  
[ivicad@bio.bg.ac.rs](mailto:ivicad@bio.bg.ac.rs)

Biljni preparati se koriste u narodnoj medicini hiljadama godina za lečenje mnogih bolesti, jer sadrže raznovrsne sekundarne metabolite i njihova antimikrobna aktivnost može se pripisati alkaloidima, fenolima i terpenima. Propolis i etarska ulja poreklom iz aromatičnih biljaka su među prirodnim izvorima antimikrobnih agenasa najčešće proučavani do sada. S druge strane, otkrivanje produkcije novih antibiotika, poput lipopeptida, od strane određenih korisnih bakterija je važno u smislu određivanja njihovih kapaciteta kao biokontrolnih agenasa u borbi protiv mnogih biljnih bolesti. Skrining izolata potencijalnih producenata antibiotika, uz istovremeno direktno praćenje antibiotskih profila, pruža brz pristup u odnosu na tradicionalni metod selekcije. Na osnovu vrednosti retardacionog faktora ( $R_F$ ), tehnika visokoefikasne tankoslojne hromatografije (HPTLC) može pružiti važne informacije o polaritetu, spektralnim osobinama i veličini analita. Takođe, ova metoda može ukazati istovremeno na geografsko i botaničko poreklo biljnih preparata kroz analizu hemijskog sastava datih biljnih izvora. Bioautografija je biološka metoda koja je spregnuta tankoslojnom hromatografijom. Predstavlja važno oruđe u identifikaciju bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih proizvoda i živih organizama. Bioautografija je veoma osetljiva kvalitativna metoda i stoga je pogodna za ciljanu izolaciju jedinjenja, a naročito kada je spojena sa masenom spektrometrijom. HPTLC bioautografija omogućava da se aktivna komponenta iz različitih mešavina prirodnih ekstrakta identifikuje na veoma efikasan način, *in situ*. Takođe, integracija ove metode sa multivarijantnim regresionim tehnikama omogućava i predikciju aktivnosti prirodnih jedinjenja. Znanja stečena ovom metodom mogu biti važna u otkrivanju antimikrobne aktivnosti potencijalnih biokontrolnih izolata, njihovih metabolita, kao i svih ostalih metabolita prirodnog porekla, uzimajući u obzir njihovu visoku prevalenciju i dostupnost biljaka i korisnih mikroorganizama širom sveta.

**BIOAUTOGRAPHIC ANALYSIS AND DETECTION OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS FROM  
DIFFERENT NATURAL SOURCES**

Dimkić Ivica

**Berić Tanja, Stanković Slaviša**

Faculty of Biology, University of Belgrade

Plant remedies have been used in folk medicine for thousands of years to treat many diseases, since they contain a diverse array of secondary metabolites and their antimicrobial activity can be attributed to alkaloids, phenols and terpenes. Among the natural sources of antimicrobial agents, propolis and essential oils from aromatic plants have been studied the most. On the other hand, detection of antibiotic production, such as lipopeptides, by particular beneficial bacteria is important in determining its capacity as a biocontrol agent against many plant diseases. Screening of candidate strains for antibiotic production, followed by direct detection of the antibiotic profiles, provides a rapid approach in comparison with the traditional method of selection. Based on the retardation factor ( $R_F$ ) values, the high performance thin layer chromatography (HPTLC) technique can provide important information about the polarity, spectral properties, and size of the analytes molecules. Also, this method through the chemical composition of a given plant derivatives can indicate on their geographic and botanical origin. Bioautography is a biological method hyphenated with thin layer chromatography. It is an important tool for the identification of bioactive compounds from natural products and living organisms. Bioautography is a very sensitive qualitative method and therefore suitable for targeted isolation of compounds especially when is coupled with mass spectrometry. HPTLC bioautography makes it possible to identify the active component from a different mixture of natural extracts in a very effective manner, *in situ*. Its integration with multivariate regression techniques allows activity prediction of natural compounds as well. Knowledge gained through this method could be important for addressing antimicrobial activity of potential biocontrol strains, their metabolites, as well as of any metabolites from natural sources, taking into account the high prevalence and availability of plants and beneficial microorganisms worldwide

**CIJANOBakterIJE PRODUCENTI BIOLoŠKI AKTIVNIH JEDINJENJA**  
**CYANOBACTERIA PRODUCERS OF BIOLOGICAL ACTIVE COMPOUNDS**

Simeunović Jelica

[jelica.simeunovic@dbe.uns.ac.rs](mailto:jelica.simeunovic@dbe.uns.ac.rs)

Kovač Dajana, Babić Olivera, Davidović Petar, Đan Mihajla, Kaišarević Sonja, Šibul Filip, Svirčev Zorica

Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

**UVOD:** Metabolički diverzitet cijanobakterija je uslovljen njihovim specifičnim ekofiziološkim, biohemijskim i genetičkim svojstvima, što im omogućuje produkciju širokog spektra bioaktivnih metabolita i visoko vrednih produkata sa nutritivnim (nutraceutici), farmakološkim (farmaceutici) i terapeutskim (terapeutici) potencijalom. Takva jedinjenja mogu ispoljiti antimikrobnu, antioksidativnu, antiproliferativnu, citotoksičnu, imunomodulatornu aktivnost. Istraživanja su pokazala da po hemijskoj strukturi biološki aktivni produkti cijanobakterija najčešće pripadaju peptidima, masnim kiselinama, polisaharidima, alkaloidima, fenolima i terpenoidima. U novije vreme se posebna pažnja posvećuje i ispitivanju toksičnih produkata cijanobakterija (cijanotoksina) zbog njihovog negativnog uticaja na zdravlje ljudi i životinja. Jednostavni zahtevi za kultivaciju i mogućnost metaboličke manipulacije daju značajnu prednost cijanobakterijama u ispitivanju i biotehnološkoj primeni njihovih bioaktivnih metabolita.

**CILJ:** Utvrđivanje biološke aktivnosti i toksičnosti cijanobakterijskih sojeva

**METOD:** Antioksidativna aktivnost cijanobakterijskih sojeva određena je metodama DPPH i FRAP. Hemijska karakterizacija fenolnih jedinjenja vršena je HPLC-MS/MS tehnikom, a masnokiselinski sadržaj određen je metodom gasne hromatografije (GC-FID). Ispitivanje antibakterijske aktivnosti vršeno je disk-difuzionom i mikrodilucionom metodom, dok je citotoksičnost sojeva testirana *in vitro* primenom MTT testa sa ćelijskom linijom humanog hepatocelularnog karcinoma (HepG2). Toksičnost sojeva je testirana različitih biotestovima (*Artemia salina*, *Daphnia magna*, *Danio rerio*-DarT), *in vitro* enzimskim esejima i *in vivo* testovima.

**REZULTAT:** Svi ispitivani sojevi ispoljili su antioksidativnu aktivnost, naročito sojevi roda *Nostoc* i *Arthrospira*. Hemijska karakterizacija biomase ukazala je na to da fenolna jedinjenja ne doprinose značajno ispoljenoj antioksidativnoj aktivnosti. Konstatovana je antibakterijska aktivnost u slučaju šest sojeva, ali da za tu aktivnost nisu odgovorne masne kiseline. Zabeležen je značajan citotoksičan potencijal testiranih sojeva, pri čemu su registrovane IC<sub>50</sub> vrednosti od 37,76 µg/mL (soj *Nostoc* LC1B) do 534 µg/mL (soj *Nostoc* 2S9B). Dozno-zavisna i soj-specifična toksičnost konstatovana je u većini primenjenih testova toksičnosti.

**ZAKLJUČAK:** Rezultati ispitivanja testiranih sojeva idu u prilog činjenici da cijanobakterije imaju značajan potencijal u produkciji širokog spektra bioaktivnih metabolita sa antioksidativnim, antibakterijskim, citotoksičnim i toksičnim delovanjem.

**KLJUČNE REČI:** biološka aktivnost, biotestovi, cijanobakterije, toksičnost

## CYANOBACTERIA PRODUCERS OF BIOLOGICAL ACTIVE COMPOUNDS

Simeunović Jelica

[jelica.simeunovic@dbe.uns.ac.rs](mailto:jelica.simeunovic@dbe.uns.ac.rs)

Kovač Dajana, Babić Olivera, Davidović Petar, Đan Mihajla, Kaišarević Sonja, Šibul Filip, Svirčev Zorica

Department of Biology and Ecology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Novi Sad

**INTRODUCTION:** The metabolic diversity of cyanobacteria is conditioned by their specific ecophysiological, biochemical and genetic properties, which enable them to produce a wide range of bioactive metabolites and high-value products with nutritional (nutraceuticals), pharmacological (pharmaceuticals) and therapeutic (therapeutics) potential. Such compounds exhibit antimicrobial, antioxidant, antiproliferative, cytotoxic, immunomodulatory activity. Studies have shown that these products mostly belong to peptides, fatty acids, polysaccharides, alkaloids, phenols and terpenoids. More recently, special attention is paid to the testing of toxic products of cyanobacteria (cyanotoxins) due to their negative impact on human and animal health. Simple requirements for cultivation and the possibility of metabolic manipulation give a significant advantage to cyanobacteria in the testing and biotechnological application of their bioactive metabolites.

**AIM:** Determination of biological activity and toxicity of cyanobacterial strains

**METHODS:** The antioxidant activity of tested strains was determined by DPPH and FRAP methods. The chemical characterization of phenolic compounds was performed by HPLC-MS / MS technique, while the fatty acid content was determined by the gas chromatography (GC-FID). Antibacterial activity of strains was performed by the disk diffusion and microdilution method, while cytotoxicity was tested *in vitro* using the MTT assay with the human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2). The toxicity of strains was tested with various biotests (*Artemia salina*, *Daphnia magna*, *Danio rerio*-DarT), *in vitro* enzyme assays and *in vivo* tests.

**RESULTS:** All investigated strains exhibited antioxidant activity, especially *Nostoc* and *Arthrospira* strains. The chemical characterization of biomass indicated that phenolic compounds do not significantly contribute to antioxidant activity. It was noted that six strains exhibited antibacterial effect, but that fatty acids are not responsible for this activity. Significant cytotoxic potential of tested strains was observed, with IC<sub>50</sub> values ranging from 37.76 µg / mL (*Nostoc* LC1B strain) to 534 µg / mL (*Nostoc* 2S9B strain). Dose-dependent and strain-specific toxicity was registered in the most of toxicity tests applied.

**CONCLUSION:** The results of the performed testing with selected strains support the fact that cyanobacteria have a significant potential in producing a wide range of bioactive metabolites with antioxidant, antibacterial, cytotoxic and toxic effects.

**KEY WORDS:** biological activity, biotests, cyanobacteria, toxicity

**PRIMENA BAKTERIJA U UKLANJANJU SOLI SA OBJEKATA KULTURNE BAŠTINE**  
**APPLICATION OF BACTERIA FOR SALT REMOVAL FROM CULTURAL HERITAGE OBJECTS**

Markov Siniša

[sinisam@tf.uns.ac.rs](mailto:sinisam@tf.uns.ac.rs)

Ana Vidaković, Olja Šovljanski

Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, Srbija

Poslednjih decenija, usled napretka i razvoja industrijalizacije dolazi do promene u sastavu atmosfere, u smislu stvaranja agresivnijeg okruženja koje direktno utiče na pojavu različitih oblika degradacije građevinskih materijala, uključujući i materijale kulturne baštine. Jedan od najznačajnijih oblika degradacije građevinskih materijala je degradacija izazvana dejstvom rastvorljivih i nerastvorljivih soli.

Do skoro su se za uklanjanje soli sa objekata kulturne baštine koristile tradicionalne hemijske i fizičke metode čišćenja i konzervacije (peskarenje, voda pod pritiskom, organski rastvarači, itd.), međutim ove metode su neefikasne, agresivne i neselektivne. Krajem prošlog veka započeto je sa istraživanjem u oblasti primene mikroorganizama u cilju uklanjanja soli i drugih oblika oštećenja materijala kulturne baštine.

Trenutni trend u oblasti čišćenja materijala je upotreba nove tehnologije koja je dobila naziv biočišćenje, jer podrazumeva primenu vijabilnih ćelija mikroorganizama i njihovih enzima kao agenasa za uklanjanje soli. Tokom biočišćenja mikroorganizmi svojom metaboličkom aktivnošću transformišu prisutne soli u neškodljiva jedinjenja po materijal i životnu sredinu.

Do sada je na različitim materijalima potvrđena efikasnost biočišćenja prilikom korišćenja vijabilnih ćelija *Desulfovibrio* sp., *Pseudomonas* sp. i *Bacillus* sp. U cilju postizanja što veće efikasnosti biočišćenja, pažnja naučnika iz ove oblasti je usmerena ka izolovanju i selekciji novih nepatogenih bakterijskih vrsta, kao i pronalaženju optimalnog načina nanošenja suspenzije na građevniske objekte.

S toga, ovaj rad prikazuje postupak izolovanja, selekcije i primene denitrifikatora *Pseudomonas stutzeri* u cilju uklanjanja nitrata sa materijala kulturne baštine.

**KLJUČNE REČI:** biočišćenje, materijali kulturne baštine, soli

**Zahvalnost:** Rezultati istraživanja prikazani u ovom radu su deo projekta III 45008 finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije

## APPLICATION OF BACTERIA FOR SALT REMOVAL FROM CULTURAL HERITAGE OBJECTS

Markov Siniša

[sinisam@tf.uns.ac.rs](mailto:sinisam@tf.uns.ac.rs)

Vidaković Ana, Šovljanski Olja

Faculty of Tehnology Novi Sad, University of Novi Sad, Serbia

In recent decades, a change in the atmosphere composition has been occurred in terms of creating an aggressive environment, due to the advancement and development of industrialization, which directly affects the appearance of various form of degradation of building materials, including the cultural heritage objects. Salt-induced degradation is one of the most important form of degradation of building materials.

Up to now, for removing salt deposits from cultural heritage objects the traditional chemical and physical cleaning methods (sandblasting, pressurized water, organic solvents, etc.) were used; although these methods are ineffective, aggressive and non-selective. At the end of the last century, extensive studies has begun in the field of the protection of cultural heritage, regarding the application of microorganisms for removing salt and other degradation forms from historical materials.

The current trend in the field of material conservation is a new technology – biocleaning, that implies the use of viable cells of microorganisms and their enzymes as salt removal agents. During the biocleaning, microorganisms transform the present salts into harmless forms by their metabolic activity, leaving behind the cleaned material without further damages and clean environment.

So far, the efficiency of biocleaning technology has been confirmed by usage the viable cells of *Desulfovibrio* sp., *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. In order to achieve the highest efficiency of biocleaning, the attention of scientists in this field is directed towards isolating and selecting new, non-pathogenic bacterial species, as well as finding the optimal protocol for applying a bacterial suspension to building materials.

Therefore, this paper illustrates the process of isolation, selection and application of denitrifying bacteria *Pseudomonas stutzeri* for nitrate removal from cultural heritage objects.

**POTENCIJALNO PATOGENI MIKROORGANIZMI U AGROEKOSISTEMU –FAKTOR RIZIKA U  
BEZBEDNOJ PROIZVODNJI POVRĆA  
POTENTIALLY HUMAN PATHOGEN MICROORGANISMS IN AGROECOSYSTEM–A RISK IN  
HEALTH SAFETY VEGETABLE PRODUCTION**

Ključev Igor

[iključev@agrif.bg.ac.rs](mailto:iključev@agrif.bg.ac.rs)

Jovičić-Petrović Jelena

Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Kontaminacija povrća i voća može biti izazvana različitim patogenim bakterijama, virusima, protozoama. Većina gastrointestinalnih obolenja izazvanih svežim proizvodima se povezuje sa bakterijskom kontaminacijom, posebno sa predstavnicima familije *Enterobacteriaceae*.

Zdravstveni rizik koji se odnosi na prisustvo patogena na povrću i voću zavisi prvenstveno od opstanka i preživljavanja ovih mikroorganizama u agroekosistemima. Stoga je neophodno proceniti opasnost od kontaminacije patogenima i u skladu sa tim razviti strategije za smanjenje kontaminacije i umanjeње migracije patogena. Potencijalni izvori najčešće mikrobiološke kontaminacije su: zemljište, feces, voda za navodnjavanje, voda koja se koristi za primenu pesticida, insekti, neadekvatno pripremljeno organsko đubrivo, divlje i domaće životinje kao i neadekvatne aktivnosti radnika, oprema za žetvu i transport, voda za pranje kao i oprema za preradu.

Mikrobiološke analize uzoraka svežeg povrća su obuhvatale ispitivanje na prisustvo *Listeria monocytogenes* i *Salmonellae* vrsta prema mikrobiološkim kriterijumima za bezbednost hrane, Pravilnika o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (Sl. glasnik RS br. 72/2010). Mikrobiološki kvalitet vode za navodnjavanje je procenjen na osnovu prisustva i brojnosti: aerobnih heterotrofa, *Pseudomonas* sp., koliformnih bakterija, *Escherichia coli* i enterokoka. Mikrobiološka analiza zemljišta je obuhvatala određivanje: ukupnog broja bakterija, sporogenih bakterija, *Azotobacter* spp. aerobnih heterotrofa, ali procenjen je i mikrobiološki kvalitet zemljišta sa sanitarnog aspekta (*Pseudomonas* sp. koliformne bakterije, *Escherichia coli*, enterokoke)

Rezultati mikrobioloških ispitivanja zemljišta, vode za navodnjavanje i svežeg povrća su pokazala prisustvo potencijalno patogenih mikroorganizama u agroekosistemu na ispitivanim lokacijama. Prisustvo koliformnih bakterija je detektovano u zemljištu, vodi za navodnjavanje i uzorcima svežeg povrća. U manjem broju uzoraka povrća, na pojedinim lokacijama, detektovano je prisustvo *Salmonella* sp. Fekalna kontaminacija je utvrđena u pojedinim uzorcima vode za navodnjavanje, kao i u zemljištu koje je bilo izloženo poplavama. Ovi rezultati ukazuju na neophodnost sveobuhvatnih analiza primarne proizvodnje povrća i sagledavnje složene interakcije celog ekosistema, i veze između zemljišta, vode za navodnjavanje i povrća.

**POTENTIALLY HUMAN PATHOGEN MICROORGANISMS IN AGROECOSYSTEM–A RISK IN  
HEALTH SAFETY VEGETABLE PRODUCTION**

Kljujev Igor  
[ikljujev@agrif.bg.ac.rs](mailto:ikljujev@agrif.bg.ac.rs)

Jovičić-Petrović Jelena

Faculty of Agriculture, University in Belgrade

Contamination of vegetables and fruits could be caused by various human pathogen bacteria, viruses, protozoa. The most gastrointestinal diseases, caused by fresh products, are connected with bacterial contamination, especially with bacteria from *Enterobacteriaceae*.

The health risk associated with the presence of pathogens on vegetables and fruits primarily depend on the survival of these microorganisms in agroecosystems. Therefore, it is necessary to assess the risk of contamination and develop strategies for reducing contamination and pathogen migration. The potential sources of microbiological contamination are: soil, feces, irrigation water, water used for application pesticide, insects, inappropriate prepared organic fertilizers, wild and domestic animals, as well as inadequate work activities, equipment for harvesting and transport, washing water and processing equipment.

Microbiological analyses of fresh vegetables samples included testing for the presence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonellae* species according to the microbiological criteria for food safety, Regulations of general and special conditions for food hygiene at any stage of production, processing and trade (The Official Journal of Republic of Serbia No. 72/2010). The microbiological quality of irrigation water was estimated based on the presence and number of heterotrophic bacteria, *Pseudomonas* sp., coliform bacteria, *Escherichia coli* and enterococcus. The microbiological analysis of soil included the determination: total bacteria number, sporogenic bacteria, *Azotobacter* spp. heterotrophic bacteria, as well as the microbiological quality of soil from the sanitary aspect (*Pseudomonas* sp. coliform bacteria, *Escherichia coli*, enterococcus)

The results of microbiological analyses of soil, irrigation water and fresh vegetables have shown the presence of potentially human pathogen microorganisms in the agroecosystem at the investigated sites. The presence of coliform bacteria was detected in soil, irrigation water and fresh vegetables. The *Salmonella* sp. was detected in some vegetable samples. The fecal contamination has been established in some irrigation water samples, as well as in the land exposed to floods. These results point to the necessity of comprehensive analysis of primary vegetable production and the consideration of the complex interaction in the whole ecosystem, and the connection between soil, irrigation water and vegetables.



PRAĆENJE MIKROBIOLOŠKOG FEKALNOG ZAGAĐENJA DUŽ TOKA REKE DUNAV - THE  
JOINT DANUBE SURVEY 3  
MONITORING OF MICROBIAL FAECAL POLLUTION ALONG THE DANUBE RIVER - THE  
JOINT DANUBE SURVEY 3

Kolarević Stoimir <sup>1</sup>

[stoimirk@bio.bg.ac.rs](mailto:stoimirk@bio.bg.ac.rs)

Kirschner<sup>23</sup>, A., Reischer<sup>34</sup>, G., Jakwerth<sup>23</sup>, S., Savio<sup>34</sup>, D., Ixenmaier<sup>4</sup>, S., Toth<sup>5</sup>, E., Sommer<sup>23</sup>, R.,  
Mach<sup>4</sup>, R., Linke<sup>34</sup>, R., Eilere<sup>67</sup>, A., Vuković-Gačić<sup>1</sup>, B., Farnleitner<sup>347</sup>, A.

<sup>1</sup>Univerzitet u Beogradu, Biološki Fakultet, Katedra za mikrobiologiju, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Međuuniverzitetski centar za vodu i zdravlje, Beč, Austrija

<sup>3</sup>Medicinski Univerzitet u Beču, Inстит za higijenu, primenjenu imunologiju i higijenu vode,  
Beč, Austrija

<sup>4</sup>Tehnički Univerzitet u Beču, Institut za hemijski, biološki inženjering i zaštitu životne  
sredine, Beč, Austrija

<sup>5</sup>Eötvös Loránd Univerzitet za nuku, Departman za mikrobiologiju, Budimpešta, Mađarska

<sup>6</sup>eDNA Solutions Ltd, Mulndal, Švedska

Univerzitet u Getenburgu, Departman za hemiju i molekularnu biologiju, Getenburg,  
Švedska

<sup>7</sup>Karl Landsteiner Univerzitet za zdravstvene nauke, Krems, Austrija

**UVOD:** Narušavanje kvaliteta površinskih voda fekalnim zagađenjem se odražava na kvalitet života ljudi i njihovo zdravlje uzimajući u obzir upotrebu površinskih voda za proizvodnju vode za piće, navodnjavanje i sl. Poznavanje nivoa fekalnog zagađenja i izvora kontaminacije, izuzetno je značajno za vodoprivredu. Reka Dunav je jedna od najznačajnijih reka u Evropi koju karakteriše izrazita međunarodnost. Dok se u nekim od podunavskih zemalja voda prerađuje pre ispuštanja u vodotokove, u drugim se ne tretira pre ispuštanja.

**CILJ:** Cilj ove studije je da se primenom enzimatskih metoda za kvantifikaciju standardnih bakterijskih indikatora odredi nivo fekalne kontaminacije u različitim sektorima duž reke Dunav u okviru međunarodne ekspedicije „The Joint Danube Survey 3”. Pored procene nivoa kontaminacije, na osnovu molekularnih markera je utvrđeno i da li je zagađenje humanog ili animalnog porekla.

**METODE:** Nivo fekalnog zagađenja, praćen je na osnovu najverovatnijeg broja ukupnih koliforma i glavnog predstavnika fekalnih koliforma (*Escherichia coli*) Colilert metodom. Određen je i broj intestinalnih enterokoka BIORAD metodologijom. Poreklo zagađenja određeno je na osnovu molekularnih markera pripadnika razdela Bacteroidetes pomoću qPCR-a. Marker BacHum i HF183II korišćeni su za detekciju zagađenja humanog porekla. Marker BacR je korišćen za detekciju zagađenja poreklom od preživara, a Pig2Bac marker za detekciju zagađenja poreklom od domaćih svinja.

**REZULTATI:** Detektovano je variranje u nivou zagađenja u različitim sektorima reke. Najviši nivo fekalnog zagađenja detektovan je u sektoru VI (Panonska ravan) gde veliki problem predstavljaju otpadne vode koje se bez prerade ispuštaju u Dunav. Molekularni markeri su ukazali da je zagađenje humanog porekla primarni izvor kontaminacije, dok animalno zagađenje nema toliki uticaj na kvalitet vode Dunava.

**ZAKLJUČAK:** Ova studija daje mapu zagađenja i kritičnih tačaka zagađenja duž reke Dunav. Implementacija prerade otpadnih voda je neophodna za očuvanje i poboljšanje kvaliteta reke Dunav. Uvođenje molekularnih markera u monitoring kvaliteta voda može znatno doprineti razumevanju prirode i porekla zagađenja.

**KLJUČNE REČI:** Dunav, fekalno zagađenje, mikrobiologija

MONITORING OF MICROBIAL FAECAL POLLUTION ALONG THE DANUBE RIVER – THE  
JOINT DANUBE SURVEY 3

Kolarević Stoimir<sup>1</sup>  
[stoimirk@bio.bg.ac.rs](mailto:stoimirk@bio.bg.ac.rs)

Kirschner<sup>23</sup>, A., Reischer<sup>34</sup>, G., Jakwerth<sup>23</sup>, S., Savio<sup>34</sup>, D., Ixenmaier<sup>4</sup>, S., Toth<sup>5</sup>, E., Sommer<sup>23</sup>, R.,  
Mach<sup>4</sup>, R., Linke<sup>34</sup>, R., Eilere<sup>67</sup>, A., Vuković-Gačić<sup>1</sup>, B., Farnleitner<sup>347</sup>, A.

<sup>1</sup>University of Belgrade, Faculty of Biology, Department of microbiology, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> Interuniversity Cooperation Center Water & Health, Vienna, Austria

<sup>3</sup>Faculty of Medicine, University of Vienna, The Institute for Hygiene and Applied  
Immunology, Vienna, Austria

<sup>4</sup>Faculty of Technology, University of Vienna, Institute of Chemical, Environmental and  
Bioscience Engineering, Vienna, Austria

<sup>5</sup>Eötvös Loránd University, Department of Microbiology, Budapest, Hungary

<sup>6</sup>eDNA Solutions Ltd, Mölndal, Sweden, University Göteborg, Department of Chemistry and  
Molecular Biology, Göteborg, Sweden

<sup>7</sup>Karl Landsteiner University of Health Sciences, Krems, Austria

**INTRODUCTION:** Deterioration of quality of surface waters by faecal pollution is reflected on the quality of human life and health, throughout the various uses of surface waters such as drinking water production, irrigation and recreation. The Danube River is one of the most significant international rivers in Europe. In some of the Danubian countries wastewaters are processed prior to discharge, while the others countries have not implemented wastewater treatment facilities yet.

**GOALS.** Major goal was to assess the level of faecal contamination along the river Danube by standard bacterial indicators within the international expedition "The Joint Danube Survey 3". Besides the assessment of the level of contamination, identification of the sources of pollution was by the molecular markers was also one of the goals.

**METHODS:** The standard bacterial indicators included quantification of total coliforms and faecal coliforms (*Escherichia coli*) by Colilert methodology. The number of intestinal enterococci was determined by BIORAD methodology. The source of pollution was determined by the molecular markers of the Bacteroidetes phylum by qPCR. BacHum and HF183II were used to detect contamination of human origin, BacR for ruminant and Pig2Bac for pig related contamination.

**RESULTS:** Variations in the level of pollution in different river sections were observed. The highest level of fecal pollution was detected in sector VI where a major problem is represented by the untreated wastewaters. Molecular markers have shown that the pollution of human origin is the primary source of contamination and that animal pollution has no significant influence.

**CONCLUSION:** This study provides a map of pollution and hotspots along the Danube. Implementation of wastewaters processing is crucial for preservation and improvement of quality of the Danube River. The introduction of molecular markers into water quality monitoring can significantly contribute to understanding the nature and source of pollution.

**KEYWORDS:** The Danube River, faecal pollution, microbiology

**INTERAKCIJE PROBIOTIČKIH BAKTERIJA SA IMUNSKIM SISTEMOM DOMAĆINA  
BENEFICIAL BACTERIA - HOST IMMUNE SYSTEM CROSS-TALK**

Golić Nataša

[natasag@imgge.bg.ac.rs](mailto:natasag@imgge.bg.ac.rs)

Tolinački Maja, Veljović Katarina, Nikolić Milica, Đokić Jelena, Terzić-Vidojević Amarela, Lukić Jovanka

Laboratorija za molekularnu mikrobiologiju, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**UVOD:** Iako je sad već poznato da je crevna microbiota kod ljudi najbrojnija u distalnom crevu, poreklo i vreme kolonizacije creva, raznovrsnost, sastav ili faktori koji indukuju disbiozu mikrobiote su i dalje u velikoj meri neistraženi. Ipak, razvoj najnovijih molekularnih metoda omogućio je sveobuhvatnija istraživanja u oblasti crevne mikrobiote. Između ostalog pokazano je da bakterije mlečne kiseline (BMK) predstavljaju značajan deo ovog složenog ekosistema.

**CILJ:** Cilj naših istraživanja je karakterizacija diverziteta i sastava crevne mikrobiote u različitim bolestima, kao i uloge BMK u prevenciji tih bolesti i izučavanje njihovog potencijala za terapijsku primenu.

**METOD:** Novi molekularni pristupi koji kombinuju metagenomsku analizu gena za 16S rDNK i interakcije bakterija i domaćina otkrivaju ključne mikroorganizme i njihovu ulogu u razvoju, prevenciji i / ili lečenju različitih bolesti.

**REZULTATI:** BMK pozitivno utiču na raznovrsnost crevne mikrobiote, modulišu imunski odgovor i propustljivost creva i proizvode bioaktivne ili regulatorne metabolite. Protektivni efekat laktobacila u sprečavanju inflamatorne bolesti creva može da se pripíše njihovoj sposobnosti stimulacije mukoznog imuniteta. Uloga laktobacila u prevenciji i lečenju neurorazvojnih i neurodegenerativnih bolesti mogla bi da se poveže sa njihovom ulogom u komunikaciji creva i centralnog nervnog sistema (CNS) (eng. *gut brain axis*), naročito proizvodnjom gama-aminobutirne kiseline (GABA), masnih kiselina kratkog lanca (SCFA) i drugih neuroaktivnih molekula ili egzopolisaharida, prepoznatih kao molekuli sa anti-nociceptivnom i anti-inflamatornom aktivnošću. Štaviše, laktobacili indukuju ekspresiju kladina, zonulina i proteina tesnih veza koji ukazuju na ulogu laktobacila u razvoju epitelne barijere. Antidiabetogena, antiinflamatorna i antifibrotička sposobnost soja *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 ukazuje na zaštitnu ulogu laktobacila u dijabetesu tipa 1. Laktobacili takođe mogu da indukuju autofagiju kao važan mehanizam uključen u prevenciji oštećenja jetre.

**ZAKLJUČAK:** BMK koji proizvode bioaktivne molekule, kao što su egzopolisaharidi, GABA i SCFA, ispoljavaju pozitivan uticaj na diverzitet i sastav crevne mikrobiote, imunomodulaciju i komunikaciju creva sa CNS.

**KLJUČNE REČI:** Interakcije bakterija i domaćina, microbiota, bakterije mlečne kiseline.

BENEFICIAL BACTERIA - HOST IMMUNE SYSTEM CROSS-TALK

Golić Nataša

[natasag@imgge.bg.ac.rs](mailto:natasag@imgge.bg.ac.rs)

Tolinački Maja, Veljović Katarina, Nikolić Milica, Đokić Jelena, Terzić-Vidojević Amarela, Lukić Jovanka

Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade

**INTRODUCTION:** The majority of human microbiota resides in the distal gut, although the origin and timing of gut colonization, diversity, composition or factors inducing gut microbiota dysbiosis are still largely unexplored. Development of high throughput molecular methods led to considerable gut microbiota research indicating that Lactic Acid Bacteria (LAB) represent important part of this complex ecosystem.

**AIM:** The aim of our research is to evaluate the associations between gut microbiota and various diseases, to decipher the role of LAB in the disease prevention and to investigate their potential for therapeutic applications as probiotics.

**METHOD:** Novel molecular approaches combining metagenomics analysis of 16S rDNA genes and host-microbe interactions revealed the key microbial players and their role in development, prevention and/or treatment of various diseases.

**RESULTS:** LAB positively influence gut microbiota diversity, modulate immune response and intestinal permeability and produce bioactive or regulatory metabolites. The protecting effect of Lactobacilli in prevention of inflammatory bowel disease was assigned to their ability to boost mucosal immunity. The role of lactobacilli in prevention and treatment of neurodevelopmental and neurodegenerative diseases could be related to influence on gut brain axis, particularly by the production of gamma-aminobutyric acid (GABA), short chain fatty acids (SCFAs) and other neuroactive molecules or exopolysaccharides, recognized as molecules with anti-nociceptive and anti-inflammatory activity. Moreover, the lactobacilli induce the expression of claudin, zonulin and tight junction protein suggesting their involvement in development of epithelial barrier. The antidiabetogenic, anti-inflammatory and antifibrotic ability of *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 points to the protective role of lactobacilli in diabetes type 1. Lactobacilli could induce autophagy as important mechanisms involved in suppression of liver injury.

**CONCLUSION** LAB producing bioactive molecules, such as exopolysaccharides, GABA and SCFAs, exhibit protective effects by influence on gut microbiota diversity and composition, immunomodulation and gut-brain axis.

**KEY WORDS** Host-microbe interaction, Microbiota, Lactic Acid Bacteria

**SESIJA: EKOLOŠKA  
MIKROBIOLOGIJA II ,  
FITOPATOLOGIJA  
SESSION: ECOLOGICAL  
MICROBIOLOGY II,  
PHYTOPATHOLOGY  
PREDAVANJA PO POZIVU/  
INVITED LECTURES**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
sa međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO

**PROBIOTICI KAO AGENSI POBOLJŠANJA KVALITETA ČOKOLADE**  
**PROBIOTIC AS AN AGENT OF ENHANCING CHOCOLATE QUALITY**

Laličić-Petronijević Jovanka <sup>1</sup>  
[jovankal@agrif.bg.ac.rs](mailto:jovankal@agrif.bg.ac.rs)

Popov-Raljić Jovanka <sup>2</sup>, Obradović Dragojlo <sup>1</sup>, Radulović Zorica <sup>1</sup>, Komes Draženka <sup>3</sup>, Pezo Lato <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun

<sup>2</sup> Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad

<sup>3</sup> Univerzitet u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

<sup>4</sup> Institut za opštu i fizičku hemiju, Beograd

**UVOD:** Potreba da korisne, probiotske bakterije budu dostupne tokom dužeg vremenskog perioda u odnosu na proizvode od mleka, koji ih tradicionalno najčešće sadrže, kao i težnja da bezbednije i lakše prežive uslove gastrointestinalnog trakta, nametnula je ideju primene probiotika na čokoladi kao nosaču.

**CILJ:** Cilj prikazanog istraživanja je bio da se proizvedu crne čokolade (44% i 75% kakao-delova) sa inkorporiranim komercijalnim probiotskim sojevima (*Lactobacillus acidophilus* NCFM® (D) i *Bifidobacterium lactis* HN019 (B)), da se prati njihova vijabilnost na dve temperature čuvanja (4°C i 20°C), kao i da se utvrde njihovi eventualni uticaji na sadržaj polifenolnih jedinjenja, antioksidativni kapacitet čokolada i senzorna svojstva kvaliteta (izgled, tekstura, aroma) tokom skladištenja.

**METODE:** Ispitivanje vijabilnost obavljano je utvrđivanjem broja jedinica koje formiraju kolonije (cfu/g). Određen je sadržaj ukupnih fenola (Folin-Ciocalteu-ovim testom), flavan-3-ola (vanilin indeks i reakcija sa p-DAC-om), ukupnih proantocijanidina (modifikovana metoda po Bathe-Smith-u), dok je antioksidativni kapacitet određen FRAP i ABTS testovima. Za senzornu evaluaciju korišćen je modifikovani bod sistem.

**REZULTAT:** Soj *Lactobacillus acidophilus* NCFM® (D) ispoljio je dobru vijabilnost (8-7 log cfu/g) tokom 180 dana skladištenja na obe temperature čuvanja, dok je kod soja *Bifidobacterium lactis* HN019 (B) utvrđen znatno brži pad vijabilnosti i donja granica funkcionalnosti (6 log cfu/g) već 90. dana. Prisustvo probiotika nije imalo uticaja na sastav ukupnih i pojedinačnih klasa fenola, niti na antioksidativnu aktivnost čokolada. Svi ispitivani uzorci probiotskih čokolada bili su u kategoriji odličnog senzornog kvaliteta tokom 180 dana skladištenja.

**ZAKLJUČAK:** Čokolada se pokazala kao dobar matriks za intestinalnu dostavu probiotika, kako zbog svojih protektivnih svojstava, tako i zbog duže trajnosti u odnosu na proizvode od mleka. Sa druge strane, obogaćivanjem probioticima čokolada postaje proizvod sa terapijskim efektima i dodatom vrednošću, što je u kombinaciji sa dobrobitima koje ispoljavaju polifenolna jedinjenja u njenom sastavu, čini jednom vrstom funkcionalne hrane.

**KLJUČNE REČI:** čokolade, probiotici, funkcionalnost

PROBIOTIC AS AN AGENT OF ENHANCING CHOCOLATE QUALITY

Laličić-Petronijević Jovanka <sup>1</sup>

[jovankal@agrif.bg.ac.rs](mailto:jovankal@agrif.bg.ac.rs)

Popov-Raljić Jovanka <sup>2</sup>, Obradović Dragojlo <sup>1</sup>, Radulović Zorica <sup>1</sup>, Komes Draženka <sup>3</sup>, Pezo Lato <sup>4</sup>

<sup>1</sup> University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Novi Sad

<sup>3</sup> University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology Zagreb, Serbia

<sup>4</sup> Institute of General and Physical Chemistry, Belgrade

<sup>1</sup> University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade-Zemun

<sup>2</sup> University of Novi Sad, Faculty of Science, Novi Sad

<sup>3</sup> University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb

<sup>4</sup> Institute for General and Physical Chemistry, Belgrade

**INTRODUCTION:** The need to make useful probiotic bacteria available over a longer period of time compared to durability of dairy products, that traditionally often contain them, and tendency to insure them to safer and easier survive the conditions of the gastrointestinal tract, imposed the idea to conduct the extensive testing of probiotics in chocolate as a carrier.

**THE AIM:** The aim of the present research was to produce dark chocolates (44% and 75% of cocoa parts) with incorporated commercial probiotic strains (*Lactobacillus acidophilus* NCFM® (D) and *Bifidobacterium lactis* HN019 (B)), to monitor their viability at different temperatures (4°C and 20°C), as well as to determine their possible effects on the polyphenolic compounds content, the antioxidative capacity and sensory properties of chocolates (appearance, texture, aroma) during storage.

**METHODS:** The examination of viability was performed by determining the number of colony-forming units (cfu/g). The content of total phenols (Folin-Ciocalteu essay), flavan-3-ol (vanillin index and reaction with p-DAC) and total proanthocyanidins (modified method according to Bathe-Smith) was determined, while the antioxidant capacity was determined by FRAP and ABTS essays. A modified point system was used for sensory evaluation.

**RESULT:** The strain of *Lactobacillus acidophilus* NCFM® (D) demonstrated good viability (8-7 log cfu/g) during 180 days of storage at both storage temperatures, while in the *Bifidobacterium lactis* HN019 (B), a significantly faster decline in viability was noticed and a lower functional limit (6 log cfu/g) was reached already on the 90<sup>th</sup> day. The presence of probiotics did not seem to have a significant impact on the content of total and individual classes of phenol, nor on the antioxidant activity of chocolates. All tested samples of probiotic chocolate were in the category of excellent sensory quality during 180 days of storage.

**CONCLUSION:** Chocolate proved to be a good matrix for intestinal delivery of probiotics, both due to its protective properties and longer shelf-life in relation to milk products. On the other hand, by enriching it with probiotics, chocolate becomes a product with therapeutic effects and added value, which, in combination with the benefits of polyphenolic compounds in its composition, ranks chocolate into a type of functional food.

**KEYWORDS:** chocolates, probiotics, functionality

**STREPTOMYCES SPP. U BIOKATALIZI – NAPREDAK U OTKRIĆU NOVIH BIOKATALIZATORA  
I NJIHOVOJ PRIMENI**  
**STREPTOMYCES SPP. IN BIOCATALYSIS TOOLBOX – ADVANCES IN NOVEL BIOCATALYST  
DISCOVERY AND APPLICATION**

Đokić Lidija

[lidijadjokic@imgge.bg.ac.rs](mailto:lidijadjokic@imgge.bg.ac.rs)

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe  
444a, Beograd

Iako su streptomicete najpoznatije kao izvor raznovrsnih biološki aktivnih molekula, ove bakterije sa kompleksnim metabolizmom su i dobar izvor biokatalitičkih enzima, koji se mogu primeniti u zelenim hemijskim transformacijama i proizvodnji farmaceutskih proizvoda odnosno biogoriva. Tehnološki napredak, pre svega u sekvenciranju DNK i razvoju bioinformatičkih alata za predikciju strukture i funkcije proteina, poboljšao je dostupnost enzima i omogućio njihovo adekvatno prilagođavanje za niz raličitih biotehnoloških procesa.

Održivi razvoj i pomak ka bioekonomiji su glavni pokretači naglog povećanja primene biokatalizatora u industriji. Shodno tome cilj ove studije je bila potraga za novim biokatalizatorima i analiza njihovog biokatalitičkog potencijala, kao slobodnih enzima ili kao celih bakterijskih sistema.

Enzimi koji bi mogli imati industrijsku primenu traženi su u sojevima roda *Streptomyces* iz Laboratorijske kolekcije. Biokatalitički potencijal odabranih prirodnih izolata za razgradnju polimera – polikaprolaktona (PCL) i polihidroksialkanoata (PHA), testiran je u model-sistemu komposta. Na osnovu analize sekvenciranih genoma sojeva koji su pokazali veći broj željenih enzimskih aktivnosti moguće je unaprediti biokatalizatore. U ovoj studiji identifikovani su novi biokatalizatori iz streptomiceta koji su pokazali veliki potencijal za primenu.

Dobijeni rezultati, zajedno sa literaturnim podacima, pokazuju da biokatalizatori iz bakterija roda *Streptomyces* poseduju poželjne osobine za primenu u industriji i potvrđuju da su streptomicete dobar izvor novih biokatalizatora.

**KLJUČNE REČI:** Biokataliza, *Streptomyces*, Genom



**STREPTOMYCES SPP. IN BIOCATALYSIS TOOLBOX – ADVANCES IN NOVEL BIOCATALYST  
DISCOVERY AND**

Đokić Lidija

[lidijadjokic@imgge.bg.ac.rs](mailto:lidijadjokic@imgge.bg.ac.rs)

Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Serbia

Although *Streptomyces* spp. are a renowned source of bioactive molecules, these bacteria with versatile metabolism are also powerful suppliers of biocatalytic enzymes for advanced biotechnological applications, such as green chemical transformations, and biopharmaceutical and biofuel production. The recent technological advances, especially in DNA sequencing coupled with computational tools for protein functional and structural prediction and the improved approaches to microbial diversity enabled the easier access to enzymes and the ability to tailor them to suit a wider range of biotechnological processes.

Sustainable development and the shift toward bioeconomy are the major drivers behind a dramatic increase in the utilization of biocatalysis. The aim of this study was to search for novel biocatalysts from *Streptomyces* and to explore their biocatalytic potential, either as free-enzymes or as whole-cell systems.

Laboratory collection of *Streptomyces* spp. was screened for enzymes with applicative potential. Selected strains were used as whole-cell biocatalysts for the degradation of polymers, polycaprolactone (PCL) and polyhydroxyalkanoate (PHA), in a compost model system. Genomes of strains exhibiting several desired enzyme activities were sequenced and mined for enzyme-coding genes to design biocatalysts. Novel biocatalysts with great applicative potential have been identified in this study.

These results, together with the published ones, prove that streptomycetes are a good source of novel biocatalysts. Hence, biocatalysts from *Streptomyces* spp. hold promises in terms of valuable properties and applicative industrial potential.

**KEYWORDS:** Biocatalysis, *Streptomyces*, Genome

**EVALUACIJA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI BILJNIH EKSTRAKATA; PRIMENOM *IN VITRO*  
METODA  
METHODS FOR *IN VITRO* EVALUATING ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HERBAL EXTRACTS**  
Antić Stanković Jelena

Farmaceutski fakultet Univerzitet u Beogradu, Srbija

Imajući u vidu sve češću pojavu rezistencije mikroorganizama prema konvencionalnim antibioticima, jedan od ciljeva istraživačkih timova širom sveta je ispitivanje antimikrobnog potencijala jedinjenja biljnog porekla i definisanje hemijskih sastojaka koji ispoljavaju antimikrobnu aktivnost. Teži se otkrivanju aktivnih principa od kojih potiče efikasnost, međutim, usled problema na koje su naučnici nailazili, često se dešavalo da dođe do pojave kontradiktornih rezultata. Razlog tome je uglavnom upotreba biljnih vrsta različitog porekla, načina gajenja, prikupljanja, sušenja i metoda za dobijanje njihovih ekstrakata, ali i neusaglašenost u okviru metodologije ispitivanja antimikrobnog efekta. Veoma važno je ustanoviti zajedničke parametre poput: standardizovanih biljnih materijala, korišćenih tehnika i tehnologija, medijuma za ispitivanje rasta i standardnih sojeva određenih mikroorganizama. Jedne od prvih metoda koje su se koristile jesu difuzione metode. Ono što ih odlikuje jeste jednostavnost izvođenja, ekonomičnost postupka, kao i lakoća očitavanja rezultata. Neke od sledećih metoda koje su se naučnicima učinile prikladnim za tok ispitivanja obuhvataju postupke istraživanja upotrebom tankoslojne hromatografije (metod direktne bioautografije, metod imerzione bioautografije). Karakteristike ovih metoda su jednostavnost i efikasnost u razdvajanju kompleksnih smeša. Zbog toga što materijali koji se koriste pri izvođenju nisu preterano skupi, ova ispitivanja se mogu sprovesti kako u sofisticiranim laboratorijama tako i u uslovima minimalne opremljenosti. Dosta se pažnje posvećuje upotrebi dilucionih metoda. Ove metode daju reprezentativne rezultate i mogućnosti kvantifikacije efekta ispitivanih antimikrobnih agenasa. Lako i jednostavno se može očitati minimalna inhibitorna koncentracija i izvršiti provera baktericidnog potencijala i odrediti minimalna baktericidna koncentracija. Nekada su se ove metode izvodile sa velikim zapreminama reagenasa (makrodiluciona) čime se povećava mogućnost greške, utroška vremena i materijala. U novije vreme se zbog svega ovoga teži razvoju mikrodilucionih metoda jer su dosta lakše za izvođenje i smanjuju utrošak vremena, troškova i najbitnije pojavu greške.

**KLJUČNE REČI:** antimikrobna aktivnost; biljni ekstrakti

**METHODS FOR *IN VITRO* EVALUATING ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HERBAL EXTRACTS**

Antić Stanković Jelena

Faculty of Pharmacy University of Belgrade, Serbia

Bearing in mind the increasingly frequent occurrence of microbial resistance to conventional antibiotics, one of the goals of research teams around the world is to study the antimicrobial potential of compounds of plant origin and identify chemical ingredients that exhibit antimicrobial activity. Intention is to uncover the active principles that exhibit efficiency, however, due to the problems that scientists have encountered, it often happened that contradictory results occurred. The reason for this is mainly the use of plant species of different origins, methods of cultivation, collection, drying and extraction methods, as well as non-conformity in the antimicrobial effect methodology. It is very important to establish common parameters such as: standardized plant materials, techniques and technologies used, medium for growth testing and standard strains of certain microorganisms. One of the first methods used were diffusion methods. What distinguishes them is the simplicity of performance, the cost-effectiveness of the process, and the ease of reading the results. Some of the following methods that have been considered appropriate to the scientists for research include thin layer chromatography (direct bioautography method, immersion bioautography method). The characteristics of these methods are simplicity and efficiency in separating complex mixtures. Because the materials used in the performance are not expensive, these tests can be carried out both in sophisticated laboratories and under conditions with minimum equipment.

A lot of attention is paid to the use of dilution methods. These methods give representative results and possibilities of quantifying the effects of the investigated antimicrobial agents. The minimal inhibitory concentration can be read easy and simply and the bactericidal potential can be checked and a minimum bactericidal concentration determined. Sometimes these methods were performed with large volumes of reagents (macrodilution), which increased the possibility of error and time and material consumption. More recently, due to afore mentioned, intention is to develop microdilution methods because they are much easier to perform, and the time consumption, cost and possibility of errors are reduced.

**KEYWORDS:** antimicrobial activity; medicinal plants

**POMOĆI FITOPATOGENIM BAKTERIJAMA DA DOBIJU GRIP?  
HELPING PLANT PATHOGENIC BACTERIA TO CATCH THE FLU?**

Gašić Katarina <sup>1</sup>

[gasicatarina@yahoo.com](mailto:gasicatarina@yahoo.com)

Krivokapić Marija<sup>1</sup>, Obradović Mina<sup>1</sup>, Šević Milan<sup>2</sup>, Kuzmanović Nemanja<sup>3</sup>, Prokić Anđelka<sup>4</sup>,  
Ivanović Milan<sup>4</sup>, Zlatković Nevena<sup>4</sup>, Obradović Aleksa<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Teodora Dražera 9, 11000 Beograd, Srbija.

<sup>2</sup>Hladnjače Brestovik, Partizanski put 1, 11306 Grocka, Srbija

<sup>3</sup>Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants (JKI), Institute for  
Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig, Nemačka

<sup>4</sup>Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Beograd, Srbija.

Bolesti bilja prouzrokovane fitopatogenim bakterijama smatraju se jednim od glavnih ograničavajućih faktora u poljoprivrednoj proizvodnji, smanjujući porast i prinos biljaka. Trenutnom strategijom kontrole biljnih bolesti, preporučuje se primena baktericida na bazi jedinjenja bakra. Međutim, usled ograničene efikasnosti i pojave sojeva bakterija otpornih prema ovim jedinjenjima, kao i povećane zabrinutosti za životnu sredinu, započeta su istraživanja alternativnih mera kontrole. Jedno od proučavanih rešenja je terapija fagima, koja podrazumeva primenu bakteriofaga (faga), virusa koji inficiraju bakterije.

Bakteriofagi su prirodni, široko rasprostranjeni neprijatelji bakterija, specifični prema domaćinu, jednostavni za proizvodnju i primenu. Nakon kontakta i infekcije ciljne bakterije, virulentni fag lizira ćeliju domaćina, što za posledicu ima oslobađanje nosivih virusa spremnih da inficiraju susedne ćelije. Kontinuirano povećanje populacije faga, kao rezultat infekcije i lizisa bakterijske ćelije, posebna je prednost u odnosu na ostale hemijske preparate.

Iako fagi predstavljaju najbrojnije mikroorganizme u biosferi, njihov opstanak je često ograničen nepovoljnim faktorima spoljne sredine koji prevladavaju u filiosferi, kao što su promene temperature i pH vrednosti sredine, kiša, isušivanje i sunčevo zračenje. Ovi faktori su uticali i na promenljivu efikasnost tretmana u početnim eksperimentima terapije fagima. Kako bi se smanjio efekat ovih faktora i produžio opstanak faga na površini biljaka, proučavane su različite strategije koje obuhvataju primenu faga u večernjim satima, korišćenje formulacija, primenu faga zajedno sa avirulentnim ili saprofitnim sojevima bakterija kako bi se pospešilo njihovo umnožavanje.

Tokom istraživanja, izvršili smo izolaciju i karakterizaciju nekoliko faga specifičnih prema ekonomski značajnim fitopatogenim bakterijama u Srbiji: *Xanthomonas euvesicatoria*, *Erwinia amylovora*, *Acidovorax citrulli* i *Ralstonia solanacearum*. U dosadašnjim eksperimentima, tretiranjem biljaka sa *X. euvesicatoria* i *E. amylovora* specifičnim fagima omogućena je efikasna zaštita od bolesti, što ih čini dobrim kandidatima za buduću primenu u kontroli bakterijske pegavosti paprike, odnosno bakterijske plamenjače jabučastih voćaka.

**KLJUČNE REČI:** bakteriofagi, biokontrola, bolesti bilja

*Istraživanja su realizovana u okviru projekta III46008 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

## HELPING PLANT PATHOGENIC BACTERIA TO CATCH THE FLU?

Gašić Katarina <sup>1</sup>

[gasicatarina@yahoo.com](mailto:gasicatarina@yahoo.com)

Krivokapić Marija<sup>1</sup>, Obradović Mina<sup>1</sup>, Šević Milan<sup>2</sup>, Kuzmanović Nemanja<sup>3</sup>, Prokić Anđelka<sup>4</sup>,  
Ivanović Milan<sup>4</sup>, Zlatković Nevena<sup>4</sup>, Obradović Aleksa<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Institute for Plant Protection and Environment, Teodora Drajzera 9, 11040 Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> Cold storages Brestovik, Partizanski put 1, 11306 Grocka, Serbia

<sup>3</sup> Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants (JKI), Institute for  
Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig, Germany

<sup>4</sup> University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Nemanjina 6, 11080 Belgrade, Serbia

Plant diseases caused by pathogenic bacteria are one of the major limiting factors in agricultural production, reducing the plant growth and yield. Current disease control programs recommend the use of bactericides based on antibiotics and copper compounds. However, the emergence of bacterial strains resistant to the bactericides, as well as increased concern about pesticides' persistence and residues, initiated research of alternative disease control strategies. One of the investigated solutions was phage therapy, the use of bacteriophages (phages), viruses that infect bacteria.

Bacteriophages are natural widespread bacterial enemies, host specific, and simple for cultivation and management. Following the contact and attachment to the target bacterium, virulent phage lyses the host cell releasing the numerous progeny phages ready to infect neighbouring bacteria. The continuous increase in the phage population, as a result of bacterial cell infection and lysis, is a distinct advantage over chemically based bactericides.

Although phages are the most abundant biological entity in the biosphere, their survival is limited by negative effects of different environmental factors, which prevail in the phyllosphere, such as variation of temperature and pH, rain, desiccation, and sunlight irradiation. This contributed to the inconsistent efficacy of phage treatments in the early experiments of bacteriophage therapy. However, different strategies were employed to extend phage survival on plant surface, including application of phage in the evening, use of protective formulation or joint application of a susceptible avirulent or saprofitic bacterial strain in order to support the phage replication.

We isolated and characterized several bacteriophages specific to the economically important plant pathogenic bacteria in Serbia, including *Xanthomonas euvesicatoria*, *Erwinia amylovora*, *Acidovorax citrulli* and *Ralstonia solanacearum*. So far, the plant treatments with *X. euvesicatoria* and *E. amylovora* specific phages provided efficient disease control suggesting that these host-specific phage strains could be good candidates for biological control of pepper bacterial spot and fire blight, respectively.

**KEY WORDS:** bacteriophages, biocontrol, plant disease

*This research was supported by the project III46008 financed by Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia.*

**SESIJA: EKOLOŠKA**  
**MIKROBIOLOGIJA II,**  
**FITOPATOLOGIJA**  
**SESSION: ECOLOGICAL**  
**MICROBIOLOGY II,**  
**PHYTOPATHOLOGY**

**USMENE PREZENTACIJE/ ORAL**  
**PRESENTATION**

**XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE**  
**sa međunarodnim učešćem**  
**MIKROMED 2018 REGIO**

**12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS**  
**with international participation**  
**MICROMED 2018 REGIO**

**BIOLOŠKI MONITORING CIJANOBAKTERIJA U AKUMULACIJI VRUTCI**  
**BIOLOGICAL MONITORING OF CYANOBACTERIA IN VRUTCI ACCUMULATION**

Knežević Goran <sup>1</sup>

Stamenković Boško <sup>1</sup>, Stefanović Slobodan <sup>1</sup>, Milošević Nevena <sup>1</sup>, Vukašinović Marina <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultet za primenjenu ekologiju Futura, Univerzitet Singidunum, Beograd

<sup>2</sup>JKP Vodovod, Užice

**UVOD:** Cvetanje cijanobakterija u akvatičnim ekosistemima, koje se može definisati kao pojava više od 10.000 ćelija po mililitru vode, je izuzetno značajan i globalno prisutan ekološki problem. Ključni problem u vezi sa cvetanjem cijanobakterija je produkcija toksičnih sekundarnih metabolita – cijanotoksina. Najzastupljeniji su cijanotoksini iz grupe mikrocistina koji imaju hepatotoksičan efekat, mogu dovesti do pojave kancera jetre, ali negativno utiču i na druge organe i funkcije organizma. U radu su prikazani rezultati biološkog monitoringa cijanobakterija akumulacije Vrutci koja je korišćena za vodosnabdevanje grada Užica do decembra 2013. godine kada je zabeleženo masovno cvetanje cijanobakterija vrste *Planktothrix rubescens*. To je filamentozna i potencijalno toksična cijanobakterija koja proizvodi hepatotoksične mikrocistine, pa je redovan monitoring neophodan, posebno imajući u vidu da postoji namera da se ponovo uspostavi vodosnabdevanje grada Užica iz akumulacije Vrutci.

**CILJ:** Određivanje brojnosti vrste *Planktothrix rubescens* na vertikalnom profilu akumulacije Vrutci u blizini vodozahvata kod brane.

**METOD:** Uzorkovanje vode je vršeno tromesečno i urađena su tri uzorkovanja: 08.09.2017., 09.12.2017. i 12.03.2018. godine. Uzorci su uzeti Wildco bocom za dubinsko uzorkovanje vode. Uzeti su uzorci iz površinskog sloja vode (dubina 0,3m) i duž vodenog stuba na dubinama od 3, 7 i 30m. U laboratoriji je izvršeno mikroskopiranje nativnih preparata na svetlosnom mikroskopu. Iz uzoraka vode u kojima je registrovana najveća koncentracija *P. rubescens* uzeti su poduzorci koji su nakon taloženja u sedimentacionim komoricama posmatrani na invertnom mikroskopu (Utermöhl-ova metoda).

**REZULTATI:** Vrsta *Planktothrix rubescens* je detektovana u svim uzetim uzorcima vode, na svim dubinama u sva tri termina uzorkovanja. Najveća brojnost je izmerena na dubini od 7m u sva tri termina uzorkovanja. U prvom terminu (08.09.2017.) utvrđena je brojnost *P. rubescens* od 133.000 ćel/ml. Cvetanje vode je bilo u toku, ali bez vidljivih manifestacija na površini u vidu purpurno-crvene skrame, koja se pojavila dve nedelje kasnije. U drugom terminu (09.12.2017.) brojnost je iznosila 4000 ćel/ml. U trećem terminu uzorkovanja (12.03.2018.) određena je brojnost od 138.500 ćel/ml, što ukazuje na ponovno cvetanje vode.

**ZAKLJUČAK:** U Republici Srbiji ne postoji legislativa kojom se propisuju MDK vrednosti cijanobakterija i cijanotoksina, ali prema preporukama SZO brojnost cijanobakterija u akumulaciji Vrutci ukazuje na opasnost visokog rizika (preko 100.000 ćel/ml). U ovakvim okolnostima se preporučuje obustavljanje procesa prerade vode i obezbeđivanje vodosnabdevanja iz alternativnih izvora.

**KLJUČNE REČI:** cijanotoksini, akumulacija Vrutci, *Planktothrix rubescens*

## BIOLOGICAL MONITORING OF CYANOBACTERIA IN VRUTCI ACCUMULATION

Knežević Goran <sup>1</sup>

Stamenković Boško <sup>1</sup>, Stefanović Slobodan <sup>1</sup>, Milošević Nevena <sup>1</sup>, Vukašinović Marina <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Applied Ecology, University Singidunum, Belgrade

<sup>2</sup> Public communal company "Vodovod", Užice, Serbia

**INTRODUCTION:** Cyanobacteria bloom in aquatic ecosystems, defined as a phenomenon of more than 10.000 cells per milliliter of water is an extremely significant and globally present environmental problem. A major problem with cyanobacterial booming is with the production of toxic secondary metabolites – cyanotoxins. The most abundant are cyanotoxins from the group of microcystins that have a hepatotoxic effect, can lead to liver cancer, but also adversely affect other organs and functions of the organism. This paper presents the results of biological monitoring of the cyanobacteria of the Vrutci accumulation that was used for the water supply of the city Uzice until December 2013 when the mass blooming of cyanobacteria *Planktothrix rubescens* occurred. This is a filamentous and potentially toxic cyanobacterium that produce hepatotoxic microcystins, so regular monitoring is necessary, especially considering that there is an intention to re-establish the water supply of the city Uzice from the Vrutci reservoir.

**OBJECTIVE:** Determination of the abundance of the *Planktothrix rubescens* on the vertical profile of the reservoir Vrutci near the dam.

**METHOD:** Water sampling was done quarterly and three samples were taken: 08.09.2017., 09.12.2017., and on 12.03.2018. Samples were taken with Wildco bottle for deep water sampling. Samples were taken from the surface layer of water (depth 0,3m) and at the depth of the water column at 3, 7 and 30m. Microscopy of native samples on a light microscope was performed in the laboratory. From water samples in which the highest concentration of *P.rubescens* was registered subsamples were taken, sedimented in chambers and observed on the inverted microscope (Utermöhl's method).

**RESULTS:** The species *Planktothrix rubescens* was detected in all water samples, at all depths in all three sampling periods. The highest abundance was detected at a depth of 7m in all three sampling periods. In the first term (08.09.2017.) the abundance was 133.000 cells/mL. The blooming was in progress, but without visible manifestations on the surface as a purple-red film, which appeared two weeks later. In second term (09.12.2017.) the abundance was 4000 cells/mL. In the third sampling term (12.03.2018.) the abundance was 138. 500 cells/mL, which indicated bloom reappearance.

**CONCLUSION:** There is no legislation in the Republic of Serbia that prescribes MPC values of cyanobacteria and cyanotoxins, but according to the WHO recommendations, the number of cyanobacteria in the Vrutci accumulation indicates a high risk (over 100. 000 cells / mL). In these circumstances, it is recommended to suspend the process of water treatment and provide water supply from alternative sources.

**KEYWORDS:** cyanotoxins, Vrutci accumulation, *Planktothrix rubescens*



**SESIJA: EKOLOGIJA**

**SESSION: ECOLOGY**

**POSTER PREZENTACIJE/ POSTER**

**PRESENTATIONS**

**XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE**  
sa međunarodnim učešćem  
**MIKROMED 2018 REGIO**

**12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS**  
with international participation  
**MICROMED 2018 REGIO**

**GENETIČKA KARAKTERIZACIJA XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS  
POREKLOM SA RAZLIČITIH DOMAĆINA UPOTREBOM PFGE I REP-PCR METODA  
GENETIC CHARACTERIZATION OF XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS  
ISOLATES FROM DIFFERENT HOSTS USING PFGE AND REP-PCR TECHNIQUES**

Popović Tatjana<sup>1</sup>

[tanjaizbis@gmail.com](mailto:tanjaizbis@gmail.com)

Jelušić Aleksandra<sup>2</sup>, Mitrović Petar<sup>3</sup>, Stanković Slaviša<sup>4</sup>, Lozo Jelena<sup>4</sup>, Nikolić Ivan<sup>4</sup>, Berić Tanja<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, Srbija;

<sup>2</sup>Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija;

<sup>3</sup>Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Srbija;

<sup>4</sup>Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

**UVOD:** Crna trulež kupusnjača, prouzrokovana fitopatogenom bakterijom *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) jedna je od najvažnijih i destruktivnih bolesti koja u celom svetu, a poslednjih godina i kod nas izaziva velike ekonomske štete. Ova bakterija napada sve gajene predstavnike porodice *Brassicaceae*. Infekciju vrši putem lisnih hidatoda i ozleda i multiplicira se kroz vaskularno tkivo prouzrokujući lezije u obliku slova V.

**CILJ:** Cilj istraživanja ovog rada je ispitivanje genetičkog diverziteta 122 izolata Xcc, poreklom sa šest različitih domaćina (brokoli, kupus, karfiol, raštan, kelj i keleraba), koji su pokazivali simptome crne truleži. Uzorci sa obolelih biljaka su prikupljeni na nekoliko različitih lokaliteta na teritoriji Srbije u 2014. godini. Svi testirani izolati su preliminarno identifikovani kao Xcc na osnovu morfoloških i odgajivačkih odlika, patogenosti i molekularnih metoda PCR primenom specifičnog para prajmera XCF/XCR i sekvencioniranja *gyrB* gena.

**METOD:** Genetička karakterizacija je obuhvatila primenu dve molekularne metode: elektroforezu u pulsirajućem polju (PFGE) i umnožavanje ponavljajućih elemenata (rep-PCR) korišćenjem prajmera komplementarnih određenim ponavljajućim ekstragenim (REP-PCR), intergenim (ERIC-PCR) i BOX elementima (BOX-PCR).

**REZULTAT:** ERIC- i REP-PCR fingerprinting tehnike razdvojile su sve Xcc izolate u četiri grupe, za razliku od BOX-PCR i PFGE tehnika, koji su dali iste paterne u slučaju svih testiranih izolata. Značajna korelacija između domaćina sa kog su izolati dobijeni kao i geografske distribucije poređenjem sa razlikama u dobijenim DNK fingerprinting paternima nije pronađena.

**ZAKLJUČAK:** Rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju genetičku heterogenost Xcc populacije, što je u korelaciji sa prethodnim istraživanjima genetičkog diverziteta Xcc izolata, i iako verovarno klonalna u Srbiji, na šta ukazuju rezultati PFGE analize, dodatna analiza je neophodna.

**KLJUČNE REČI:** Crna trulež, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, diverzitet

**Zahvalnica:** Ovaj rad je finansijski podržan od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, u okviru projekata broj III43010 i OI173026.

**GENETIC CHARACTERIZATION OF XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS  
ISOLATES FROM DIFFERENT HOSTS USING PFGE AND REP-PCR TECHNIQUES**

Popović Tatjana <sup>1</sup>

[tanjaizbis@gmail.com](mailto:tanjaizbis@gmail.com)

Jelušić Aleksandra<sup>2</sup>, Mitrović Petar<sup>3</sup>, Stanković Slaviša<sup>4</sup>, Lozo Jelena<sup>4</sup>, Nikolić Ivan<sup>4</sup>, Berić Tanja<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> Institute for Multidisciplinary Research, University of Belgrade, Serbia

<sup>3</sup> Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad, Serbia

<sup>4</sup> Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

**BACKGROUNDS:** Black rot caused by phytopathogenic bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) is one of the most important and destructive bacterial diseases which causes enormous economic damages on crucifer crops worldwide, and lately in our country as well. This serious and destructive vascular disease is present in all cultivated *Brassicaceae* crops. The infection mainly spreads through the leaf hydathodes and injuries, systematically moving through the vascular tissue, which all leads to the formation of necrotic V-shaped lesions.

**OBJECTIVES:** The aim of this study was to gain insight into the genetic diversity of one hundred and twenty two Xcc isolates obtained from six different crucifers (broccoli, cabbage, cauliflower, collard greens, kale and kohlrabi) with black rot symptoms. Samples were collected from different regions in Serbia in 2014. All tested isolates were preliminary identified as Xcc based on morphological and cultural characteristics, pathogenicity, PCR with specific primer set XCF/XCR and *gyrB* gene sequencing.

**METHODS:** Study of genetic diversity included two molecular typing methods: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) of repetitive extragenic palindromic (REP-PCR), enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR) and BOX elements (BOX-PCR).

**RESULTS:** ERIC- and REP-PCR fingerprinting techniques divided all Xcc isolates into four groups, unlike BOX-PCR and PFGE which yielded same banding patterns for each of the tested isolates. Based on the obtained banding patterns, significant correlation between hosts from which the isolates were obtained, as well as between their geographic distributions was not observed.

**CONCLUSIONS:** The results obtained in this work indicate that Xcc population is genetically diverse, which is in correlation with previous findings of genetic diversity within Xcc strains, although it is probably clonal in Serbia, according to PFGE, but additional analysis is required.

**KEYWORDS:** Black rot, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, diversity

**ACKNOWLEDGMENT:** This study was funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Serbia, Projects III43010 and OI173026.

BIODEGRADACIJA 2,6-DI-TERC-BUTILFENOLA POMOĆU OKSIGENAZA IZ PSEUDOMONAS  
AERUGINOSE SAN AI  
BIODEGRADATION OF 2,6-DI-TERT-BUTYLPHENOL BY OXYGENASES FROM PSEUDOMONAS  
AERUGINOSA SAN AI

Medić Ana <sup>1</sup>

[ana.medic@med.bg.ac.rs](mailto:ana.medic@med.bg.ac.rs)

Stojanović Ksenija<sup>2</sup>, Karadžić Ivanka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut za Hemiju u medicini, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

<sup>2</sup>Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

2,6-Di-terc-butilfenol (2,6-DTBP) je industrijski važna supstanca koja se koristi kao intermedijer za sintezu i proizvodnju različitih fenolnih jedinjenja velike molekulske mase. Takođe, 2,6-DTBP se upotrebljava kao antioksidans u plastici, inhibitor oksidacije i stabilizator za gorivo, ulje i benzin. To je opasna i veoma otrovna supstanca za vodeni svet. Biodegradacija se smatra pogodnom metodom za uklanjanje 2,6-DTBP iz kontaminiranog područja. U ovom radu istražena je aktivnost enzima iz soja *Pseudomonas aeruginosa* san ai uključenih u gornji i donji put biodegradacije aromatičnih jedinjenja, kako bi se odredila specifičnost metaboličkog puta degradacije 2,6-DTBP.

*P. aeruginosa* san ai je izolovan iz industrijskog, alkalog, mineralnog ulja za sečenje metala. Kultura je uzgajana na 30 °C 48 h na Luria-Bertani (LB) podlozi pod aerobnim uslovima. Biomasa je sakupljena, homogenizovana, centrifugirana i korišćena za merenje enzimskih aktivnosti. Enzimska aktivnost mono- i dioksidaze je određena spektrofotometrijski i amperometrijski pomoću kiseonične elektrode na različitim supstratima.

Detektovana je aktivnost svih ispitivanih oksigenaza. Specifična aktivnost (U/mg) monooksigenaze hidrosilaze na: 2,6-DTBP i terc-butil alkoholu je 2.64 i 0.84, redom. Aktivnost dioksidaze na 2,6-DTBP određena amperometrijski iznosila je 0.02. Aktivnost 1,2-dioksidaze na: 2,6-DTBP, kateholu i Na-benzoatu kao model supstancama iznosila je: 0.3, 0.09 i 0.2, redom. Aktivnost 2,3-dioksidaze na kateholu iznosila je 0.14 dok na Na-benzoatu i 2,6-DTBP aktivnosti nije bilo.

Naši rezultati pokazuju da se degradacija 2,6-DTBP odigrava dejstvom hidrosilaze na aromatični prsten kao i na terc-butil grupu, nakon čega aktivnošću 1,2-dioksidaze dolazi do otvaranja aromatičnog prstena.

**KLJUČNE REČI:** 2,6-Di-terc-butilfenol, oksigenaze, *Pseudomonas aeruginosa* san ai

**BIODEGRADATION OF 2,6-DI-TERT-BUTYLPHENOL BY OXYGENASES FROM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SAN AI**

Medić Ana <sup>1</sup>

[ana.medic@med.bg.ac.rs](mailto:ana.medic@med.bg.ac.rs)

Stojanović Ksenija<sup>2</sup>, Karadžić Ivanka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Belgrade, School of Medicine, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> University of Belgrade, Faculty of Chemistry, Belgrade, Serbia

2,6-Di-tert-butylphenol (2,6-DTBP) is an industrially important chemical and used as a synthetic intermediate for the production of higher molecular weight phenolic compounds. 2,6-DTBP has been also used as an antioxidants in plastics, oxidation inhibitor and stabilizer for fuel, oil and gasoline. It is hazardous and very toxic to aquatic life. Biodegradation is regarded as an promising alternative method to remove 2,6-DTBP from polluted area. In this study the activity of enzymes from *Pseudomonas aeruginosa* san ai involved in upper and lower biodegradation pathway of aromatic compounds, was investigated in order to determine the specificity of the metabolic pathway of degradation of 2,6-DTBP.

*P.aeruginosa* san ai was isolated from industrial alkaline mineral metal-cutting oil. Strain was cultivated at 30 °C for 48 h in Luria-Bertani (LB) medium under aerobic conditions. Biomass was collected, homogenized, centrifuged and used for enzyme measurements. The enzymatic activity of mono- and dioxygenases were determined spectrophotometrically and amperometrically by oxygen electrode on various substrates.

The activities of all tested oxygenases were detected. Specific activities (U/mg) of monooxygenase hydroxylase on: 2,6-DTBP and tert-butyl alcohol were 2.64 and 0.84, respectively. Activity of dioxygenase on 2,6-DTBP determined amperometrically was 0.02. Activity of 1,2-dioxygenase on: 2,6-DTBP and catechol and Na-benzoate as model substances were: 0.3, 0.09 and 0.2, respectively. Activity of 2,3-dioxygenase on catechol was 0.14 while no activity was detected on 2,6-DTBP and Na-benzoate.

Our results imply that 2,6-DTBP is degraded by the action of hydroxylase on aromatic ring as well as on tert-butyl group followed with 1,2-dioxygenase activity with ring cleavage.

**KEYWORDS:** 2,6-Di-tert-butylphenol, oxygenases, *Pseudomonas aeruginosa* san ai

**MIKROBIOLOŠKA ISTRAŽIVANJA VODE LITORALNOG REGIONA OHRIDSKOG JEZERA**  
**MICROBIOLOGICAL INVESTIGATIONS OF THE WATER IN THE LITTORAL REGION OF LAKE**  
**OHRID**

Lokoska Lenče

Hydrobiološki zavod, Naum Ohridski, 50, 6000 Ohrid, Makedonija

**UVOD:** Veoma čiste vode Ohridskog jezera čine ga jednim od najvećih rezervoara za pitke vode na svetu. Kvalitet površinskih voda je od izuzetnog značaja, kako za organizme koji u njima žive, tako i za ljude koji ih koriste za različite potrebe. Bakterije su idealne senzore za indikacije mikrobiološkog zagađenja površinskih voda.

**CILJ:** istraživanja je da se utvrdi sastav i dinamika zajednice mikroorganizama, kvalitet vode i antropogeni uticaj na trofiju Ohridskog jezera. Istraživanja su obavljena tokom 2017 godine.

**METOD:** Korišćene su standardne mikrobiološke metode, sa opštim i selektivnim hranljivim podlogama za identifikaciju pojedinih fizioloških grupa bakterija, kao i metode membranske filtracije za koliforme, enterokoke, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* i *Aeromonas*. Koliformne bakterije i *E. coli* su detektovani na Merck-ovom ChromoCult® Coliform Agar.

**REZULTAT:** Mikrobiološke analize vode litorala Ohridskog jezera ukazuju na slaba i umerena opterećenja organskim polutantima. Sastav zajednice bakterija menja se u funkciji abiotskih i biotskih faktora sredine, stepena eutrofikacije, kao i antropogenog delovanja. Dominantne bakterije su oligotrofne, izuzev u proleće, kada su brojnije heterotrofne. Zajedničko za ispitivane fiziološke grupe bakterija je da imaju vrlo sličnu sezonsku dinamiku i relativno malu abundantnost. Proteolitske, amilolitske, lipolitske, celulolitske, azotofiksatorne, fosfomineralizatorne i fosfomobilizatorne bakterije pokazuju maksimum razvoja u period leto-jesen, a minimum u zimskom periodu. Sezonske sukcesije ovih grupa zavise od prirode i količine organskih komponenti u akumulaciji. *Aeromonasi* su identifikovane kod sve ispitivane uzorke vode i njihova brojnost je u korelaciji sa broju fekalne koliformne bakterije. Mikrobiološka istraživanja pokazuju organsko i fekalno zagađenje vode jezera u blizini naselja i riječnih utoka.

**ZAKLJUČAK:** Kvalitativni sastav zajednice mikroorganizama ukazuje na početak eutrofikacije, pa je neophodno preduzeti mere stalne kontrole kvaliteta i zaštite vode litorala Ohridskog jezera. Detaljno poznavanje fekalnog zagađenja u vodenim sredinama je od ključnog značaja za aktivnosti upravljanja vodama u cilju održavanja bezbednih voda u rekreativne i ekonomske svrhe.

**KLJUČNE REČI:** bakterije, kvalitet vode

**MICROBIOLOGICAL INVESTIGATIONS OF THE WATER IN THE LITTORAL REGION OF LAKE  
OHRID**  
Lokoska Lenče

Hydrobiological Institute, Naum Ohridski, 50, 6000 Ohrid, Macedonia

**INTRODUCTION:** The very clean waters of the Lake Ohrid are making it one of the largest drinking water reservoir in the world. The quality of surface waters is a matter of extremely great importance, not only for the organisms living in these waters, but also for human beings who use them for various purposes. The bacteria are ideal sensors for the indication of microbial pollution of the surface water bodies.

**Aim** of these investigations was to determine composition and dynamics of microbial community, water quality and anthropogenic influence on the trophic state of the Lake Ohrid during 2017.

**MATERIAL AND METHODS:** Standard microbiological methods were used, with general and selective nutrient media for identification of some physiological groups of bacteria and methods for membrane filtration for koliforms, enterococci, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* and *Aeromonas*. The Coliforms and *E. coli* are detected on Merck's ChromoCult® Coliform Agar.

**RESULTS:** According to microbiological parameters, the littoral water of the Lake Ohrid belong to slightly and moderately polluted by organic matter. Composition of bacterial community varies in the function of abiotic and biotic facts, eutrophication as well as anthropogenic influence. Dominant bacteria are oligotrophic, except in spring when heterotrophic bacteria are in larger number. As for representation of physiological groups of bacteria the general conclusion is that all groups have very similar seasonal dynamics and relatively low abundance. It is a common characteristic of all investigated groups of bacteria (proteolytic, amilolytic, lipolytic, cellulolytic, nitrogen-fixing, phosphomineralizing and phosphomobilizing) showing maximum in summer-autumn and minimum in winter. Seasonal succession of these groups depend on the nature and the quantity of organic components in the reservoir. *Aeromonas* were identified from all the examined water samples and their number correlated with, that of fecal coliforms. Microbiological investigations show organic and fecal pollution of the lake water near the settlements and river mouths.

**CONCLUSION:** The qualitative composition of the microorganisms community points to the beginning of eutrophication in the some littoral localities and therefore it is necessary to take some measures of permanent control of quality and protection of Lake Ohrid. Detailed knowledge of fecal pollution in aquatic environments is crucial for watershed management activities in order to maintain safe waters for recreational and economic purposes.

**KEY WORDS:** bacteria, water quality

**MONITORING USEVA KROMPIRA NA PRISUSTVO RALSTONIA SOLANACEARUM  
MONITORING OF POTATO FIELDS TO PRESENCE OF RALSTONIA SOLANACEARUM**

Marković Sanja<sup>1</sup>

[sanja.markovic0986@gmail.com](mailto:sanja.markovic0986@gmail.com)

Popović Tatjana<sup>2</sup>, Stanković Slaviša<sup>3</sup>, Jelušić Aleksandra<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Deka inženjering d.o.o., Beograd, Srbija;

<sup>2</sup>Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, Srbija;

<sup>3</sup>Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija;

<sup>4</sup>Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

**UVOD:** *Ralstonia solanacearum* rasa 3 biovar 2 jedna je od najznačajnijih fitopatogenih bakterija zbog perzistentnosti, širokog kruga domaćina i geografske rasprostranjenosti. Prouzrokuje bakteriozno *uvenuće* kod 250 biljnih vrsta, među kojima su mnoge gajene kulture (krompir, paradajz, plavi patlidžan, muškatla, đumbir, banana i dr.) i mrku trulež krtola krompira.

**CILJ:** Cilj ovog istraživanja je utvrđivanje prisustva *R. solanacearum* na osnovu višegodišnjeg monitoringa krtola krompira.

**METOD:** Tokom četverogodišnjeg perioda (2013-2016.) na 13 lokaliteta u regionu Bačke i jednog iz Podunavlja pregledano je 98 uzoraka krtola krompira (11 sorti). Iz krtola sa simptomima mrke truleži vršena je izolacija na poluselektivnu SMSA podlogu. Metodom PCR, korišćenjem Ps-1/Ps-2 i OLY1/Y2 para prajmera i imunofluorescencije vršena je detekcija izolata na prisustvo *R. solanacearum*. Patogenost je testirana na mladim biljkama paradajza.

**REZULTAT:** *R. solanacearum* je tokom 2013. detektovana i identifikovana kod 1 uzorka (Lady Claire) poreklom iz Srpskog Mletića; tokom 2015. kod 2 (Crisps4all, VR 808) iz Srpskog Mletića i 1 (VR 808) iz Stapara; tokom 2016. kod 2 uzorka (Crisps4all, Brooke) iz Srpskog Mletića, 2 (Lady Claire, VR 808) iz Stapara, 2 (Lady Claire, Pirol) iz Sombora i 1 uzorka (Panda) iz Boleća. Na SMSA podlozi, nakon 3-4 dana inkubacije razvile su se bakterijske kolonije mlečno-beličaste sa centrom ružičaste do crvene boje, pljosnate, nepravilnog oblika, vodenaste. Kod 65 reprezentativnih izolata amplifikovani su fragmenti veličine 553 bp primenom Ps-1/Ps-2 i 288 bp primenom OLY1/Y2 para prajmera. Test imunofluorescencije je dokazao prisustvo fluorescentnih ćelija bakterije. Na mladim biljkama paradajza svi izolati su prouzrokovali *uvenuće* četvrtog dana od inokulacije.

**ZAKLJUČAK:** Rezultati rada pokazuju prisustvo *R. solanacearum* kod 11 uzoraka krompira u četiri lokaliteta za period 2013-2016.

**KLJUČNE REČI:** *Ralstonia solanacearum*, krompir, mrka trulež

**ZAHVALNICA:** Ovaj rad je finansijski podržan od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, projekti broj III43010 i OI173026.



**MONITORING OF POTATO FIELDS TO PRESENCE OF RALSTONIA SOLANACEARUM**

Marković Sanja <sup>1</sup>

sanja.markovic0986@gmail.com

Popović Tatjana<sup>2</sup>, Stanković Slaviša<sup>3</sup>, Jelušić Aleksandra<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Deka inženjering d.o.o., Belgrade, Serbia;

<sup>2</sup> Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia;

<sup>3</sup>Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

<sup>4</sup> Institute for Multidisciplinary Research, University of Belgrade, Serbia

**BACKGROUNDS:** *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 is one of the most important plant pathogenic bacteria because of its persistence, wide host range and widespread. It's causing bacterial wilt of over 250 plant species, including many cultivated crops (potato, tomato, eggplant, geranium, ginger, banana, etc.) and brown rot of potato.

**OBJECTIVES:** The aim of this study was to determine presence of *R. solanacearum* based on several years monitoring of potato tubers.

**METHODS:** During four-year period (2013-2016), 98 samples of potato tubers (11 cultivars), from 13 localities in Bačka and 1 in Podunavlje region were examined. Isolation from potato tubers with brown rot symptom was performed on semi-selective SMSA medium. PCR method using Ps-1/Ps-2 and OLY1/Y2 primers and immunofluorescence were used to detect presence of *R. solanacearum*. Pathogenicity was tested on young tomato plants.

**RESULTS:** In 2013, *R. solanacearum* was detected in 1 sample of potato tuber (Lady Claire) from Srpski Miletić; in 2015 in 2 (Crisps4all, VR 808) from Srpski Miletić and 1 (VR 808) from Stapar; during 2016 in 2 (Crisps4all, Brooke) from Srpski Miletić, 2 (Lady Claire, VR 808) from Stapar, 2 (Lady Claire, Pirol) from Sombor and 1 (Panda) from Boleč. Milky-white, with pink to red centre, flat, irregular, fluidal colonies formed after 3-4 days of incubation on SMSA medium. A 553 bp and 288 bp fragments of 65 representative isolates were amplified using Ps-1/Ps-2 and OLY1/Y2 primer pairs, respectively. IF test proved presence of fluorescent bacterial cells. All strains caused wilting on tomato seedlings four days after inoculation.

**CONCLUSIONS:** The results of this study detected presence of *R. solanacearum* on 11 potato samples isolated from four locations during period from 2013-2016.

**KEYWORDS:** *Ralstonia solanacearum*, potato, brown rot

**ACKNOWLEDGMENT:** This study was funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Serbia, Projects III43010 and OI173026.

**ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ALCHEMILLA VULGARIS I FRANGULA ALNUS  
EKSTRAKATA NA ODABRANE BAKTERIJSKE SOJEVE  
ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ALCHEMILLA VULGARIS AND FRANGULA ALNUS EXTRACTS  
ON SELECTED BACTERIAL STRAINS**

Đukanović Stefana<sup>1</sup>

[stefana93bk@gmail.com](mailto:stefana93bk@gmail.com)

Jović Hristina<sup>1</sup>, Tomić Nina<sup>1</sup>, Cvetković Stefana<sup>1</sup>, Nikolić Biljana<sup>1</sup>, Knežević-Vukčević Jelena<sup>1</sup>,  
Kekić Dušan<sup>2</sup>, Mitić-Ćulafić Dragana<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra za Mikrobiologiju, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet, Studentski trg 16, 11000  
Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet, Dr  
Subotića 1, 11000 Beograd, Srbija

**UVOD:** U cilju rešenja problema bakterijske rezistencije, poslednjih godina se intenzivno traga za novim antimikrobnim jedinjenjima naročito među prirodnim izvorima, tako da je od velikog interesa ispitati mehanizam delovanja biljnih ekstrakata na bakterijski rast. Biljke proizvode sekundarne metabolite koji služe kao osnova za produkciju sintetičkih jedinjenja koja mogu imati značajnu ulogu u farmaceutskoj industriji. Jedna od strategija u borbi protiv sve veće rezistencije bakterija na antibiotike jeste primena antibiotika u kombinaciji sa biljnim ekstraktima. Na taj način bi se smanjila količina antibiotika u upotrebi i povećala njegova efikasnost.

**CILJ:** Cilj rada bio je testirati efekat vodeno-etanolnih ekstrakata *Alchemilla vulgaris* i *Frangula alnus* na rast određenih bakterijskih sojeva iz ATCC kolekcije koji su rezistentni na veliki broj antibiotika i česti su uzročnici bolničkih infekcija.

**METOD:** Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) određivana je mikrodilucionom metodom, dodavanjem resazurina kao indikatora vijabilnosti ćelija. Utvrđivanje tipa interakcije između ekstrakata i streptomocina rađeno je metodom šahovske table ("checkerboard assay"). Kako bi se potvrdio potencijalni sinergistički efekat antibiotika u kombinaciji sa ekstraktima urađen je "Time-kill assay".

**REZULTATI:** Ekstrakti i streptomycin pokazali su inhibitorni efekat na bakterijski rast. Za određivanje tipa interakcije antibiotika i ekstrakata korišćene su koncentracije opsega 8 mg/mL-0.0625 mg/mL za ekstrakte i 50 µg/mL-1.56 µg/mL za streptomycin. Subinhibitorne koncentracije u kombinaciji testirane u opsegu od 62,5 µg/mL-250 µg/mL za ekstrakte i od 1,625 µg/mL-6,25 µg/mL za streptomycin pokazale su sinergistički efekat.

**ZAKLJUČAK:** Oba ekstrakta su pokazala antibakterijsku aktivnost i zbog njihovog sinergizma sa streptomycinom mogu se preporučiti za dalja istraživanja. Najosetljiviji soj bio je *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 33591.

**KLJUČNE REČI:** MIC, checkerboard, time-kill

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *ALCHEMILLA VULGARIS* AND *FRANGULA ALNUS* EXTRACTS  
ON SELECTED BACTERIAL STRAINS**

Đukanović Stefana<sup>1</sup>  
[stefana93bk@gmail.com](mailto:stefana93bk@gmail.com)

Jović Hristina<sup>1</sup>, Tomić Nina<sup>1</sup>, Cvetković Stefana<sup>1</sup>, Nikolić Biljana<sup>1</sup>, Knežević-Vukčević Jelena<sup>1</sup>,  
Kekić Dušan<sup>2</sup>, Mitić-Ćulafić Dragana<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, University of Belgrade- Faculty of Biology, Studentski trg 16,  
11000 Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

**INTRODUCTION:** Nowadays, with the alarming incidence of antibiotic resistance in microorganisms, there is a need for effective alternatives. It is therefore of interest to reexamine the way in which plant extracts delay or inhibit the growth of bacteria and apply them to actual practice. All plants produce secondary biomolecules which are used as the basis for the production of valuable synthetic compounds such as pharmaceuticals. Recently, as a new strategy to enhance antimicrobial activities of commercial antibiotics against bacterial infections, the combination of plant extracts and antibiotics is developing.

**AIM:** The aim of the study was to test the effect of aqueous-ethanolic extracts of *Alchemilla vulgaris* and *Frangula alnus* against bacterial strains from the ATCC collection known to be resistant to a large number of antibiotics and are common causes of the hospital infections.

**METHODS:** The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method, with adding resazurine-a cell viability indicator. Determination of the type of interaction between extracts and streptomycin checkerboard assay was applied. To confirm the potential synergy, "Time-kill assay" was performed.

**RESULTS:** To determinate the type of antibiotic and extracts interaction, concentrations in the range of 8 mg/ mL-0.0625 mg/mL for extracts and 50 µg/mL-1.56 µg/mL for streptomycin were used. Combination of subinhibitory concentration in a range of 62.5 µg/mL-250 µg/mL for extracts and 1.625 µg/mL-6.25 µg/mL for streptomycin showed a synergistic effect. The range of values indicating potential synergism was 62.5 µg/mL-250 µg/mL for extracts and 1.625 µg/mL-6.25 µg/mL for streptomycin.

**CONCLUSION:** Both extracts showed an inhibitory effect on the bacterial growth and due to their synergistic activity with streptomycin they can be recommended for further study. The most sensitive strain was *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 33591.

**KEYWORDS:** MIC, checkerboard, time-kill

**PSEUDOMONAS AERUGINOSA SAN AI METABOLIZAM U MIKROAEROBIM USLOVIMA U  
PRISUSTVU KADMIJUMA  
METABOLISM OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA SAN AI IN MICROAEROBIC CONDITIONS  
INDUCED BY CADMIUM PRESENCE**

Rikalović G. Milena <sup>1</sup>

[milena.rikalovic@futura.edu.rs](mailto:milena.rikalovic@futura.edu.rs)

T. Izrael-Živković Lidija <sup>2</sup>, M. Karadžić Ivanka <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fakultet za primenjenu ekologiju Futura, Univerzitet Singidunum, Srbija

<sup>2</sup> Medicinski fakultet, Departman za hemiju, Univerzitet u Beogradu, Srbija

**UVOD:** Rod *Pseudomonas aeruginosa* je poznat po fascinantnom kapacitetu metabličke adaptacije kao odgovor na uslove sredine. Fiziološki mehanizmi adaptacije su deo kompleksne međučelijske mreže, koju ovaj mikrob koristi u procesu formiranja i opstanka biofilma kao i pri izlaganju stresu kao što je prisustvo teških metala. *P. aeruginosa* san ai je ekološki izolat koji je korišćena u studijama naše laboratorije vezano za ispitivanja ramnolipida, egzopolisaharida (EPS), ekstracelularnih enzima, lipaze i protease, i njihove primene u formulacijama detergenata, kao i u studijama koje su vezan za kapacitet soja za uklanjanje kadmijuma i hroma.

**CILJ:** Ispitivanje odgovora *P. aeruginosa* san ai na nivou proteoma, koji je indukovano alteracijom u dostupnosti kiseonika usled adaptacije na prisustvo kadmijuma i poređenje sa proteomskim profilom kulture koja nije bila izložena kadmijumu.

**METODE:** Proteini su frakcionisani gel hromatografijom i analizirani proteomiks pristupom zasnovanim na tačnoj hromatografiji i tandem masenoj spektrofotometriji kuplovanih sa bioinformatikom kako bi se identifikovali proteini.

**REZULTATI:** Izložen kadmijumu *P. aeruginosa* san ai se adaptira ne samo na intracelularnom nivou već menja i svoj ekscelularni prostor povećanom sintezom EPS koji formira ekstracelularni matriks u koji su ćelije uronjene. U novonastaloj egzogenoj strukturi, transport kiseonika postaje otežan i ćelije koje su dublje u biofilmu, uprkos intenzivnoj aeraciji, se prilagođavaju nedostatku kiseonika i aktiviraju novu metaboličku putanju sa alternativnim akceptorima elektrona (piocijanin) ili u nedostatku akceptora fermentišu bez respiracije. Analiza proteoma je pokazala da je preživljavanje *P. aeruginosa* san ai u mikroaerobnim uslovima vezano za ATP sintezu i zasniva se na fermentaciji arginina i piruvata, kao i gliksilatnom šantu koji je indukovano kako bi se održala ćelijska homeostaza smanjenjem elektronskog fluksa.

**ZAKLJUČCI:** Naši rezultati su potvrdili da *P. aeruginosa* san ai izložen kadmijumu produkuje EPS, formira biofilm i modifikuje svoje metaboličke putanje u one koje korse kiseonik-deficitne uslove, iako je kultura gajena u aerobnim uslovima.

**KLJUČNE REČI:** *Pseudomonas aeruginosa*, kadmijum, proteomika, mikroaerobni metabolizam

**METABOLISM OF *Pseudomonas aeruginosa* san ai IN MICROAEROBIC CONDITIONS  
INDUCED BY CADMIUM PRESENCE**

Rikalović G. Milena <sup>1</sup>

milena.rikalovic@futura.edu.rs

Lidija T. Izrael-Živković<sup>2</sup>, Ivanka M. Karadžić<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Applied Ecology Futura, University of Singidunum, Serbia

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Department of Chemistry, University of Belgrade, Serbia

**INTRODUCTION:** Genus *Pseudomonas aeruginosa* is well known by its fascinating capacity of metabolic adaptation to environmental conditions. Physiological mechanisms of adaptation are part of complex cell network, which this microbe uses in biofilm formation and persistence, and environmental stress conditions such as presence of heavy metals. *P. aeruginosa* san ai is an environmental isolate previously used in various studies in our laboratory related to rhamnolipid, exopolysaccharide (EPS), the extracellular enzymes, lipase and protease, and their application in detergents as well as in study related to the organism's capacity for cadmium and chromium removal.

**THE AIM:** Proteomic response of *P. aeruginosa* san ai induced by oxygen availability alteration due to adaptation to presence of cadmium and comparison to proteomic profile in the cadmium free culture.

**METHODS:** Proteins from cadmium-amended and cadmium free *P. aeruginosa* san ai cultures were fractionated by gel exclusion chromatography and analyzed by a proteomic approach based on liquid chromatography and tandem mass spectrometry coupled with bioinformatics to identify proteins.

**RESULTS:** Exposed to cadmium, *P. aeruginosa* san ai not only changes conditions in its cells but also outside its cells by an enhanced synthesis of EPS to form a matrix in which the cell aggregates are immersed. In the newly formed extracellular structure, oxygen transport becomes critical and cells situated deeper in the biofilm, despite intensive aeration, endure oxygen deficiency and activate new metabolic pathways with alternative electron acceptors (pyocanin), or in the lack of acceptors, do not respire but ferment. Proteomic analysis showed that survival of *P. aeruginosa* san ai in microaerobic conditions can be correlated with ATP synthesis and it is based on arginine, pyruvate fermentation, and glyoxylate shunt, induced to maintain cellular redox homeostasis by diminishing electron flux.

**CONCLUSIONS:** Our results confirm that *P. aeruginosa* san ai exposed to cadmium synthesized EPS, formed biofilm and modified its metabolic pathways to those it utilizes in oxygen-deficient conditions, even though it was well aerated.

**KEY WORDS:** *Pseudomonas aeruginosa*, cadmium, proteomics, microaerobic metabolism

**VARIJABILNOST PENICILLIUM GLABRUM PROUZROKOVAČA PLAVE TRULEŽI LUKOVICA  
CRNOG LUKA**

**VARIABILITY OF PENICILLIUM GLABRUM CAUSAL AGENT OF BLUE MOLD OF ONION BULB**

Duduk Nataša

[natasadukic@yahoo.com](mailto:natasadukic@yahoo.com)

Lazarević Marina, Vučković Nina, Vico Ivana

Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet, Beograd

Crni luk (*Allium cepa* L.) je značajna povrtarska vrsta koja se koristi u ishrani ljudi zbog svojih hranljivih i lekovitih svojstava. Plava trulež je oboljenje koje se javlja tokom čuvanja biljaka i biljnih proizvoda, a prouzrokuju je gljive iz roda *Penicillium*. Posebno je izražena kod biljnih vrsta čiji se plodovi ili drugi biljni delovi dugo čuvaju, kao što su lukovice crnog luka. Jedan od prouzrokovaca plave truleži lukovica crnog luka u našoj zemlji je *Penicillium glabrum*. *P. glabrum* je široko rasprostranjena vrsta i na osjetljivom domaćinu, kao što je crni luk izaziva pojavu oboljenja i ekonomskih šteta tokom čuvanja.

**CILJ** ovog istraživanja je karakterizacija izolata *P. glabrum*, poreklom iz različitih lokaliteta i sorti crnog luka iz Srbije, na osnovu njihovih morfoloških, molekularnih, biohemijskih i patogenih odlika.

Patogeni izolati *P. glabrum* su okarakterisani na osnovu morfologije kolonija na diferencijalnim podlogama: Čapek kvasni agar (CYA), kvašćev agar sa saharozom (YES), sladni agar (MEA) i krompir dekstrozni agar (PDA). Izolati su molekularno okarakterisani na osnovu sekvenci dela gena za  $\beta$  tubulin. Produkcija ciklopiazonske kiseline i drugih alkaloida ispitana je primenom Ehrlich testa. Virulentnost izolata određena je na veštački inokulisanim lukovicama crnog sorte Holandski žuti, merenjem pečnika pega i unutrašnjih promena lukovica.

Na osnovu karakteristika kolonija uočena je pojava tri morfološke grupe. Analizom gena za  $\beta$  tubulin potvrđena je pripadnost izolata vrsti, ali je takođe utvrđeno prisustvo tri genotipa. Na lukovicama crnog luka izolati su ispoljili različitu virulentnost. Poređenjem ove tri karakteristike, utvrđeno je korelacija u virulentnosti izolata sa morfološkim i molekularnim karakteristikama. Svi testirani izolati su ispoljili negativnu reakciju u Ehrlich testu.

Ovim ispitivanjima utvrđeno je postojanje varijabilnosti izolata *P. glabrum* poreklom iz lukovica crnog luka u našoj zemlji u pogledu morfoloških, molekularnih i patogenih osobina. Uočeno je, takođe i da su ove osobine u međusobnoj korelaciji.

**KLJUČNE REČI:** virulentnost, beta tubulin, čuvanje

Rad je rezultat projekta III 46008 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

VARIABILITY OF *PENICILLIUM GLABRUM* CAUSAL AGENT OF BLUE MOLD OF ONION BULB

Duduk Nataša

[natasadukic@yahoo.com](mailto:natasadukic@yahoo.com)

Lazarević Marina, Vučković Nina, Vico Ivana

University of Belgrade – Faculty of Agriculture, Belgrade

Onion (*Allium cepa* L.) is an important vegetable crop which can be stored for several month to ensure its availability year round for consumption. Long storage produce are susceptible for disease, and onion bulbs are in this group. Blue mold is an important postharvest disease of onion bulbs and it is caused by several fungi in the genus *Penicillium*. In Serbia *Penicillium glabrum* is one of the causal agents of blue mold of onion bulbs. *P. glabrum* has wide host range and the presence of a susceptible host such as onion bulbs lead to future blue mould decay and postharvest losses.

**The aim** of this study was to characterize and compare isolates of *P. glabrum* based on their morphological, molecular, biochemical and pathogenic features.

Colony characteristics of pathogenic *P. glabrum* isolates were determined on different media: Czapek yeast extract agar (CYA), Malt extract agar (MEA), Yeast extract sucrose agar (YES) and Potato dextrose agar (PDA). Molecularly, isolates were characterized based on sequences of partial  $\beta$  tubulin gene. Biochemical properties for production of cyclopiazonic acid and other alkaloids were tested via Ehrlich test. Virulence was assessed on inoculated onion bulbs cv. 'Stuttgarter raisen', lesion diameters were measured and the bulbs were inspected for internal symptoms of infections.

Based on colony characteristics three morphological groups of isolates were observed.  $\beta$  tubulin gene confirmed identification and separated isolates in three genotypes. *P. glabrum* isolates expressed marked differences in virulence. Comparison of these three characteristics showed that variability in virulence of individual *P. glabrum* isolates corresponded to differences in their molecular and macromorphological characters. Absence of a violet ring was the reaction of *P. glabrum* isolates in Ehrlich test.

Variability within *P. glabrum* isolates from onion bulbs was observed. Morphological, molecular and virulence differences were in correspondance.

**KEY WORDS:** virulence,  $\beta$  tubulin, postharvest

This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Grant III46008).

**SESIJA: MIKROBIOLOGIJA HRANE**

**SESSION: FOOD MICROBIOLOGY**

**PREDAVANJA PO POZIVU/**

**INVITED LECTURES**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
sa međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO



## CLIMATE CHANGES AND FOODBORNE PATHOGENS

Najdenski M.Hristo

Department of Infectious Microbiology, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology,  
Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev Str., Bl. 26, 1113 Sofia, Bulgaria

Foodborne zoonoses are a significant and widespread public health threat – annually more than 315,000 human cases are confirmed and reported in the EU, but the real number is likely to be much higher. The most frequent bacterial pathogens in the food chain belong to the genera *Campylobacter* (229,213 human cases for 2015), *Salmonella* (94,625 human cases in 2015), *Yersinia* (7,202 human cases or 2015) and the species *Escherichia coli* (5,910 human cases in 2015) and *Listeria monocytogenes* (2,206 human cases in 2015). Many of those survive and proliferate both in the environment and in foods of plant and animal origin, regardless of storage conditions (cold temperature, vacuum packs, salt concentrations, etc.). Climate changes and antimicrobial resistance are the most important among the complex groups of risk factors and their interactions leading to the emergence of surprisingly severe foodborne infections in humans, as it was the *E. coli* infection in 2011 in Germany. The last EARS-Net report on antibiotic resistance highlights an especially worrying situation with regard to Gram (-) bacteria, wherein one of the most emerging threats is the significantly increasing resistance to life saving antibiotics in *E. coli* and other foodborne pathogens. Additional microbiological data will reveal the importance and potential risk of zoonotic foodborne infections depending on the temperature of cultivation. Standard and modern microbiological methods and approaches will contribute to effective monitoring and evaluation of foodstuff and will complement the overall strategy to ensuring food safety and protection the consumer's health.

**OD KOMBUHE DO KAFE SA GLJIVAMA. ISPITIVANJE RAZLIČITIH VRSTA GLJIVA I NJIHOVA  
KORIST PO ZDRAVLJE  
FROM KOMBUCHA TO MUSHROOM COFFEE. INVESTIATION OF DIFFERENT MUSHROOMS  
AND THEIR BENEFIT FOR HEALTH**

Nikšić Miomir

[miomir.niksic@gmail.com](mailto:miomir.niksic@gmail.com)

Klaus Anita

Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Institut za prehrambnu tehnologiju i biohemiju,  
Katedra za tehnološku mikrobiologiju, Nemanjina 6 Beograd-Zemun

Gljive-pečurke su vekovima prepoznate zbog svog ukusa i teksture ali i kao visoko vredna hrana koja je bogat izvor proteina, vlakana, vitamina i minerala. Međutim, mnoge jestive ali i određene nejestive gljive imaju i dragocene efekte po zdravlje ljudi jer sadrže biološki aktivne materije posebno polisaharide ali i fenolna jedinjenja koji se izoluju iz karpofora, spora, micelijuma ili podloge u kojoj se gaje. Utvrđeno je da preko 650 vrsta gljiva poseduju oko 130 medicinskih dejstva uključujući antioksidativna, snižavanje holesterola, antidijabetska, antimikrobna, antiparazitska koja se koriste i kao stimulatori imunološkog sistema ljudi i životinja, kod kardiovaskularnih bolesti, kancera i td. Poslednjih 50 godina pojavljuje se i novi pristup nazvan mikoterapija. Međutim, gljive postaju atraktivna funkcionalna hrana, dijetetski suplementi, nova klasa lekova farmaceutici iz gljiva, sredstva za zaštiti bilja i imaju ulogu u kozmetičkoj industriji. Globalna tržišna vrednost za gljve je 2013 bila \$29,427.92 miliona sa godišnjom projekcijom rasta od 9,5% i planira se da će dostići 2019 godine vrednost od \$50,034.12 miliona. (Markets & Markets).

S obzirom da gljive imaju sve značajniju ulogu u ishrani dat je pregled najznačajnijih vrsta hrane i pića gde se one mogu uspešno primeniti. Poslednja istraživanja sa primenom vrste *Ganoderma lucidum* u proizvodnji čaja od Kombuhe su pokazali da se može dobiti napitak sa zavidnim antibakterijskim i antioksidativnim efektom. Proizvodnja dijetetskih suplemenata sa ovom ali i vrstama *Lentinula edodes*, *Coriolus versicolor*, *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa*, je od velikog značaja i vrednosti u Aziji. Novi proizvodi obogaćeni ovim vrstama ili njihovim ekstraktima kao što su različite vrste rakija, biteri, pivo su imali prihvatljive senzorne ocene ali i novododatu vrednost. Predstavljeni su čaj, kafa, instant napitci, bezalkoholna pića, nudle, krekeri, pekarski proizvodi kao primeri kako se mogu stvoriti novi komercijalni proizvodi koji su obogaćeni sa dodatnom nutritivnom vrednošću i blagotvornim dejstvom na zdravlje.

**FROM KOMBUCHA TO MUSHROOM COFFEE. INVESTIATION OF DIFFERENT MUSHROOMS  
AND THEIR BENEFIT FOR HEALTH**

Nikšić Miomir

[miomir.niksic@gmail.com](mailto:miomir.niksic@gmail.com)

Klaus Anita

Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Department of Industrial Microbiology

Mushrooms were prized for centuries for their taste and texture, but also as high value foods that are rich source of proteins, fibers, vitamins and minerals. Many edible and certain non-edible mushrooms have valuable health benefits contain biologically active compounds like polysaccharides but also phenolic compounds which may be isolated from the carpophore, spores, mycelium or cultivation media. More than 650 species of mushrooms are thought to possess approximately 130 medicinal functions, including antioxidant, anti-hypercholesterolemia, antidiabetic effects, antimicrobial, antiparasitic and are using for treatment immune-system decline of human and animals, cardiovascular diseases, cancer treatment et. Mycotherapy acknowledged in the past 50 years as a new approach. But mushrooms are becoming dietary food, dietary supplementa, a new class of drugs "mushroom pharmaceuticals; natural bio-control agents in plant protection and cosmeceuticals. The global market for mushrooms was valued at \$29,427.92 million in 2013 with market is projected to grow at a CAGR of 9.5% from 2014 to reach \$50,034.12 million by 2019. (Markets and Markets). Since that mushrooms play an increasingly important role in nutrition, an overview of the most important food and drink types is provided where they can be successfully applied. Our latest research with the application of *Ganoderma lucidum* in tea from Kombucha showed that a beverage with an enviable antibacterial and antioxidant effect can be obtained. The production of dietary supplements with this and also the species *Lentinula edodes*, *Coriolus versicolor*, *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa* is of great importance and value in Asia. New products enriched with these species or their extracts, such as various types of brandy, bitters, beer had acceptable sensory evaluation but also the newly added value. Tea, coffee, instant drinks, soft drinks, noodles, crackers, bakery products are presented as examples of how new commercial products can be created that are enriched with additional nutritive value and a beneficial effect on health.

**ANALIZA REZULTATA ISPITIVANJA MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA NA PREHRAMBENIM  
PROIZVODIMA BILJNOG POREKLA, ISPITIVANIH U AKREDITOVANIM LABORATORIJAMA U  
PERIODU: 2010 - 2016. GODINA**

**ANALYSIS OF THE RESULTS OF THE EXAMINATION OF MICROBIOLOGICAL PARAMETERS  
ON FOOD PRODUCTS OF VEGETABLE ORIGIN, EXAMINED IN ACCREDITED LABORATORIES  
IN THE PERIOD: 2010 - 2016**

Vujovic Nenad

[nenad.vujovic@minpolj.gov.rs](mailto:nenad.vujovic@minpolj.gov.rs)

Ministarstvo poljoprivrede šumarstva i vodoprivrede

Do donošenja Zakona o bezbednosti hrane (Sl. glasnik RS, broj 41/09), institucije Republike Srbije su veoma stručno i odgovorno objavljivale godišnje analize bezbednosti hrane. To su bili podaci koji su u kombinaciji sa podacima o zaštiti stanovništva od zaraznih bolesti (zarazama izazvanim hranom) bili dragoceni za sve one koji se bave hranom u zemlji i inostranstvu. Usvajanje nove zakonske regulative i redefinisane nadležnosti rezultiralo je diskontinuitom u analizi podataka o ispitivanjima akreditovanih laboratorija, koja su se odnosila na hranu biljnog porekla.

Cilj ovog rada je i da se svim zainteresovanim subjektima (inspekciji, proizvođačima, investitorima, analitičarima i političarima) pruže informacije za period koji nije do sada pokriven bitnim podacima – činjenicama o ispitivanim uzorcima biljnog porekla po pitanju mikrobioloških kontaminanata.

U pripremi ovog rada korišćen je statistički i analitički metod.

**REZULTAT:** Ispitivano je 1.211.338 mikrobioloških parametara na 325.939 uzoraka. Procenat uzoraka sa bar jednim neispravnim ispitivanim parametrom je 1,64%;

- Najveći broj procentualnih nepravilnosti se odnosio na plesni i kvasce. Ispitivani su na 239.628 uzoraka. Nepravilnost je utvrđena kod 2.788 uzoraka (1,16%);
- Prisustvo Enterobacteriaceae su ispitivane na 168.948 uzoraka. Nepravilnost je utvrđena na 1.739 uzoraka (1,03%);
- Na trećem mestu su aerobne bakterije koje formiraju kolonije. Ispitivane su na 129.467 uzoraka. Nepravilnost je utvrđena na 946 uzorku. (0,73%);

**ZAKLJUČAK:** Polazeći od činjenice da se plesni pojavljuju najčešće kada uslovi u proizvodnim pogonima nisu zadovoljavajući, posebno po pitanju vlage, i činjenice da su među utvrđenim kontaminantima zastupljene i sulfidoredukujuće klostridije, E.coli, aerobne bakterije i Enterobacteriaceae, možemo zaključiti o nedovoljno dobrom higijenskom procesu i lošim higijenskim uslovima pri manipulaciji termički obrađenih, gotovih proizvoda, i o mogućnosti sekundarne, unakrsne kontaminacije, kao i lošim uslovima skladištenja.

**ANALYSIS OF THE RESULTS OF THE EXAMINATION OF MICROBIOLOGICAL PARAMETERS  
ON FOOD PRODUCTS OF VEGETABLE ORIGIN, EXAMINED IN ACCREDITED  
LABORATORIES IN THE PERIOD: 2010 - 2016**

Vujovic Nenad

[nenad.vujovic@minpolj.gov.rs](mailto:nenad.vujovic@minpolj.gov.rs)

Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management

Until the adoption of the Food Safety Act (Official Gazette of the Republic of Serbia, No. 41/09), the institutions of the Republic of Serbia published annual food safety analyzes. These data were combined with data on protection of the population against infectious diseases (food-borne diseases ) They were valuable for all who deal with food in the country and abroad.

Adoption of new legislation and redefinition of competencies resulted in discontinuity in the analysis of data on testing of accredited laboratories, which were related to plant origin food.

The aim of these works is to provide information for all stakeholders (inspectors, producers, investors, analysts and politicians) for a period that has not been included in the relevant data so far - facts about the tested plant samples on microbiological contaminants.

A statistical and analytical method was used in the preparation of this paper.

**THE RESULTS:** 1.211.338 microbiological parameters were tested on 325.939 samples. The percentage of samples with at least one incorrectly parameter was 1.64%;

- The highest number irregularities is related to mold and yeast. They were examined on 239,628 samples. Irregularity was found in 2,788 samples (1,16%);
- The presence of Enterobacteriaceae was tested in 168,948 samples. Irregularity was determined on 1,739 samples (1.03%);
- In third place are colonies of aerobic. They were examined on 129,467 samples. The irregularity was determined on a 946 sample. (0.73%);

**CONCLUSION:** Starting from the fact that molds occur most often when conditions in production facilities are not satisfactory, especially in terms of moisture, and the fact that among the contaminants identified and sulphide-reducing clostridia, E. coli, aerobic bacteria and Enterobacteriaceae, are present on insufficiently good hygienic process and poor hygienic conditions in manipulating thermally processed, final products, about the possibilities of secondary, cross contamination, and poor storage conditions.

**KONTROLA VIRUSA KOJI SE PRENOSE HRANOM  
CONTROL OF FOODBORNE VIRUSES**

Radin Dragoslava  
[dradin@agrif.bg.ac.rs](mailto:dradin@agrif.bg.ac.rs)

Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet, Beograd

Najvažniji virusi koji se prenose hranom, etiološki agensi virusnih alimentarnih oboljenja, humani norovirus (hNoV), hepatitis A virus (HAV), rotavirus (RoV), i u poslednje vreme sve češće zoonozni hepatitis E virus (HEV), predstavljaju ozbiljnu pretnju po zdravlje ljudi. Veliki broj epidemija koji se beleži širom sveta povezan je sa nekim od karakteristika ovih virusa, kao što su izražena perzistentnost (sposobnost virusa da budu stabilni i zadrže infektivnost) u različitim uslovima spoljašnje sredine i rezistentnost prema širokom spektru uobičajeno korišćenih tretmana u preradi, konzervisanju i čuvanju hrane. Humani NoV preživljava: 60 do 728 dana u vodi, u zavisnosti od njenog tipa; 7 dana u školjkama nakon prečišćavanja; 1-2 nedelje na jagodastom i drugom voću i povrću, sa manje od 1 log<sub>10</sub> redukcije titra virusnih čestica; 2 h na kontaminiranim rukama; na materijalima i površinama koje se nalaze u spoljašnjoj sredini i u kontaktu sa hranom (keramika, nerđajući čelik, staklo, plastika, guma, drvo) i do 70 dana. Tretmani koji se primenjuju u proizvodnji hrane imaju različiti efekat na eliminaciju virusa. Visoka temperatura predstavlja najefikasniji tretman za inaktivaciju virusa, i to što je viša temperatura to je veća i brža redukcija njihove infektivnosti. Temperature  $\geq 90^{\circ}\text{C}$  su efikasne u inaktivaciji većine termorezistentnih enteričnih virusa, čak i u kompleksnim matriksima kao što su školjke i meso. Međutim, neke komponente hrane mogu imati protektivnu ulogu. Visok sadržaj saharoze u pireu od jagoda ima zaštitni efekat na termalnu stabilnost HAV i verovatno drugih virusa. Vreme potrebno da se dostigne određena temperatura i inaktivira/ubiju virusi u hrani zavisi od matriksa hrane i samog procesa. Suprotno od navedenog, niske temperature čuvanja i zamrzavanja nemaju značajan efekat na inaktivaciju virusa. Blagi procesi (pranje, prečišćavanje školjki, acidifikacija, pakovanje u modifikovanoj atmosferi gasova, ultrazvuk, pulsno električno polje) imaju samo marginalni efekat na broj virusa. UV tretman može biti koristan za inaktivaciju virusa u vodi, ali ima limitiranu primenu u indistriji hrane. Tehnologija visokog hidrostatičkog pritiska ima potencijala naročito za školjke, jer neki tretmani omogućavaju redukciju veću od 3 log<sub>10</sub> genomskih ekvivalenata hNoV, dok organoleptičke karakteristike proizvoda mogu ostati očuvane. Korišćenje jonizujućeg zračenja za sveže voće i povrće je limitirano jer su doze radijacije (gama i elektronski snop) koje je potrebno primeniti za značajniju inaktivaciju enteričnih virusa, znatno više od trenutno maksimalno dozvoljenih doza za sveže proizvode. Dodatno otežavajući momenat u kontroli virusa koji se prenose hranom je, da su hNoV i HAV relativno rezistentni na komercijalne dezinficijense koji se uobičajeno koriste u industriji hrane (kvaternarna amonijumova jedinjenja, alkoholi, sirćetna, persirćetna, limunska i fosforna kiselina, hidrogen peroksid). Efikasna virucidna jedinjenja kao aktivnu komponentu sadrže glutaraldehid ili N-hipohlorit (potrebno je minimum 5,000 ppm slobodnog hlora da bi se postigao željeni efekat na HAV, posebno ako je virus vezan sa organskim jedinjenjima).

**KLJUČNE REČI:** norovirus, hepatitis A virus, kontrola

## CONTROL OF FOODBORNE VIRUSES

Radin Dragoslava

University of Belgrade, Faculty of Agriculture

The most important foodborne viruses, etiologic agents of viral alimentary illnesses, human norovirus (hNoV), hepatitis A virus (HAV), rotavirus (RoV), and emerging zoonotic hepatitis E virus (HEV), pose a serious threat to human health. A large number of worldwide epidemics are related with some of the characteristics of these viruses, such as pronounced persistence (the ability of the virus to be stable and retain infectivity) under different environmental conditions and resistance to a wide range of commonly used treatments in processing, preserving and storage of the food. Human NoV survives: 60 to 728 days in water, depending on the type; 7 days in mussels after purification; 1-2 weeks on strawberry and other fruits and vegetables, with less than 1 log<sub>10</sub> reduction of the viral particle titre; 2 h on contaminated hands; on environmental materials and food contact surfaces (ceramics, stainless steel, glass, plastic, rubber, wood) up to 70 days. Treatments that are used in food production have a different effect on the elimination of the virus. High temperature is the most effective treatment for inactivating the virus, and the higher the temperature, the greater and faster the reduction of their infectivity. Temperatures ≥ 90°C are effective in inactivation of the most thermostable enteric viruses, even in complex matrices such as shellfish and meat. However, some food components may have a protective role. The high content of sucrose in strawberry purée has a protective effect on the thermal stability of HAV and possibly other viruses. The time needed to reach a certain temperature and inactivate / kill viruses in food depends on the food matrix and the process itself. Contrary to the above, low storage and freezing temperatures do not have a significant effect on virus inactivation. Mild processes (washing, purification of shells, acidification, and packaging in a modified atmosphere, ultrasound, and pulsed electric field) only have a marginal effect on the number of viruses. UV treatment can be useful for inactivating the virus in water, but has limited application in the food industry. High Hydrostatic Pressure Process has potentials especially for shellfish, as some treatments allow the reduction of more than 3 log<sub>10</sub> genomic equivalents of hNoV, while the organoleptic characteristics of the product can be preserved. The use of ionizing radiation for fresh fruits and vegetables is limited because radiation doses (gamma and electron beam) needed to be applied to inactivate enteric viruses are significantly higher than currently the maximum allowed doses for fresh products. An additional aggravating issue in the control of foodborne viruses is that hNoV and HAV are relatively resistant to commercial disinfectants commonly used in the food industry (quaternary ammonium compounds, alcohols, citric and phosphoric acid, hydrogen peroxide). Effective virucidal compounds as an active ingredient contain glutaraldehyde or Na-hypochlorite (minimum 5,000 ppm of free chlorine is needed to achieve the desired effect on HAV, especially if the virus is bound to organic compounds).

**KEY WORDS:** norovirus, hepatitis A virus, control

**BIOLOŠKA ZAŠTITA HRANE (BIOPREZERVACIJA) - EKOLOŠKI PRISTUP POBOLJŠANJU  
BEZBEDNOSTI I PRODUŽENJU ROKA TRAJANJA HRANE  
BIOLOGICAL PROTECTION OF FOOD (BIOPRESERVATION) - ECOLOGICAL ACCESS TO FOOD  
SAFETY AND EXTENSION OF SHELF LIFE**

Vesković Moračanin Slavica <sup>1</sup>

[slavica.veskovic@inmes.rs](mailto:slavica.veskovic@inmes.rs)

Dragutin Đukić <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Kaćanskog 13, Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Cara Dušana 34, Čačak, Srbija

Savremene način proizvodnje i prerade hrane zasniva se na primeni različitih vidova zaštitnih tehnologija koje imaju za cilj da, istovremeno, osiguraju i očuvaju zaštitu, kako zdravstvenu bezbednost proizvoda, tako i prihvatljiv i ujednačen kvalitet od momenta proizvodnje do momenta konzumiranja. Ovaj koncept je bio predmet mnogih rasprava, ne samo u zemljama u razvoju (gde je razvoj i primena navedenih tehnologija neophodna) već i u industrijalizovanim delovima sveta. Najveći izazovi za današnju industriju hrane predstavljaju nastojanja da se : a) smanje ekonomski gubici do kojih dolazi usled kvara hrane, b) snizi cena procesa proizvodnje hrane, c) smanje mogućnosti prenošenja patogena, kao i d) da se zadovolje rastuće potrebe potrošača za hranom spremnom za neposrednu upotrebu koja je svežeg ukusa, visoke hranljive i vitaminske vrednost, i koja je, uz to, minimalno prerađena i tretirana konzervansima.

Upotreba određenih mikroorganizama (prvenstveno, bakterija mlečne kiseline), njihovih metaboličkih produkata, kao i biljnih ekstrakata predstavlja osnovu razvoja novih tehnologija biološkog konzerviranja i zaštite, čija primena može doprineti, s jedne strane, standardizaciji procesa proizvodnje prehrambenih proizvoda sa ujednačenim i/ili unapređenim parametrima kvaliteta, a sa druge strane, nastanku bezbednih proizvoda sa produženim rokom upotrebe.

Bakterije mlečne kiseline (BMK) imaju esencijalnu ulogu u toku proizvodnje fermentisanih proizvoda. Svojom metaboličkom aktivnošću utiču na procese zrenja, dovodeći do stvaranja željenih senzornih svojstava uz istovremeno sprečavanje rasta neželjenih mikroorganizama. Zbog svoje dominantnosti tokom fermentacije i tradicije duge upotrebe, BMK su označene kao "zdravstveno bezbedna mikrobiota". Biološku zaštitu BMK, kao prirodno prisutna i/ili selekcionisana i naknadno dodata mikrobiota, ostvaruju kroz produkciju nespecifičnih (mlečna, sirćetna i druge isparljive organske kiseline, vodonik-peroksid, diacetil itd.)i specifičnih metabolita, bakteriocina.

Rezimirajući dosadašnja iskustva u ovoj oblasti, nameće se zaključak da bi u narednom periodu bilo potrebno privući širu pažnju potrošača i intenzivnije promovirati primenu ovih prirodnih supstanci kao deo preventivnih mera u sprečavanju nastanka oboljenja izazvanih upotrebom kontaminirane hrane. Primena biljnih ekstrakata, bakteriocina i bakteriocin-produkujućih mikroorganizama može biti interesantna i veoma poželjna s obzirom na to da je poverenje potrošača u hemijske konzervanse uveliko poljuljano, pa čak i dovedeno u pitanje.

**Napomena:** Istraživanja u ovom radu deo su projekta III 46009 i III 46010 koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.



**BIOLOGICAL PROTECTION OF FOOD (BIOPRESERVATION) - ECOLOGICAL ACCESS TO FOOD  
SAFETY AND EXTENSION OF SHELF LIFE**

Vesković Moračanin Slavica <sup>1</sup>

[slavica.veskovic@inmes.rs](mailto:slavica.veskovic@inmes.rs)

Dragutin Đukić <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Meat Hygiene and Technology, Kaćanskog 13, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> University of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Cara Dušana 34, 32000 Čačak, Serbia

Modern methods of food production and processing are based on the application of different forms of protective technologies which aim to assure and protect both the safety of the products and the acceptable and uniform quality from the moment of production to the moment of consumption. This concept has been the subject of many discussions, not only in developing countries (where the development and application of these technologies is necessary), but also in the industrialized world. The biggest challenge in the food industry right now is the effort to: a) reduce economic losses caused by food spoilage, b) reduce the price of the food production process, c) reduce the possibility of pathogen transfer, and d) satisfy the growing consumer need for ready-to-use food that tastes fresh, has a high nutritional and vitamin value, and has been minimally processed and treated with preservatives.

The use of certain micro-organisms (primarily, lactic acid bacteria), their metabolic products, as well as plant extracts, is based on the development of new biological conservation and protection technologies, which application can contribute, on the one hand, to the standardization of the food production process with uniform and / or improved quality parameters, and on the other hand, the emergence of safe products with extended shelf-life.

Lactic acid bacteria (LAB) have an essential role in the production of fermented products. By their metabolic activity, they influence the ripening processes - leading to desired sensory qualities while at the same time preventing the growth of undesired microorganisms. Because of their dominant role during fermentation and long-lasting tradition of utilization, LAB have been designated as "safe microbiota". Biological protection of LAB, as a naturally present and/or selected and subsequently added microflora, is realized through the production of non-specific (lactic acid, acetic acid and other volatile organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl, etc) and specific metabolites, bacteriocins.

Summarizing the previous experience in this area, we can conclude that in the coming period it would be necessary to attract more consumer's attention and to promote the use of these natural substances more intensively as part of preventive measures in preventing the occurrence of diseases caused by the use of contaminated food. The use of plant extracts, bacteriocins and bacteriocin-producing microorganisms can be interesting and highly desirable given that consumer's confidence in chemical preservatives is greatly shaken and even put into question.

**Note:** Research used in this paper is part of Project III 46009 and III 46010 funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

**VIJABILNOST POTENCIJALNIH PROBIOTSKIH BAKTERIJA PRIMENJENIH U MLEČNIM I  
NEMLEČNIM PROIZVODIMA**  
**SURVIVAL OF POTENTIAL PROBIOTIC BACTERIA IMPLEMENTED IN DAIRY AND NON-  
DAIRY PRODUCTS**

Radulović Zorica

[zradulovic@agrif.bg.ac.rs](mailto:zradulovic@agrif.bg.ac.rs)

Mirković Milica

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, Beograd 11080, Srbija

Sve veća briga potrošača o zdravlju doveli je do velikog interesovanja za hranu obogaćenu dodatnim funkcionalnim komponentama, pri čemu je uveden pojam funkcionalne hrane. Poseban značaj se pridaje funkcionalnoj hrani sa probiotskim bakterijama. Autohtone bakterije mlečne kiseline izolovane iz tradicionalnih sireva predstavljaju neiscrpan izvor novih sojeva, različitih metaboličkih aktivnosti, što daje mogućnost selekcije novih potencijalnih probiotika. Pored ispitivanja tehnoloških i biohemijskih karakteristika, potencijalni probiotski sojevi moraju ispuniti dodatne kriterijume kao što su stabilnost i aktivnost u gastrointestinalnom traktu, antimikrobna aktivnost, kao i zdravstveni efekti testirani *in vitro* i *in vivo*. Osim toga, sprej sušenje probiotika ima sve veću primenu, usled značajno bolje održivosti tokom skladištenja proizvoda i prolaza kroz gastrointestinalni trakt.

Bakterije mlečne kiseline *Lactobacillus paracasei* Z8 i *Lactobacillus plantarum* 564, su na osnovu *in vitro* ispitivanja okarakterisane kao potencijalne probiotske bakterije. Selekcionisani sojevi su inkapsulisani tehnikom sprej sušenja, a rezultati ispitivanja ukazuju da su veoma dobro preživeli proces sprej sušenja. Daljim ispitivanjima, *Lb. plantarum* 564 je odabran za primenu u proizvodnji jogurta, sira od ultrafiltriranog mleka i crne čokolade. Kao kontrolni probiotik korišćen je *Lb. plantarum* 299v. Ispitivana je i sposobnost preživljavanja gastrointestinalnih uslova *in vivo* studijom gde su volonteri konzumirali prah sprej sušenih probiotika, jogurt, sir od UF mleka i crnu čokoladu sa sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v tokom 14 dana.

Ispitivanjem uloge prehrambenih proizvoda kao nosača probiotika, primećeno je da crna čokolada ima izuzetno dobru ulogu nosača, uzimajući u obzir da su obe probiotske bakterije pronađene kod najvećeg broja volontera nakon konzumiranja crne čokolade. Takođe, sir od UF mleka je pokazao veoma dobru ulogu nosača probiotskih bakterija, dok su jogurt i prah sprej sušenih probiotskih ćelija pružili najslabiju zaštitu probiotskim bakterijama, s obzirom na to da su probiotici izolovani iz najmanjeg broja fecesa volontera nakon konzumiranja navedenih proizvoda.

**KLJUČNE REČI:** *probiotske bakterije, gastrointestinalni trakt, sprej sušenje*

**SURVIVAL OF POTENTIAL PROBIOTIC BACTERIA IMPLEMENTED IN DAIRY AND NON-DAIRY PRODUCTS**

Radulović Zorica  
[zradulovic@agrif.bg.ac.rs](mailto:zradulovic@agrif.bg.ac.rs)

Mirković Milica

University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Nemanjina 6, Belgrade 11080, Serbia

Increasing consumer concerns about health have led to great interest in foods enriched with additional functional components, referred to as functional foods. Particular importance is devoted to functional food with probiotic bacteria. Autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional cheeses represent an endless source of new strains with various metabolic activities, which allows the selection of new potential probiotic. Apart technological and biochemical properties, probiotic strains have to meet the criteria that include stability and survival in gastrointestinal tract, antimicrobial activity, as well as health effect, tested *in vitro* and *in vivo*. In addition, spray drying of probiotic strains is frequently used due to significantly better survival during storage of product and passage through gastrointestinal tract.

Lactic acid bacteria *Lactobacillus paracasei* Z8 i *Lactobacillus plantarum* 564, were characterized as potential probiotic based on *in vitro* test. Selected strains were spray dried and results indicate that optimal conditions were achieved. Further, *Lb. plantarum* 564 was selected for application in the production of yoghurt, cheese made from ultrafiltered milk and dark chocolate. *Lactobacillus plantarum* 299v was control probiotic. The ability of probiotic bacteria to survive gastrointestinal conditions was examined *in vivo* with volunteers consuming powder of spray dried probiotics, yogurt, cheese from UF milk and dark chocolate with spray dried cells of *Lb. plantarum* 564 and *Lb. plantarum* 299v during 14 days.

Based on results, it was observed that dark chocolate was a very good carrier, taking into consideration that both probiotics were found in most of the volunteers' feces after consumption. Also, cheese from UF milk showed very good performance as carrier of probiotics, while yogurt and spray dried powder provided the weakest protection to probiotic bacteria, as probiotics were isolated from the minimum number of feces of volunteers after consumption of the above mentioned products.

**KEYWORDS:** *probiotic bacteria, gastrointestinal conditions, spray drying*

IN VITRO I IN VIVO PRIMENA PRIRODNIH ANTIMIKROBNIH AGENASA U KONTROLI RASTA  
MIKROORGANIZAMA U HRANI  
IN VITRO AND IN VIVO APPLICATION OF NATURAL ANTIMICROBAL AGENES IN THE  
CONTROL OF MICROORGANISM IN FOOD

Kocić- Tanackov Sunčica

Dimić Gordana <sup>1</sup>, Mojović Ljiljana<sup>2</sup>, Pejin Jelena <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija

<sup>2</sup>Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, Srbija

Epidemiološki podaci Svetske zdravstvene organizacije ukazuju da su alimentarna oboljenja odgovorna za znatan invaliditet i smrtnost stanovništva širom sveta. Svake godine u svetu registruje se više miliona gastrointestinalnih oboljenja koja su posledica konzumiranja hrane i vode kontaminirane patogenim bakterijama, virusima i parazitima. Ovaj problem ne zaobilazi i industrijski razvijene zemlje. Procenjuje se da u nekim razvijenim zemljama svake godine oboli i do 30% populacije. Zemlje u razvoju su još više ugrožene.

Da bi se sprečio rast mikroorganizama u hrani primenjuju se različite fizičke i hemijske metode tokom procesa proizvodnje i čuvanja prehrambenih proizvoda. Fizičke metode su zasnovane na primeni visokih ili niskih temperatura, pakovanja u modifikovanoj i kontrolisanoj atmosferi i radijaciji, dok hemijska zaštita obuhvata primenu različitih konzervanasa.

Imajući u vidu da fizičke metode utiču na promenu senzornog i nutritivnog kvaliteta hrane, da su neki konzervansi štetni po zdravlje ljudi, da se sve više u ishrani koristi hrana koja je minimalno tehnološki procesirana, u svetu se poslednjih godina razvijaju alternativne metode za zaštitu hrane od mikrobiološke kontaminacije bazirane na primeni prirodnih antimikrobnih jedinjenja koji su produkti aromatičnih biljaka (etarska ulja), ili nekih mikroorganizama (npr. bakteriocini).

S toga, ovaj rad obuhvata naša istraživanja i istraživanja u svetu vezana za primenu etarskih ulja i ekstrakata u zaštiti hrane od mikrobiološke kontaminacije u *in vitro* i *in vivo* uslovima. U okviru *in vitro* istraživanja biće prikazani rezultati dobijeni disk- difuzionom, agar-dilucionom i mikro- dilucionom metodom za najčešće bakterije, kvasce i plesni kontaminante hrane, uključujući i makro- i mikro- morfološke promene mikroorganizama nastale pod uticajem etarskih ulja. Takođe, biće prezentovana istraživanja vezana za uticaj etarskih ulja i ekstrakata na biosintezu mikotoksina. U okviru *in vivo* ispitivanja biće prikazani rezultati dobijeni primenom ovih jedinjenja na modelu hrane.

**KLJUČNE REČI:** antimikrobni aktivitet, etarska ulja, primena u hrani

**ZAHVALNOST:** Rezultati istraživanja prikazani u ovom radu su deo projekta TR 31017 finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

**IN VITRO AND IN VIVO APPLICATION OF NATURAL ANTIMICROBIAL AGENES IN THE  
CONTROL OF MICROORGANISM IN FOOD**

Kocić-Tanackov Sunčica<sup>1</sup>  
Dimić Gordana<sup>1</sup>, Mojović Ljiljana<sup>2</sup>, Pejin Jelena<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Novi Sad, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia

<sup>2</sup>University of Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade, Serbia

Epidemiological data from the World Health Organization show that alimentary disorders are responsible for the significant disability and mortality of the human population around the world. Every year, millions of gastrointestinal illnesses are recorded globally that are due to the consumption of food and water contaminated with pathogenic bacteria, viruses and parasites. This problem does not bypass industrially developed countries. It is estimated that in some developed countries, up to 30% of the population is affected every year. Developing countries are even more vulnerable.

In order to prevent the growth of microorganisms in food, various physical and chemical methods are used during the process of production and storage of food products. Physical methods are based on the application of high or low temperatures, packaging in a modified and controlled atmosphere, and radiation, while chemical protection involves the use of various preservatives.

Bearing in mind that physical methods influence the change in the sensory and nutritional quality of food, that some preservatives are harmful to health, that use of minimally thermally processed food is increasing, alternative methods are being developed in the world in recent years for the protection of food from microbiological contamination based on the application of natural antimicrobial compounds which are products of aromatic plants (essential oils), or some microorganisms (e.g bacteriocins).

Thus, this paper includes our research and research in the world related to the use of essential oils and extracts in the protection of food from microbiological contamination *in vitro* and *in vivo* conditions. Within the *in vitro* research, we present the results obtained by disk-diffusion, agar-dilution and micro-dilution method for the most common bacteria, fungi that are food contaminants, including macro- and micro-morphological changes of the microorganisms produced under the influence of essential oils. Also presented are studies on the effect of essential oils and extracts on biosynthesis of mycotoxins, and within *in vivo* tests the results obtained by using these compounds on the food model.

**KEY WORDS:** antimicrobial activity, essential oils, food application

**ACKNOWLEDGMENTS:** The study is the part of the investigations realised with the scope of the Project No. TR-31017 financially supported by the Ministry of Education, Science, and Technological Development of the Republic of Serbia.

## POTENTIAL IMPACT OF PROBIOTICS ON HUMAN HEALTH AND DISEASES

Taleski Vaso

[vaso.taleski@ugd.edu.mk](mailto:vaso.taleski@ugd.edu.mk)

Trpceva Kristina, Zdravkovska Milka, Darkovska-Serafimovska Marija

Faculty of Medical Sciences, University „Goce Delchev“-Shtip, Republic of Macedonia

**INTRODUCTION:** Human microbiota is complicated microbial ecosystem composed of about thousand different types of 10-100 trillion symbiotic microbial cells (bacteria, yeasts and viruses). The majority are bacteria mostly lives in colon. Human microbiome refers to the total genes of human microbiota.

Gut flora is very important for human health: production of vitamin K and B, stimulation of immune system and regulation of gut integrity.

WHO in 2001 defined probiotics as live microorganisms that contribute health benefits when consumed in adequate amounts hence belongs to “good bacteria”. Most important bacterial strains belongs to *Lactobacillus spp.* and *Bifidobacterium spp.*

**AIM:** To define the notion of human microbiota, human microbiome, dysbiosis and probiotics. In addition, main aim is to emphasize the potential influence of probiotics use on human health and diseases caused by dysbiosis.

**MATERIAL AND METHODS:** Review of most recent published data on definitions and recommendations based on scientific and professional publications.

**DISCUSSION:** Dysbiosis (balance changes of gut microbiota) is cause of various diseases. Probiotics have substantial influence on human health protection and treatment of numerous diseases.

Probiotics influence immunological system by modulation of immunological response stimulating normal gut flora metabolism; decreasing and control of some allergic reactions; stimulation of macrophages and lymphocytes to produce and release enzymes, IgA antibodies and wide spectrum of cytokines.

Probiotics affects pathogens growths by competition, inhibition and adhesion to gut epithelium. They have important role in treatment and prevention of diarrheal diseases caused by: *Clostridium difficile*, Enterotoxigenic *Escherichia coli (ETEC)*, *Helicobacter pylori*, *Rotavirus*, patients with AIDS, chemotherapy, radiotherapy, Inflammation bowel disease (IBD) as Ulcerative colitis and Crohn’s disease and lactose intolerance. Some probiotics may decrease level of cholesterol; improve gut function and decrease the risk of colorectal cancer. Some studies reported beneficial influence of probiotics on inflammations; depression and anxiety; high blood pressure; skin diseases (acne, rosacea and eczema); rebalance of vaginal flora in bacterial vaginosis; restore oral and throat microflora with probiotic lozenges.

Some patients after use of probiotics have side effects like acne, anxiety, excessive gas, constipation, flatulence, cramps, diarrhea, dizziness and flu like symptoms.

**CONCLUSIONS:** Numerous studies have proved many beneficial activities of probiotics use on human health protection and treatment of various diseases.

**KEY WORDS:** health, diseases, human microbiota, human microbiome, probiotics.

**SESIJA: MIKROBIOLOGIJA HRANE II**

**SESSION: FOOD MICROBIOLOGY II**

**USMENE PREZENTACIJE/ ORAL**

**PRESENTATION**

XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE  
sa međunarodnim učešćem  
MIKROMED 2018 REGIO

12<sup>TH</sup> SERBIAN MICROBIOLOGISTS CONGRESS  
with international participation  
MICROMED 2018 REGIO

**ANALIZA MIKROBIOLOŠKOG RIZIKA VAZDUHA U PREHRAMBENIM POGONIMA ATLANTIC  
GRUPE**  
**ANALYSIS OF MICROBIOLOGICAL RISK OF AIR IN FOOD PRODUCTION LINES IN PLANTS OF  
ATLANTIC GROUP**

Petković Svetlana

Soko Štark doo/Atlantic Grupa, Beograd

Cilj ove prezentacije je spoj nauke i proizvođačke prakse kao i značaj detekcije izvora i puteva mikrobiološke kontaminacije radi osiguranja ispravnosti i bezbednosti gotovih proizvoda u prehrambenim pogonima Atlantic Grupe.

Vazduh u proizvodnim pogonima može predstavljati ozbiljan problem sa aspekta bezbednosti samih proizvoda kao i sa aspekta njegovog uticaja na zdravlje zaposlenih.

Pored stabilnih proizvoda u našoj kompaniji proizvodimo i osetljive proizvode, ali svi oni u sebi sadrže manje ili više sastojke koje mikroorganizmi mogu koristiti za svoj rast i razmnožavanje ili da autoliziraju ako se nađu u većem broju, što se može odraziti i na kvalitet.

Iako atmosfera nije prirodno okruženje za razvoj mikroorganizama vazduh može biti i nosioc mikroorganizama ako se u proizvodnim pogonima ne primenjuje odgovarajuća higijenska praksa u toku procesa proizvodnje. Precizno određivanje različitih grupa bakterija u vazduhu u proizvodnim pogonima je neophodno kako za procenu opasnosti po kvalitet gotovog proizvoda tako i za stvaranje standarda za kontrolu kvaliteta vazduha u zatvorenom prostoru.

U vazduhu se mogu naći bakterije, plesni i njihove spore, virusi, alge, protozoe i Air borne mikroorganizmi koji takođe mogu prouzrokovati kvarenje namirnica. Potencijalni izvori mikroflore vazduha u pogonu su i radno osoblje, slivnici i voda ili vazduh koji se koristi pod pritiskom u procedurama čišćenja i sanitacije.

Proizvodni pogoni Atlantic Grupe se nalaze kako u prirodnom tako i u gradskom okruženju pa je zato potrebno odrediti za svaku proizvodnju ponaosob parametre koji će se pratiti. U određenom vremenskom periodu pronaći koje su to granice koje neće ugrožavati kvalitet gotovog proizvoda i propisati odgovarajuće korektivne i preventivne mere koje bi trebali preduzeti u slučaju odstupanja od propisanih vrednosti.

Metodologija se zasniva na periodičnom pregledu čistoće vazduha kao potencijalnog izvora sekundarne kontaminacije. Jako je važno propisati učestalost uzorkovanja i granice za pojedine mikroorganizme. Učestalost uzorkovanja zavisi od toga da li nam je u proizvodnom pogonu zona niskog, srednjeg ili višeg nivoa rizika.

Analizom svih dobijenih rezultata i vezom između broja mikroorganizama iz vazduha i gotovog proizvoda može se zaključiti da u prostorijama gde nam je higijena na visokom nivou i gde imamo pravilno čišćenje i održavanje sistema za dovođenje vazduha uticaj vazduha kao izvora sekundarne kontaminacije sveden na minimum čime je obezbeđen i mikrobiološki bezbedan proizvod.



**ANALYSIS OF MICROBIOLOGICAL RISK OF AIR IN FOOD PRODUCTION LINES IN PLANTS OF  
ATLANTIC GROUP**  
Petković Svetlana

Soko Štark doo/Atlantic Grupa, Beograd

The objective of the this presentation is a combination of science and manufacturing practice as well as the importance of detecting sources of microbial contamination and ways to ensure the safety and security of the product in food line process in plants of Atlantic Group.

The air in production facilities can be a serious problem from the aspect of safety of the products and in terms of its impact on the health of employees.

In our company we have stable and sensitive products, but they contain more or less ingredients that microorganisms can use for their growth and reproduction degradation if they are in large numbers, which can affect the quality.

Although the air is not a natural environment for the growth of microorganisms, it can be a carrier of microorganisms if in the production plants are not applied appropriate hygienic practices during production. A precise determination of the different groups of bacteria in the air in the production lines in plants is necessary in order to evaluate the risk to the quality of the finished product as well as for the creation of standards for the quality control of indoor air.

The bacteria, fungi and their spores, viruses, algae, protozoa and Air borne microorganisms can be found in the air which can also cause food spoilage. Potential sources of air micro flora in the food processing lines is working staff, drains and water or air which is used under pressure in the cleaning and sanitation procedure.

Production facilities of Atlantic Group are located in both and natural and urban environment so it is necessary to determine for each producing individual monitoring parameters. In certain time try to find what are the limits that will not endanger the quality of the finished product and regulate adequate corrective and preventive measures should to be taken in case of deviations from the prescribed value.

Methodology is based on the periodic review of air purity as a potential source of secondary contamination. The frequency of sampling depends on whether there is low, medium or higher risk in the production lines of the plant.

By analyzing all of the results and correlation between the number of microorganisms from the air and finished product it can be concluded that in the areas where hygiene is at a high level and wherein the proper cleaning and maintenance of the air supplying system the impact of air as the source of secondary contamination is reduced to a minimum thus ensuring microbiologically safe product.

NALAZ PSEUDOMONAS SPP. U SIROVOM MLEKU  
OCCURRENCE OF PSEUDOMONAS SPP. IN RAW MILK

Savić Radovanović Radoslava <sup>1</sup>

[mimica@vet.bg.ac.rs](mailto:mimica@vet.bg.ac.rs)

Rajić Savić Nataša <sup>2</sup>, Babić Milijana <sup>1</sup>, Zdravković Nemanja <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Katedra za higijenu i tehnologiju  
namirnica animalnog porekla, Bulevar oslobođenja 18, Beograd,

<sup>2</sup>Eko-Lab doo, Industrijsko naselje bb, Padinska skela, Beograd

<sup>3</sup> Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Vojvode Toze 14, Beograd

Rod *Pseudomonas* obuhvta gram-negativne štapiće, koji nisu zahtevni u pogledu hranjivih sastojaka neophodnih za rast i naseljavaju brojne ekološke niše. Često su izolovani iz hrane, zemlje, štalskog đubriva i sa kože životinja. Svrstavaju se u oportune patogene mikroorganizme, jer mogu da izazovu akutne, ili hronične infekcije različitih domaćina-sisara i njihovih organa zbog sposobnosti stvaranja širokog spektra faktora virulencije. *Pseudomonas* vrste dobro rastu na bakteriološkim podlogama i često stvaraju pigment, i to *P. aeruginosa* termostabilni plavo-zeleni pigment (*pyocyanin*) i *P. fluorescens* zelenkasto-žuti pigment fluorescin. Značaj sa aspekta higijene mleka se ogleda u tome što, iako se ovaj psihrotrofni mikroorganizam uništava procesom pasterizacije, može da stvara termostabilne metaboličke produkte i enzime, koji izazvaju kvar proizvoda od mleka. Najčešće izolovan je *P. aeruginosa*, ali i *P. fluorescens*, koji dovodi do kvara maslaca i UHT mleka.

**CILJ** ovog rada je bio da se ukaže na značaj *Pseudomonas* vrsta kao konatminenta mleka i mogućeg uzročnika kvara.

Materijal je predstavljalo 7 uzoraka zbirnog mleka sa brojem somatskih ćelija manjim od 400.000/ml. Nalaz i identifikacija je rađena tokom rutinskog ispitivanja sirovog mleka metodom ISO 6579-1:2017. Kolonije na XLD agaru koje su bile laktoza negativne sa ili bez H<sub>2</sub>S, a sa, ili bez plavičaste boje oko kolonija i karakterističnim mirisom dalje su biohemijski ispitivane. Krvni agar je korišćen za ispitivanje hemolitične aktivnosti, a podloga sa kazeinom i tributirin agar i za ispitivanje proteolitičke i lipolitičke aktivnosti.

Rezultati: Od 7 uzoraka mleka *Pseudomonas* spp. je dokazan u 6 (85,71%) uzoraka sirovog mleka. Svih 28 izolati su oksidaza i katalaza pozitivni, stvarali su β hemolizu na krvnom agaru, proizvodili su pigment na Tripton soja agaru (TSA) i imali karakterističan miris. Svih 28 izolata je pokazalo proteolitičku i lipolitičku aktivnost. Najčešće izolovan je *Pseudomonas fluorescens*, a dva izolata *Pseudomonas aeruginosa* su stvarala zeleni pigment *pyocyanin*.

**ZAKLJUČAK:** Iako zakonska regulativa u Republici Srbiji ne predviđa ispitivanje uzoraka mleka na prisustvo *Pseudomonas* vrsta, moguć je nalaz ovog mikroorganizma u sirovom mleku, kao posledica kontaminacije.

**KLJUČNE REČI:** mleko, *Pseudomonas* spp., kvar

## OCCURRENCE OF *PSEUDOMONAS* SPP. IN RAW MILK

Savić Radovanović Radoslava <sup>1</sup>

[mimica@vet.bg.ac.rs](mailto:mimica@vet.bg.ac.rs)

Rajić Savić Nataša <sup>2</sup>, Babić Milijana <sup>1</sup>, Zdravković Nemanja <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Department of Food Hygiene and Technology, Bulevar oslobođenja 18, Belgrade

<sup>2</sup>Eko-Lab Ltd, Industrijsko naselje bb, Padinska skela, Belgrade

<sup>3</sup>Scientific Veterinary Institute of Serbia, Vojvode Toze 14, Belgrade

The genus *Pseudomonas* includes gram-negative bacilli, not requiring nutrient compounds necessary for growth and inhabit numerous ecological niches. They are often isolated from food, soil, manure and animal skin. They are classified into opportunistic pathogenic microorganisms because they can cause acute, or chronic infections of various mammalian hosts and their organs due to the ability to form a wide spectrum of virulence factors. *Pseudomonas* species grow well on bacterial media and often produce pigment, such as *P. aeruginosa*-thermostable blue-green pigment (*pyocyanin*) and *P. fluorescens*-greenish-yellow pigment fluorescin. From the view point of milk hygiene the importance of this psychotropic microorganism is, even it is destroyed by the pasteurization process, ability to synthesize thermostable metabolic products and enzymes that cause spoilage of milk products. The most commonly isolated is *P. aeruginosa*, but also *P. fluorescens*, which leads to spoilage of butter and UHT milk. The aim of this research was to point out the significance of *Pseudomonas* species as the milk contaminant and the possible cause of spoilage.

The material represented seven bulk tank milk samples in which the somatic cell counts were less than 400,000/ml. The isolation and identification was carried out during the routine testing of raw milk by the method ISO 6579-1: 2017. Colonies on XLD agar that were lactose negative with or without H<sub>2</sub>S, and with or without blue pigmentation around the colonies and characteristic smell were biochemically examined. The blood agar was used for the examination of haemolytic activity, and the casein agar and tributirin agar for the determination of proteolytic and lipolytic activity, respectively.

Results: Out of 7 milk samples *Pseudomonas* spp. was detected in 6 (85.71%) samples of raw milk. All 28 isolates were oxidase and catalase positive, they produced β hemolysis on blood agar, they produced a pigment on Trypton soy agar (TSA) and had a distinctive smell. All 28 isolates showed proteolytic and lipolytic activity. The most commonly isolated is *Pseudomonas fluorescens*, and two *Pseudomonas aeruginosa* isolates produced green pigment-*pyocyanin*.

**CONCLUSION:** Although according to the legislation in the Republic of Serbia does not provide the examination of milk samples for the presence of *Pseudomonas* species, it is possible to find this microorganism in raw milk as a result of contamination.

**KEY WORDS:** milk, *Pseudomonas* spp., spoilage

**INHIBICIJA RASTA BAKTERIJE ESCHERICHIA COLI DEJSTVOM BAKTERIJA MLEČNE  
KISELINE IZOLOVANIH IZ PETROVAČKE KOBASICE  
INHIBITION OF ESCHERICHIA COLI BY LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM  
PETROVAC SAUSAGE**

Milićević Bojana <sup>1</sup>

[bojanamilicevic@rocketmail.com](mailto:bojanamilicevic@rocketmail.com)

Danilović Bojana<sup>1</sup>, Džinić Natalija<sup>2</sup>, Savić Dragiša<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu, Srbija

<sup>2</sup>Tehnološki fakultet u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija

Jedno od najznačajnijih delovanja bakterija mlečne kiseline (BMK) je antimikrobno dejstvo prema patogenim mikroorganizmima. U ovom radu istražena je mogućnost inhibitornog dejstva BMK na rast patogena *Escherichia coli*.

Cilj rada je analiza mogućnosti kontrole rasta bakterije *E.coli* dejstvom BMK izolovanih iz Petrovačke kobasice u podlozi koja simulira uslove u mesnom nadevu Petrovačke kobasice.

U eksperimentu su korišćene BMK (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*) i *E. coli* ATCC 25922. Mikroorganizmi su gajeni u podlozi Meat simulation medium koja simulira uslove u mesnom nadevu, dok je određivanje broja mikroorganizama vršeno na MRS agaru i violet crvenom glukozno zučnom agaru (VRBG) za BMK i *E.coli*, redom. Inokulacija je izvršena tako da je početni broj BMK iznosio 5 log CFU/ml, a broj *E. coli* 4 log CFU/ml. Proces fermentacije trajao je šest dana na temperaturi od 15°C pri čemu je određivanje broja bakterija vršeno u vremenskim intervalima od 12h.

U mešovitim kulturama *E.coli* sa *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* i *Ln. mesenteroides*, nagli porast broja BMK primećen je nakon 12h i traje do 72h fermentacije. U uzorku koji sadrži samo *E.coli* nagli porast počinje tek nakon 72h što ukazuje na duži period prilagođavanja ove bakterije uslovima koji vladaju u mesnom nadevu. Utvrđeno je da je broj bakterija *E. coli* u prisustvu *Lb. brevis* manji oko 20000 puta u odnosu na rast *E. coli* u čistoj kulturi. Smanjenje broja *E.coli* u mešovitoj kulturi *Lb. plantarum* iznosili je 14500 puta, a sa *Ln. mesenteroides* oko 13000 puta. Sva tri mikroorganizma mogu predstavljati alternativu za kontrolu rasta *E. coli* u fermentisanim proizvodima od mesa.

**KLJUČNE REČI:** Petrovačka kobasica, bakterije mlečne kiseline, *Escherichia coli*

INHIBITION OF *ESCHERICHIA COLI* BY LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM PETROVAC SAUSAGE

Milićević Bojana<sup>1</sup>

[bojanamilicevic@rocketmail.com](mailto:bojanamilicevic@rocketmail.com)

Danilović Bojana<sup>1</sup>, Džinić Natalija<sup>2</sup> i Savić Dragiša<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Technology, University of Nis, Srbija

<sup>2</sup>Faculty of Technology, University of Novi Sad, Srbija

One of the most important activities of lactic acid bacteria (LAB) is the antimicrobial effect against pathogenic microorganisms. In this paper the possibility of inhibitory activity of LAB to the growth of *Escherichia coli* has been investigated.

The aim of the paper was to analyse the possibility of control of the growth of *E. coli* bacteria by LAB isolated from Petrovac sausage in the medium which simulate the conditions in a Petrovac sausage meat batter.

LAB (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*) and *E. coli* ATCC 25922 were used in the experiment. Microorganisms were grown in the Meat Simulation Medium (MSM) which simulates the conditions in meat batter, while the enumeration of microorganisms was performed on the MRS agar and the Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG) for LAB and *E. coli*, respectively. Inoculation of the MSM medium was performed in order to achieve the initial number of LAB 5 log CFU/ml and *E. coli* 4 log CFU/ml. The fermentation process lasted for six days at a temperature of 15 ° C and sampling was performed in the time intervals off 12h.

In co-cultures of *E. coli* with *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* and *Ln. mesenteroides*, an increase in number of bacteria was observed after 12h. In the culture of *E. coli* the number increased after 72h indicating a longer period of adaptation of this bacteria to the conditions in the meat batter. The number of *E. coli* in co-culture with *Lb. brevis* was 20000 times lower compared to the growth in single culture. The decrease of the number of *E. coli* in the presence of *Lb. plantarum* and *Ln. mesenteroides* was 14500 and 13000 times, respectively. It can be concluded that all three organisms can be used for a control of the growth of *E. coli* in fermented meat products while *Lb. brevis* was the best alternative.

**KEY WORDS:** Petrovac sausage, lactic acid bacteria, *Escherichia coli*

**AFLATOKSIN M1 U SIROVOM MLEKU SA PODRUČJA JUGOISTOČNOG DELA SRBIJE TOKOM  
2017. GODINE**  
**AFLATOKSIN M1 IN RAW MILK IN THE AREA OF SOUTH EASTERN PART OF SERBIA  
DURING 2017**

Manić Marija <sup>1</sup>,  
[marijavsiniis@gmail.com](mailto:marijavsiniis@gmail.com)

Nikolić Sonja<sup>1</sup>, Antanasijević Slađana<sup>1</sup>, Petrović Miloš<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Veterinarski specijalistički institut "Niš", Dimitrija Tucovića 175, Niš

**UVOD:** Sa aspekta uticaja na zdravlje ljudi i životinja aflatoksini su najznačajnija grupa gljivičnih toksičnih metabolita, a kontaminacija hrane aflatoksini i danas je veliki problem za bezbednost hrane. Aflatoksin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) je hepatokarcinogeni derivat aflatoksina B<sub>1</sub> koji se izlučuje mlekom nakon uzimanja kontaminirane hrane. Prisustvo AFM<sub>1</sub> u mleku i proizvodima od mleka ima ogromni značaj za ljudsko zdravlje. Zakonodavstvo za AFM<sub>1</sub> u EU (EC 1881/2006) je veoma strogo i maksimalni dozvoljeni nivo AFM<sub>1</sub> u mleku je 0,05 mg/kg. U Srbiji, Uredba koja definiše maksimalno dozvoljenu koncentraciju AFM<sub>1</sub> u mleku je poslednjih godina nekoliko puta promenjena. Trenutno prema važećoj promeni Uredbe o maksimalno dozvoljenim ostacima u hrani i hrani za životinje najveća dozvoljena koncentracija AFM<sub>1</sub> u mleku je 0,25 mg/kg. U jugoistočnom delu Srbije nema velikih farmi goveda već se mleko proizvodi na individualnim gazdinstvima sa po nekoliko grla goveda. Iz tog razloga kvalitet mleka i koncentracija AFM<sub>1</sub> je neujednačena.

**CILJ:** U ovom radu su prikazani rezultati ispitivanja prisustva AFM<sub>1</sub> u sirovom mleku u jugoistočnom delu Srbije tokom 2017. godine.

**METOD:** Koncentracija aflatoksina je određivana akreditovanom metodom prema uputstvu proizvođača ELISA kita.

**REZULTAT:** Tokom 2017. godine pregledano je 260 uzoraka sirovog mleka uglavnom kravljeg (250 uzoraka), kozjeg (8 uzoraka) i ovčijeg (2 uzorka). Utvrđena koncentracija AFM<sub>1</sub> u ispitanim uzorcima je bila u opsegu koji je propisan pravilnikom o maksimalno dozvoljenim koncentracijama, odnosno nijedan uzorak nije imao koncentraciju AFM<sub>1</sub> veću od 0,25mg/kg. Najveći broj uzoraka (229 ili 88,08% uzoraka) je imao koncentraciju AFM<sub>1</sub> manju od 0,05mg/kg. Koncentracija AFM<sub>1</sub> od 0,05mg/kg do 0,100mg/kg je utvrđena kod 21, odnosno 8,08% uzorka, a u 10, odnosno 3,84% uzoraka koncentracija AFM<sub>1</sub> je bila u opsegu od 0,100mg/kg do 0,25mg/kg.

**ZAKLJUČAK:** Ovaj rad daje pregled ispitivanja koncentracija AFM<sub>1</sub> u sirovom mleku sa područja jugoistočnog dela Srbije tokom 2017. godine, uključujući i zakonsku regulativu koja se odnosi na maksimalno dozvoljene koncentracije ovog toksičnog metabolita u sirovom mleku.

**KLJUČNE REČI:** aflatoksin M<sub>1</sub>, sirovo mleko, jugoistočna Srbija

**AFLATOKSIN M<sub>1</sub> IN RAW MILK IN THE AREA OF SOUTH EASTERN PART OF SERBIA  
DURING 2017**

Manić Marija <sup>1</sup>,  
[marijavsini@gmail.com](mailto:marijavsini@gmail.com)

Nikolić Sonja<sup>1</sup>, Antanasijević Slađana<sup>1</sup>, Petrović Miloš<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Veterinary Specialized Institute "Nis", Dimitrija Tucovica 175, Nis

**INTRODUCTION:** From the point of impact on human and animal health aflatoxins are the most important group of fungal toxic metabolites and aflatoxin contamination of food and today is a major problem for food safety. Aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) is a hepatocarcinogenic derivative of aflatoxin B<sub>1</sub> excreted into the milk after ingestion of contaminated feed. The presence of AFM<sub>1</sub> in milk and milk products is of huge concern for human health. The legislation for AFM<sub>1</sub> in EU (EC 1881/2006) is very strict and maximum level AFM<sub>1</sub> in milk is 0.05 µg/kg. In Republic of Serbia, the Regulation which defines the maximum permitted concentration of AFM<sub>1</sub> in milk in recent years was changed several times. At present, according to the current Regulation of the maximum permissible residues in food and feed, the maximum permissible AFM<sub>1</sub> concentration in milk is 0,25 mg/kg. In the southeastern part of Serbia there are just few large dairy cattle farms and major part of milk is produced on individual farms with small number of cattle. For this reason, milk quality and concentration of AFM<sub>1</sub> are uneven.

**AIM:** This paper presents the results of the examination of AFM<sub>1</sub> presence in raw milk in southeastern Serbia during 2017.

**Method:** The aflatoxin concentration was determined by the accredited method according to the instructions of the ELISA kit manufacturer.

**RESULT:** During 2017, 260 samples of raw milk were examined, mainly cow (250 samples), goats (8 samples) and sheep (2 samples). The concentration of the AFM<sub>1</sub> examined samples was in the range prescribed by the Regulations on the maximum permitted concentrations, and none of the samples had a concentration of greater AFM<sub>1</sub> 0,25mg/kg. The highest number of samples (229 or 88.08% of samples) had an AFM<sub>1</sub> concentration lower than 0,05mg/kg. AFM<sub>1</sub> concentration of 0,05mg/kg to 0,100mg/kg was determined in 21 or 8.08% samples, and in 10 or 3.84% samples, the concentration of AFM<sub>1</sub> ranged from 0,100mg/kg to 0,25mg/kg.

**CONCLUSION:** This paper provides an overview of the AFM<sub>1</sub> concentration in raw milk from the southeast Serbia region during 2017, including the legal regulations governing the maximum permissible concentrations of this toxic metabolite in raw milk.

**KEY WORDS:** aflatoxin M<sub>1</sub>, raw milk, southeast Serbia

**SESIJA: POSTER PREZENTACIJA**

**INDUSTRIJSKA MIKROBIOLOGIJA**

**SESSION: POSTER PRESENTATION**

**INDUSTRY MICROBIOLOGY**

**XII KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE**  
sa međunarodnim učešćem  
**MIKROMED 2018 REGIO**

**12<sup>TH</sup> CONGRESS OF SERBIAN MICROBIOLOGISTS**  
with international participation  
**MICROMED 2018 REGIO**



**ANTI-Campylobacter ACTIVITY OF PHYTOCHEMICAL FORMULATIONS FROM PLANTS,  
TRADITIONALLY USED AGAINST INTESTINAL DISORDERS**

Šimunović Katarina<sup>1</sup>

Klančnik Anja<sup>1</sup>, Turek Ivana<sup>2</sup>, Pretnar Gaja<sup>1</sup>, Erzar Kaja<sup>1</sup>, Bucar Franz<sup>2</sup>, Smole Možina Sonja<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University in Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology, Chair of Biotechnology, Microbiology and Food Safety, Ljubljana, Slovenia

<sup>2</sup>University of Graz, Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacognosy, Austria

With a high prevalence of resistant *Campylobacter jejuni* and its multidrug resistance still rising, the investigation of novel anti-*Campylobacter* agents is much needed. Recently, new control strategies are increasingly focusing on natural antimicrobials from plants as safe for consumers. We focused on ethanol and/or hexane extracts and their fractions from the alpine and karst plants, traditionally used against intestinal disorders, as are *Peucedanum ostruthium*, *Leontopodium nivale* ssp. *alpinum*, and *Satureja montana*. The mechanism of antimicrobial activity of these phytochemicals on *Campylobacter jejuni* is poorly understood, thus we aim to elucidate it by investigating their influence on key efflux pumps (CmeABC, CmeDEF and CmeGH) and potential resistance to natural alternative antimicrobials. After plant material preparation, using an accelerated solvent extraction method, with ethanol, 60% ethanol, dichloromethane and hexane, we analyzed their chemical composition by TLC, GC-MS and HPLC-MS/MS and determined the minimal inhibitory concentrations (MIC) of plant formulations with broth microdilution after dyeing with resazurin. Further we investigated their influence on: (i) efflux pumps with the ethidium bromide accumulation assay, (ii) bacterial membrane integrity using LIVE/DEAD BacLight assay; and (iii) sensitivity of mutants lacking activity in CmeABC, CmeDEF and CmeGH efflux pumps. The results exposed the influence of all tested extracts on the membrane integrity and/or their efflux pumps. MIC varied from 125 mg/L to more than 2000 mg/L depending on the extract. The most promising ethanol extract of *Satureja montana* showed good antimicrobial activity by influencing bacterial efflux pumps. A mutant lacking a functional efflux pump CmeGH was the most sensitive to this particular extract, whereas the efflux pump CmeABC had a bigger role in the resistance to other formulations. Studies of the mechanism of bioactivity are going on as they are essential for efficient application of identified anti-*Campylobacter* compounds.

**KEY WORDS:** antimicrobial plant formulations, mechanisms of anti-*Campylobacter* activity, inhibition of efflux pumps, microbial resistance to natural plant antimicrobials

**ANTIMICROBIAL AND ANTIADHESION EFFECT OF SECONDARY PLANT METABOLITES  
AGAINST SPOILAGE STRAINS PSEUDOMONAS AND SHEWANELLA**

Sterniša Meta<sup>1</sup>,  
Purgatorio Chiara<sup>2</sup>, Paparella Antonello<sup>2</sup>, Smole Možina Sonja<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Ljubljana, Slovenia

<sup>2</sup>University of Teramo, Faculty of Bioscience and Technology for Food, Agriculture and  
Environment, Teramo, Italy

Plant secondary metabolites are a diverse group of bioactive compounds, intensively studied for medical and industrial applications. This coincides with both – the increasing microbial resistance and consumers demands for natural preservation of foods. Less studied is control of spoilage microorganisms, like *Pseudomonas* and *Shewanella*, especially in proteinaceous foods. Due to their ubiquitous character, gram negative wall structure and exposure to various antimicrobials in the environment, these bacteria are frequently resistant to antimicrobial treatments for reduction of bacterial growth in foods.

We evaluated growth inhibition and antiadhesion activity of fifteen selected phenolic acids, resveratrol, carvacrol, thymol, thymoquinone and terpenes ( $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ -pinene, *p*-cymene) against the strains of *P. fragi*, *P. psychrophila*, *S. putrefaciens* and *S. xiamenensis*.

Broth microdilution method was used for determination of minimal inhibitory concentrations, using iodinitrotetrazolium chloride as an indicator. Compounds with MICs less than 1.25 mg/mL were further tested for antiadhesion potential in subinhibitory concentration - the adherence assay with plate counting was done in combination with crystal violet assay.

Carvacrol, thymol and structurally related thymoquinone were most active against spoilage *Pseudomonas* and *Shewanella*, with lower values (below 1 mg/mL) in both *Shewanella* strains. For the latter strains, in antimicrobial activity, phenolic terpenes were followed by monoterpenes ( $\alpha$ -pinene and  $\gamma$ -terpinene with 0.078 mg/mL for *S. putrefaciens* and 0.16 mg/mL for *S. xiamenensis*). Phenolic acids showed weaker antimicrobial potential, but their subinhibitory concentrations have great potential in inhibition of cell adhesion and formation of biomass. Also in the case of antiadhesion potential, tested pure compounds were more effective against *Shewanella* strains, reaching up to 60 % of inhibition compared to 20 % or less in *Pseudomonas*.

Many plant secondary metabolites have great potential for reduction of microbiota and prevention against adhesion and biofilm formation – they are further studied for growth inhibition kinetics *in vitro* and in food models for improvement of microbiological stability of foods.

**KEY WORDS:** spoilage bacteria, phenolics, terpenes, plant antimicrobials, anti-adhesion activity

**ARE THEY AT RISK AND DO THEY KNOW? FOOD SAFETY KNOWLEDGE OF POULTRY MEAT  
CONSUMERS IN SLOVENIA**

Sterniša Meta <sup>1</sup>

Smole Možina Sonja<sup>1</sup>, Levstek Sonja<sup>1</sup>, Kukec Andreja<sup>2</sup>, Raspor Peter<sup>1</sup>, Jevšnik Mojca<sup>3</sup>

<sup>1</sup>University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Ljubljana, Slovenia,

<sup>2</sup>University of Ljubljana, Medical Faculty, Ljubljana, Slovenia,

<sup>3</sup>University of Ljubljana, Faculty of Health Sciences, Ljubljana, Slovenia

Campylobacteriosis is the most frequently reported foodborne bacterial enteric infection in developed countries. Poultry meat represents the single most important source of infection. The prevalence of pathogenic campylobacters on poultry meat in retail outlets is high, so it is crucial for poultry consumers to know the measures that eliminate the risk of *Campylobacter* infection. We investigated Slovenian consumers' knowledge and practices in poultry meat handling during purchase, transport and preparation in the home kitchen, and to assess the awareness of the microbiological risk associated with poultry meat, with an emphasis on *Campylobacter*. A cross-sectional study of consumer food safety knowledge and habits was conducted from March to April 2015 in front of supermarkets in all regions of Slovenia. A convenience sample of 560 consumers was obtained. Gender and age distribution was controlled. The questionnaire included 33 questions divided in four parts. Descriptive statistical methods were performed for all the questions. For assessment of the association between consumers' characteristics and their knowledge, habits and attitude on microorganisms with emphasis on *Campylobacter* in poultry meat, the Chi-square test was done. Slovenian consumers are aware of food safety, but some critical violations are still made: use of same cutting board for the poultry meat and other foods, not assuring cold chain during transport, inconsistent storage of poultry meat, thawing of poultry meat at room temperature. One intriguing finding of the research is the insufficient knowledge of some basic food microbiology and *Campylobacter* as only 57.4% knew that retail poultry meat can be contaminated with potentially pathogenic bacteria and over 80% did not know about *Campylobacter* and its importance. Men, people with lower educational attainment, young adults and seniors showed less knowledge and awareness than others. Only by knowing consumers' attitudes and behaviour and by detecting gaps in their knowledge changes can be made in the direction of better education and safety of consumers.

**KEY WORDS:** food safety, consumer awareness, microbiological risks, poultry meat, *Campylobacter*

**POREĐENJE ANTILISTERIJSKOG DEJSTVA KOMERCIJALNIH I AUTOHTONIH BAKTERIJA  
MLEČNE KISELINE U MODELU SIRA  
COMPARISON OF THE ANTILISTERIAL EFFECT OF COMMERCIAL AND AUTOCHTHONOUS  
LACTIC ACID BACTERIA IN THE CHEESE MODEL**

Mirković Milica <sup>1</sup>

[petrusicm@agrif.bg.ac.rs](mailto:petrusicm@agrif.bg.ac.rs)

Ivanović Marina<sup>2</sup>, Mirković Nemanja<sup>3</sup>, Radulović Ana<sup>1</sup>, Paunović Dušanka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd,

<sup>2</sup> Visoka zdravstvena škola strukovnih studija u Beogradu, Beograd,

<sup>3</sup> Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd

Autohtone bakterije mlečne kiseline, osim toga što se mogu upotrebiti kao starter kulture, mogu imati i sposobnost antilisterijskog dejstva, što im omogućava dvostruku ulogu, kao starter kulture i protektivne kulture istovremeno.

U cilju poređenja antilisterijskog delovanja autohtonih i komercijalnih bakterija mlečne kiseline, napravljen je model sira inokulisan sa *Listeria monocytogenes* ATCC19111 različitim koncentracijama ( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  cfu/g), a zatim su napravljene sledeće varijante: A1 - sa dodatkom komercijalne starter kulture CHN11 (CHN HANSEN, Danska); A2 - sa dodatkom autohtonog soja *Lactococcus lactis* BGBU1-4; A3 - sa dodatkom autohtonih sojeva *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 563 i *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 565, izolovanih iz tradicionalnih sireva. Broj *L. monocytogenes* praćen je na Palcam agaru nakon 7., 14., 21., 35. i 56. dana.

Rezultati su pokazali da se pri koncentraciji  $10^3$  cfu/g broj *L. monocytogenes* smanjio za 2 log kod svih varijanti tokom 7 dana. Međutim, od 7. dana do 56. dana broj *L. monocytogenes* u varijanti sa komercijalnim starterom se povećao za < 1 log, a u varijantama sa autohtonim starterima se smanjivao i u 56. danu nije detektovan. U svim varijantama modela sira, pri koncentracijama  $10^4$  i  $10^5$  cfu/g *L. monocytogenes*, broj se smanjio za 1,5-2 log u periodu do 7. dana, dok se od 7. do 56. dana kod varijante sa komercijalnom starter kulturom broj nije značajno menjao, a kod varijanti sa autohtonim starterima broj je značajno smanjen (za 1,5-2 log), pri čemu u 56. danu prisustvo *L. monocytogenes* nije detektovano.

Zaključuje se da su autohtone starter kulture pokazale bolje antilisterijsko dejstvo, naročito u periodu od 7. do 56. dana, u poređenju sa komercijalnim starter kulturama.

COMPARISON OF THE ANTILISTERIAL EFFECT OF COMMERCIAL AND AUTOCHTHONOUS  
LACTIC ACID BACTERIA IN THE CHEESE MODEL

Mirković Milica <sup>1</sup>

[petrusicm@agrif.bg.ac.rs](mailto:petrusicm@agrif.bg.ac.rs)

Ivanović Marina<sup>2</sup>, Mirković Nemanja<sup>3</sup>, Radulović Ana<sup>1</sup>, Paunović Dušanka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Belgrade,

<sup>2</sup> High Medical School of Vocational Studies in Belgrade, Belgrade,

<sup>3</sup> Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Belgrade

Autochthonous lactic acid bacteria, except being used as a starter culture, can also have the ability of antilisterial effect, which enables them to have double role, as the starter culture and protective culture, at the same time. In order to compare the antilisterial effect of commercial and autochthonous lactic acid bacteria, a cheese model was made and inoculated with *Listeria monocytogenes* ATCC19111 at different concentrations ( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  cfu/g), and the following variants were made: A1 - with the addition of commercial starter culture CHN11 (CHN HANSEN, Denmark); A2 - with the addition of autochthonous strain *Lactococcus lactis* BGBU1-4; A3 - with the addition of autochthonous strains *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 563 and *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* 565, isolated from traditional cheeses. The account of *L. monocytogenes* was monitored on Palcam agar after 7., 14., 21., 35. and 56. days. The results showed that at a concentration of  $10^3$  cfu/g *L. monocytogenes*, the number decreased by 2 log in all variants during 7 days. However, from day 7. to day 56., in a commercial starter variant *L. monocytogenes* account increased by < 1 log, and in variants with autochthonous starters decreased and were not detected in day 56. In all variants of the cheese model, at concentrations of  $10^4$  and  $10^5$  cfu/g of *L. monocytogenes*, the number decreased by 1.5-2 log in the period up to 7. day, while from 7. to 56. day in the variant with a commercial starter culture the number did not change significantly, and in variants with autochthonous starters, the number were significantly reduced (by 1.5-2 log), whereby the presence of *L. monocytogenes* was not detected in the 56. day. It is concluded that the autochthonous starter culture showed a greater antilisterial effect, especially in the period from 7. to 56. day, compared to the commercial starter culture.

**ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA KARANFILIĆA PREMA PATOGENIM  
BAKTERIJAMA U HRANI  
ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CLOVE ESSENTIAL OIL AGAINST FOOD-BORNE  
PATHOGENIC BACTERIA**

Vukašinović Sekulić Maja <sup>1</sup>  
[vukasinovic@tmf.bg.ac.rs](mailto:vukasinovic@tmf.bg.ac.rs)

Bulatović Maja<sup>1</sup>, Rakin Marica<sup>1</sup>, Krunić Tanja<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

**UVOD:** Infekcije i trovanja hranom još uvek predstavljaju ozbiljan problem širom sveta, uprkos razvoju i primeni savremenih metoda za konzervisanje prehrambenih proizvoda. Kako upotreba hemijskih konzervanasa može negativno uticati na zdravlje ljudi, danas se sve veća pažnja usmerava ka pronalaženju novih jedinjenja prisutnih u prirodnim proizvodima, čija bi primena bila bezbednija i bez sporednih efekata. Među prirodnim antimikrobnim sredstvima začini mogu biti uspešna alternativa hemijskim dodacima, jer u isto vreme pojačavaju aromu i ukus proizvoda, kontrolišući patogene bakterije, kao i one koje dovode do kvarenja hrane. Karanfilić (*Syzygium aromaticum*) je aromatični začim često zastupljen u pripremi hrane Azijskih, Afričkih, i zemalja Bliskog Istoka. Njegova biološka svojstva potiču uglavnom od eugenola koji je u znatnom procentu prisutan u etarskom ulju ove biljne vrste (72-90%).

**CILJ:** Svrha ovog istraživanja bio je da se oceni antibakterijska aktivnost komercijalnog etarskog ulja karanfilića prema patogenim vrstama bakterija prisutnim u hrani kao što su *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Bacillus cereus*.

**METODE:** Antibakterijska aktivnost etarskog ulja karanfilića i njegovih razblaženja određena je agar difuzionom metodom, merenjem prečnika bistre zone inhibicije oko mesta nanošenja. Za minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK) uzeto je najveće razblaženje etarskog ulja karanfilića koje dovodi do formiranja zone inhibicije prečnika 1mm.

**REZULTAT:** Rezultati agar difuzione metode pokazali su da etarsko ulje karanfilića poseduje jaku antibakterijsku aktivnost prema svim testiranim vrstama bakterija, sa zonama inhibicije u opsegu od 16 do 23mm. Neznatno veća antibakterijska aktivnost primećena je prema Gram-negativnim vrstama bakterija (MIK 1,5% v/v) u odnosu na Gram-pozitivne vrste bakterija (MIK 3% v/v).

**ZAKLJUČAK:** Etarsko ulje karanfilića može biti potencijalni izvor novih jedinjenja sa antibakterijskim efektom prema vrstama bakterija koje su patogene i koje dovode do kvarenja hrane, sam ili u kombinaciji sa drugim metodama konzervisanja.

**KLJUČNE REČI:** antibakterijska aktivnost, etarska ulja, karanfilić

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CLOVE ESSENTIAL OIL AGAINST FOOD-BORNE  
PATHOGENIC BACTERIA**

Vukašinović Sekulić Maja <sup>1</sup>  
[vukasinovic@tmf.bg.ac.rs](mailto:vukasinovic@tmf.bg.ac.rs)

Bulatović Maja<sup>1</sup>, Rakin Marica<sup>1</sup>, Krunić Tanja<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Innovation Centre of the Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade,  
Belgrade, Serbia

**INTRODUCTION:** Food infection and intoxication are still a major problem worldwide, in spite of the modern methods used to preserve food. Application of synthetic preservatives may lead to negative health consequences and growing public interest is now focussing toward discovery of novel substances from natural sources which will be safer and without any side effects. Among natural antimicrobial agents, spices could be promising alternative to synthetic additives, since at the same time they enhance aroma and flavour and control food-borne pathogens and spoilage bacteria in processed foods. Clove (*Syzygium aromaticum*) is aromatic spice commonly used in the cuisine of [Asian](#), [African](#), and the [Near](#) and [Middle East](#) countries. It has many biological properties which mainly derived from high level of eugenol (72-90%) in its essential oil.

**AIM:** The purpose of this study was to evaluate antibacterial activity of commercial clove essential oil against a range of food-born pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*.

**METHODS USED:** Antibacterial activity of clove oil and its dilution was determined by agar well diffusion method and the diameters of clear inhibition zones around the wells were measured. For minimal inhibitory concentration (MIC) is taken the lowest dilution of the clove essential oil that caused a diameter of inhibition zone of 1mm.

**RESULT:** The results of the agar well diffusion test showed that the clove essential oil possessed strong antibacterial activity against all bacteria species tested with zones of inhibition ranging from 16 to 23 mm. The slightly higher antibacterial activity was noticed against Gram-negative bacteria (MIC 1,5% v/v) as compared to Gram-positive bacteria (MIC 3% v/v).

**CONCLUSION:** Clove essential oil could be a potentially source of novel antibacterial compounds against food-borne pathogenic and spoilage bacteria, alone or in combination with other preservation methods.

**KEY WORDS:** antibacterial activity, essential oil, clove

**PERZISTENTNOST HUMANOG NOROVIRUSA GENOGRUPE II U SIMULIRANIM  
GASTROINTESTINALNIM USLOVIMA I MODELU HRANE  
PERSISTENCE OF HUMAN NOROVIRUS GENOGROUP II UNDER SIMULATED  
GASTROINTESTINAL CONDITIONS AND IN FOOD MODEL**

Živković Ivana <sup>1</sup>  
[dradin@agrif.bg.ac.rs](mailto:dradin@agrif.bg.ac.rs)

Lazić Dejan<sup>2</sup>, Radin Dragoslava<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet, Beograd

<sup>2</sup>East Diagnostics, Beograd

**UVOD:** Humani norovirusi (hNoV) su poznati širom sveta, kao glavni uzročnik akutnog virusnog gastroenteritisa. Prenose se, vrlo lako, direktno ili putem kontaminirane hrane, vode i životne sredine. Jedan od razloga je, njihova značajna perzistentnost u različitim nepovoljnim uslovima i matriksima hrane.

**CILJ:** Cilj ovog istraživanja je bio ispitivanje perzistentnosti hNoV Genogrupe II u simuliranim gastrointestinalnim uslovima i u mleku kao modelu hrane.

**METODE:** Osnovna suspenzija hNoV GII ( $10^6$  genomskih ekvivalenata (GE)/ $\mu$ L) pripremljena je iz prethodno identifikovanog pozitivnog uzorka humanog fecesa. Mešavine hNoV suspenzije i različitih fluida (1:10): fosfatni pufer (PBS; pH=7.2, AppliChem, Barselona, Španija, koristi se kao kontrola); simulirana gastrična tečnost (SGF; pH=1.2, Ricca Chemical Company, Arlington, SAD); simulirana intestinalna tečnost (SIF, pH=7.5, USP XXII formulacija, Ricca Chemical Company, Arlington, SAD); i mleko sa niskim sadržajem mlečne masti (0.5 % mlečne masti, kupljeno u lokalnoj prodavnici, koristi se kao model hrane) inkubirane su, 2 h i 6 h na 37°C. Za ekstrakciju hNoV RNK i RT-qPCR reakcije, korišćen je kompletan real time PCR test sa RNK kitom za prečišćavanje (Rotavirus/Norovirus/Astrovirus Real-TM, Sacace Biotechnologies, Italija). Za RT-qPCR reakcije ukupne zapremine od 5  $\mu$ L korišćen je Mic Real Time PCR Cyler (Bio Molecular Systems, Australija).

**REZULTATI:** Inkubaciona vremena od 2 i 6 h na 37°C, izabrana su kako bi se simuliralo vreme prolaska oralno konzumiranih komponenti kroz gastrointestinalni trakt. Isti broj hNoV GII GE ( $5 \pm 0.8 \log_{10}$ ) detektovan je u svim eksperimentalnim varijantama nakon 2 i 6 h inkubacije, osim u varijanti SGF posle 6 h, kada je identifikovana redukcija za  $0.6 \pm 0.3 \log_{10}$  GE.

**ZAKLJUČAK:** Čestice hNoV pokazale su perzistentnost u svim ispitivanim fluidima, dokazujući njihovu rezistentnost prema uobičajenim gastrointestinalnim uslovima, kao i ukazujući na protektivnu ulogu matriksa hrane.

**ZAHVALNICA:** Istraživanje je finansirano sredstvima Ministarstva za obrazovanje, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (Projekat III 46009).

**KLJUČNE REČI:** Norovirus, model hrane, micpcr



**PERSISTENCE OF HUMAN NOROVIRUS GENOGROUP II UNDER SIMULATED  
GASTROINTESTINAL CONDITIONS AND IN FOOD MODEL**

Živković Ivana <sup>1</sup>

[dradin@agrif.bg.ac.rs](mailto:dradin@agrif.bg.ac.rs)

Lazić Dejan<sup>2</sup>, Radin Dragoslava<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Belgrade – Faculty of Agriculture, Belgrade

<sup>2</sup>East Diagnostics, Belgrade

**INTRODUCTION:** Human noroviruses (hNoV) have been recognized as the main cause of acute viral gastroenteritis worldwide. They are very easily transmitted directly or through contaminated food, water and environment. One of the reasons is their significant persistence under different harsh conditions and in diverse food matrices.

**AIM:** The aim of this study was to investigate persistence of hNoV Genogroup II under simulated gastrointestinal conditions and in milk as a food model.

**METHODS:** HNoV Genogroup II stock suspension ( $10^6$  genome equivalents (GE)/ $\mu$ L) was prepared using previously identified positive human fecal sample. Mixture of hNoV suspension and different solutions (1:10): phosphate buffer saline (PBS; pH=7.2, AppliChem, Barcelona, Spain, used as a control); simulated gastric fluid (SGF; pH=1.2, Ricca Chemical Company, Arlington, USA); simulated intestinal fluid (SIF, pH=7.5, USP XXII Formulation, Ricca Chemical Company, Arlington, USA), and low fat milk (0.5 % fat, purchased at local store, used as a food model) have been incubated for 2 and 6 h at 37°C. For hNoV RNA extraction and RT-qPCR complete real time PCR test with RNA purification kit (Rotavirus/Norovirus/Astrovirus Real-TM, Sacace Biotechnologies, Italy) has been used. RT-qPCR assays have been carried out using Mic Real Time PCR Cycler (Bio Molecular Systems, Australia) with 5  $\mu$ L total amount per reaction.

**RESULTS:** The incubation times (2 and 6 h at 37°C) were selected to simulate the transit time of orally consumed materials in gastrointestinal tract. The same amount of hNoV GII GE ( $5 \pm 0.8 \log_{10}$ ) has been detected in all experimental variants after 2 and 6 h incubation time, except for SGF after 6 h when reduction of  $0.6 \pm 0.3 \log_{10}$  GE has been identified.

**CONCLUSIONS:** HNoV particles showed persistence in all investigated solutions, demonstrating their resistance to regular gastrointestinal conditions, as well as indicating protective role of food matrix.

**KEY WORDS:** Norovirus, model food, micpcr

**ACKNOWLEDGEMENTS:** *The research was funded by Ministry of Education, Science and Technological Development Republic of Serbia (Project III 46009).*

## INDEX/INDEX AUTORA

### A

Aleksić Sabo V. ....	88, 89
Antić Stanković J. ....	185, 186
Arandelović I. ....	101, 102

### B

Babić D. ....	118, 119
Banko A. ....	51, 52
Blagojević B. ....	145, 146
Bogdanović T. ....	134, 135

### C

Cekovska Zaklina ....	92
Cvetković M. ....	32, 33
Čolović Čalovski I. ....	23, 24
Čupić M. ....	53, 56

### D

Delić S. ....	16, 17
Dimkić I. ....	168
Dubljanin E. ....	27, 28
Duđuk N. ....	205, 206
Džamić M. A. ....	122, 123
Đokić L. ....	183, 184
Đukanović S. ....	201, 202
Đukarić B. ....	124, 125

### G

Gašić K. ....	187, 188
Gobin I. ....	18, 19
Golić N. ....	178, 179

### H

Hadnađev M. ....	96, 97
------------------	--------

### I

Ilić V. M. ....	152, 153
-----------------	----------

### J

Janković A. ....	161, 162
Janjušević A. ....	64, 65
Joksimović K. ....	163, 164
Jovanović G. ....	116, 117
Jovanović L. ....	132, 133
Jovanović S. ....	95
Jovčić B. ....	166, 167

### K

Kakaraskoska Boceska B. ....	82
Karaman M. ....	156
Kekić D. ....	76, 77
Ključev I. ....	174, 175
Knežević A. ....	47, 49
Knežević G. ....	190, 191
Kocić-Tanackov S. ....	219
Kolarević S. ....	176, 177
Kovačević-Jovanović V. ....	103, 105, 120, 121
Kureljušić J. ....	147

### L

Laličić-Petronijević J. ....	181, 182
Lazarević V. ....	15
Lokoska L. ....	197, 198

### M

Manić M. ....	229, 230
Markov S. ....	172, 173
Marković S. ....	199, 200
Medić A. ....	195, 196
Mijatović S. ....	30, 31
Miladinović-Tasić N. ....	25, 26
Milić J. ....	154, 155
Milićević B. ....	227, 228
Milosavljević S. ....	130, 131
Minić P. ....	35
Mioljević V. ....	111
Mirković M. ....	235, 236
Mitrović S. ....	21, 22
Mladenović-Antić S. ....	84

### N

Najdenski M.H. ....	208
NĂȘCUȚIU Alexandra-M. ....	90
Nikšić M. ....	209, 210
Nišavić J. ....	141, 142

### O

Opavski N. ....	68, 70
-----------------	--------

### P

Panovski N. ....	91
Pantić M. ....	149
Paragi M. ....	67
Petković S. ....	223, 224

Petrovska Basovska B.....	114
Popović S.....	80, 81
Popović T.....	193, 194
Popovska I.....	136, 137
Popovska K.....	78, 79
Ptiček V.....	138, 139

**R**

Radin D.....	213
Radojević K.....	62, 63
Radojičić M.....	143, 144
Radulović Z.....	217, 218
Rikalović G. M.....	203, 204

**S**

Savić Radovanović R.....	225, 226
Simeunović J.....	170, 171
Stanković Nedeljković N.....	128, 129
Sterniša M.....	233, 234
Stevanović O.....	58
Šimunović K.....	232

Šmitran A.....	72
----------------	----

**T**

Taleski V.....	221
Tambić Andrašević A.....	110
Travar M.....	74

**V**

Veinović G.....	107, 108
Vesković Moračanin S.....	215, 216
Vitković A.....	99, 100
Vujovic N.....	211, 212
Vukašinović Sekulić M.....	237, 238
Vuković D.....	45, 46
Vuksanović P.....	126, 127

**Z**

Žeradžanin A.....	159, 160
Živković I.....	239, 240



## BIOMEDICA

### Business Model

Biomedica acts as a hub for **global suppliers** who provide state-of-the-art technology for health care and science, as well as for **local customers** with specific local needs and requirements. According to the size of the company, its financial stability and international presence, Biomedica is able to guarantee professional and flexible customer support throughout the CEE region.



## Our Partners



### Biomedica MP d.o.o.

Lazara Mamuzića 26a • 11186 Zemun, Serbia • T +381 11 630 1882 • F +381 11 630 1883  
 office@bmgrp.rs • www.bmgrp.rs



# ProMedia

Specialists In Laboratory Supplying

## SPECIJALISTI U LABORATORIJSKOM SNABDEVANJU

ProMedia se bavi prodajom laboratorijske opreme, reagenasa, hemikalija, materijala za kontrolu sterilizacije i potrošnog laboratorijskog materijala za mikrobiološke, biohemijske, citogenetske i PCR laboratorije, kao i laboratorije za kontrolu kvaliteta vode, hrane, lekova i ostale industrijske laboratorije.

## PROIZVODNJA GOTOVIH MIKROBIOLOŠKIH HRANLJIVIH PODLOGA

Naš proizvodni program je kreiran tako da kroz ponudu opštih, selektivnih i hromogenih gotovih hranljivih medijuma može zadovoljiti potrebe kliničkih i sanitarnih laboratorija, kao i potrebe farmaceutske industrije.

- RAZLIVENE HRANLJIVE PODLOGE U PETRI POSUDAMA
- RAZLIVENE HRANLJIVE PODLOGE U EPRUVETAMA I BOCAMA



## ProMedia

Specialists In Laboratory Supplying

Kralja Petra I 114,  
23300 Kikinda  
tel/fax : 0230.40.11.50, 0230.40.11.40  
office@promedia.rs

Veselina Masleše 1a,  
23000 Zrenjanin  
tel/fax : 023.580.340, 023.580.722  
office\_zr@promedia.rs

Milutina Milankovića 27,  
11070 Novi Beograd  
tel/fax: 011.344.62.09, 011.344.62.08  
office\_bg@promedia.rs



Episkopska 25/8  
18000 Niš  
tel/fax : 018.517.180, 018.519.170  
office\_ni@promedia.rs

[www.promedia.rs](http://www.promedia.rs)