

# Osjetljivost odabranih komensalnih bakterija iz mikrobiote majčinog mlijeka na antibiotike

---

**Petrinić, Andrea**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:495945>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno – biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Andrea Petrinić**

7447/N

**Osjetljivost odabranih komensalnih bakterija iz mikrobiote majčinog mlijeka na  
antibiotike**

**Završni rad**

**Predmet: Probiotici i starter kulture**

**Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak**

**Zagreb, 2020.**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno – biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

**Osjetljivost odabranih komensalnih bakterija iz mikrobiote majčinog mlijeka na antibiotike**

**Andrea Petrinić, 7447/N**

**Sažetak:** Majčino mlijeko je optimalna prehrana za novorođenče i izvor je esencijalnih nutrijenata, brojnih bioaktivnih sastojaka i prve mikrobiote koja kolonizira gastrointestinalni trakt dojenčeta. Kako mikrobiota majčinog mlijeka ima presudnu ulogu u razvoju i zdravlju novorođenčeta, značajno je ispitati moguću pojavu antibiotičke rezistencije kod komensalnih bakterija. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati osjetljivost odabranih sojeva komensalnih bakterija iz mikrobiote majčinog mlijeka na 9 različitih antibiotika metodom difuzije u agar. Za 25 komensalnih bakterija su pomoću E-testa određene i vrijednosti minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) antibiotika. Metodom lančane reakcije polimeraze identificirani su geni koji kodiraju za rezistenciju na antibiotike. Iako je primjenom fenotipskih metoda ustanovljeno da većina antibiotika nije inhibirala rast komensalnih bakterija, primjenom PCR metode nisu detektirani amplikoni koji bi upućivali na prisutnost genetičkih determinanti antibiotičke rezistencije. Utvrđena je prisutnost rezistencije na vankomicin kod *Lactobacillus* sojeva, koja je karakteristična za bakterije iz ovog roda, a radi se o urođenoj rezistenciji. Kako je u genomu svih sojeva *Staphylococcus epidermis* AF4, AF5, MB6, MB12 i RS8 te kod *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani* MB5, nakon PCR reakcije detektirana specifična DNA vrpca veličine 297 pb koja ukazuje na prisutnost *bla* gena, isključeni su iz daljnjih istraživanja.

**Ključne riječi:** antibiotička rezistencija, komensalne bakterije, mikrobiota majčinog mlijeka

**Rad sadrži:** 28 stranica, 7 slika, 6 tablica, 38 literaturna navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** prof. dr. sc. Jasna Novak

**Pomoć pri izradi:** mag. ing. Martina Banić

**Datum obrane:** 1. srpnja 2020

## Basic documentation card

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Nutrition**

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Nutrition**

### **The antibiotic susceptibility of selected commensal bacteria isolated from the human milk microbiota**

**Andrea Petrinić, 7447/N**

**Abstract:** Human breast milk is the optimal nutrition for infants, representing a rich source of the essential nutrients and diversity of bioactive compounds, as well as the child's first intestinal microbiota. As the microbiota of breast milk plays a significant role in the development and health of the newborns, characterization of the antibiotic susceptibility profiles of commensal bacteria from the human milk microbiota is essential. Therefore, the present work aimed to examine the susceptibility of selected strains of commensal bacteria isolated from breast milk microbiota to different antibiotics by the disk diffusion agar method. For 25 commensal bacteria, the values of the minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics were determined by the E - test. Antibiotic resistance genes were identified by the polymerase chain reaction (PCR) method. Although phenotypic methods showed that most of the antibiotics do not inhibit the growth of commensal bacteria, the amplicons that would indicate the presence of antibiotic resistance determinants were not detected by PCR. *Lactobacillus* strains were not susceptible to vancomycin, which is typical for bacteria of this genus, which is described as innate resistance. The genome of all *Staphylococcus epidermis* AF4, AF5, MB6, MB12 and RS8 and *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani* MB5, appeared to contain *bla* gene encoding the enzyme  $\beta$ -lactamase according to the presence of a specific band of 297 bp detected after PCR.

**Keywords:** antibiotic resistance, commensal bacteria, human milk microbiota

**Thesis contains:** 28 pages, 7 figures, 6 tables, 38 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Professor Jasna Novak, PhD

**Technical support and assistance:** Martina Banić, mag. ing.

**Defence date:** July 1<sup>st</sup>, 2020

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ovaj završni rad izrađen je u sklopu projekta kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika" (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.).

# Sadržaj

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Teorijski dio</b>	
2.1. Komensalne bakterije mikrobiote majčinog mlijeka.....	2
2.2. Definiranje sigurnosti primjene probiotika.....	4
2.3. Antibiotička rezistencija komensalnih bakterija iz majčinog mlijeka.....	4
<b>3. Materijali i metode</b>	
3.1. Materijali.....	7
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	7
3.1.2. Hranjive podloge.....	8
3.1.3. Kemikalije.....	8
3.1.4. Aparatura i pribor.....	8
3.1.5. Antibiotici.....	9
3.2. Metode rada.....	10
3.2.1. Održavanje i čuvanje bakterijskih sojeva.....	10
3.2.2. Ispitivanje osjetljivosti komensalnih bakterija na antibiotike.....	10
3.2.3. Detekcija gena za rezistenciju na antibiotike lančanom reakcijom polimeraze.....	11
<b>4. Rezultati i rasprava</b>	
4.1. Osjetljivost komensalnih bakterija mikrobiote majčinog mlijeka na antibiotike.....	14
4.2. Detekcija gena za rezistenciju na antibiotike PCR metodom.....	19
<b>5. Zaključak.....</b>	<b>26</b>
<b>6. Literatura.....</b>	<b>27</b>



# 1. Uvod

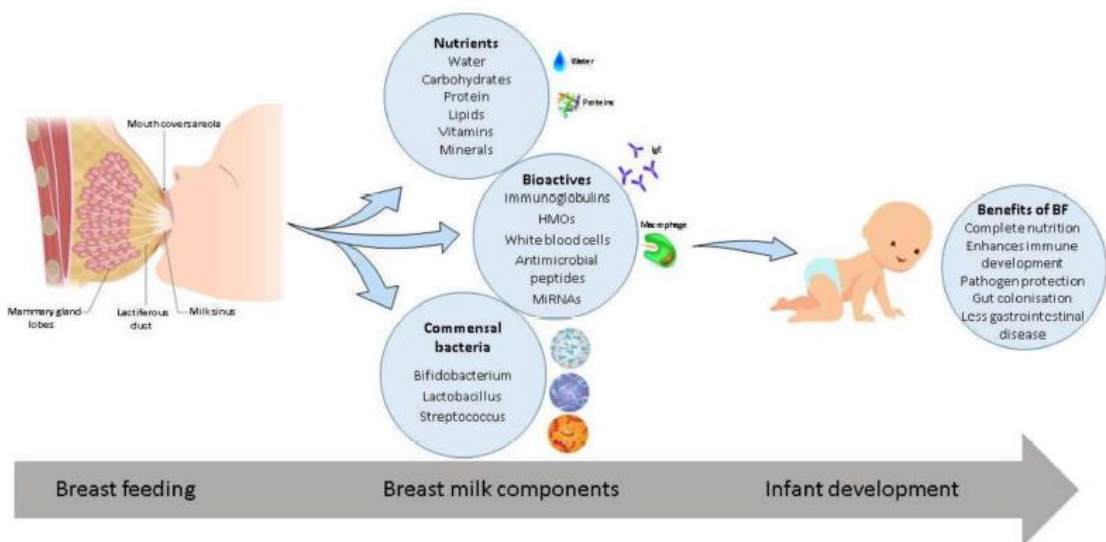
Mikrobiota čovjeka ima značajnu ulogu u održavanju zdravlja zbog njene metaboličke funkcije koja se očituje u razgradnji prehrambenih sastojaka, poticanju diferencijacije stanica domaćina i zbog protektivne (zaštitne) funkcije koja sprječava kolonizaciju patogena, te imunomodulacije (Milani i sur., 2017). Majčino mlijeko u svom sastavu sadrži različite proteine, lipide i ugljikohidrate u količinama savršeno prilagođenim nutritivnim potrebama novorođenčadi, a i prisutnu mikrobiotu za koju se pretpostavlja da je izvor prvih kolonizirajućih mikroorganizama gastrointestinalnog trakta (GIT) novorođenčadi (Delaš i sur., 2005; Pannaraj i sur., 2017), koja ima važnu ulogu tijekom razvoja novorođenog djeteta, te je majčino mlijeko mogući izvor probiotičkih bakterija. Prema definiciji probiotici su jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni u ljudi ili životinja iskazuju korisne učinke na domaćina poboljšavajući mu svojstva autohtone mikroflore. Probiotičko djelovanje bakterija mliječne kiseline (BMK) očituje se putem nekoliko mehanizama djelovanja koji obuhvaća i antimikrobno djelovanje prema patogenim mikroorganizmima u intestinalnom traktu: 1. smanjenjem broja živih bakterija putem sinteze antibakterijskih supstancija poput bakteriocina ; natjecanjem za hranjive tvari i za mjesta vezanja na intestinalnoj epitelnoj površini; 2. izmjenom metabolizma mikroorganizama poticanjem ili suprimiranjem enzimske aktivnosti i 3. poticanjem imunološkog sustava domaćina povećanjem: razine antitijela ili aktivnosti makrofaga (Šušković i sur., 1997). Međutim, prije upotrebe u prehrani ili industriji, svaki novoizolirani soj potrebno je ispitati na niz selekcijski kriterija kako bi se ispitala njegova sigurnost, funkcionalnost i mogućnost industrijske proizvodnje. Smjernice za procjenu sigurnosti probiotičkih bakterija propisuju ovlaštene institucije poput Food and Drug Administration (FDA) u Sjedinjenim Američkim Državama, European Food Safety Authority (EFSA) na razine Europe, te Food and Agriculture Organization (FAO) i World Health Organization (WHO), te još nisu ujednačeni standardi za procjenu evaluacije mikrobnih sojeva za koje se pretpostavlja da iskazuju moguće probiotičko djelovanje. Ipak, prilikom odabira, određivanje osjetljivosti odabranih sojeva na različite antibiotike i ispitivanja mogućnosti širenja antibiotske rezistencije zbog prisutnosti gena koji kodiraju za rezistenciju na antibiotike neizostavni su selekcijski kriteriji. Cilj ovog rada je ispitati osjetljivost na antibiotike odabranih izolata koji su dio mikrobne populacije majčinog mlijeka, te odrediti moguću prisutnost gena za rezistenciju na različite antibiotike primjenom PCR metode uz korištenje specifičnih početnica.



## 2. Teorijski dio

### 2.1. Komensalne bakterije mikrobiote majčinog mlijeka

Majčino mlijeko predstavlja optimalni način hranjenja obzirom da osigurava ključne nutrijente i bioaktivne komponente, kao što su antitijela, imunoglobulini, laktoferin, lizozim, antimikrobni peptidi, faktori rasta, bijela krvna zrnca i oligosaharidi majčinog mlijeka, koji su značajni za razvoj imunološkog sustava, te omogućuju zaštitu od različitih patogena i time značajno smanjuju vjerojatnost razvoja različitih poremećaja u GIT. Sastav majčinog mlijeka promjenljiv je tijekom rasta i razvoja novorođenčeta. Današnje preporuke WHO promoviraju dojenje tijekom prvih šest mjeseci djetetova života u cilju osiguravanja optimalnog rasta, razvoja i zdravlja (Lyons i sur., 2020).



**Slika 1.** Majčino mlijeko osigurava esencijalne hranjive tvari i bioaktivne komponente, te je i izvor komensalnih bakterija koje značajno doprinose rastu i razvoju djeteta i jačanju imuno sustava. Prema istraživanjima korisni učinci dojenja izravno su povezani sa zaštitom djeteta od infekcija patogenima, doprinose razvoju imunološkog sustava, predstavljaju izvor svih potrebnih hranjivih tvari koje se ne mogu nadomjesti industrijskim pripravcima za novorođenčad, potiču razvoj intestinalne mikrobiote i doprinose smanjenoj incidenciji gastrointestinalnih poremećaja/bolesti (Lyons i sur., 2020).

U prošlosti se smatralo da je majčino mlijeko sterilno, pa su se izolirane bakterije smatrale kontaminacijom koja potiče s površine majčine kože i usne šupljine djeteta, ili uslijed kontaminacija iz okoliša. Međutim, znanstvena istraživanja su doprinijela spoznajama o mikrobiomu majčinog mlijeka koji je okarakteriziran bioraznolikošću komensalnih bakterija (Lyons i sur., 2020). Gavin i Ostovar (1977) su proveli prva istraživanja mikrobiote kada su iz mlijeka dobilja izolirane brojne vrste iz porodica *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Lactobacillaceae* i *Neisseriaceae*. Uslijedila su daljnja istraživanja koja su omogućila precizniju identifikaciju prisutnih komensalnih bakterija u majčinom mlijeku koje pripadaju rodovima *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium* (Martín i sur., 2009; Lackey i sur., 2019). Na sastav mikrobiote majčinog mlijeka utječe niz egzogenih faktora. Pri tome značajnu ulogu imaju prehrambene navike roditelja, genetika, zdravlje, primjena antibiotika, indeks tjelesne mase i prirast na težini tijekom trudnoće, način poroda, te demografski i okolišni čimbenici (Lyons i sur., 2020). U majčinom mlijeku prisutne su bakterije iz rodova bakterija mliječne kiseline (BMK) *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Enterococcus* (Lyons i sur., 2020). Kako pripadaju BMK predstavnici ovih rodova su gram - pozitivne nesporogene bakterije različitih morfoloških oblika, tako da mogu biti u obliku koka, kokobacila ili štapića, tolerantne na niske pH vrijednosti (Fraqueza, 2015). BMK su izolirane iz različitih ekoloških niša, te su često BMK dio autohtone mikrobiote fermentiranih proizvoda. Mnoge od ovih bakterija su prisutne i kao dio mikrobne populacije, te su komensalne bakterije gastrointestinalnog trakta i usne šupljine čovjeka, ali i urogenitalnog sustava žena (Pradhan i sur., 2019). Kako su opisani pozitivni učinci na zdravlje domaćina često se primjenjuju kao probiotički sojevi. Korisni učinci probiotika su značajni za zdravlje gastrointestinalnog trakta, imunološkog i urogenitalnog sustava. No, novije studije upućuju i na moguće korisne učinke probiotika u suzbijanju pretilosti, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti te na moguće antimutagene i antikancerogene učinke (Pradhan i sur., 2019). Sve se više povezuju korisni učinci sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka sa zdravljem djeteta, pa se stoga istražuje i njihova potencijalna primjena kao probiotičkih bakterija. Zbog desetljeća sigurne upotrebe, BMK su stekle 'GRAS' (engl. Generally Recognized As Safe) status dodijeljen od strane Američke agencije za hranu i lijekove te 'QPS' (engl. Qualified Presumption of Safety) status koji dodjeljuje Europska agencija za sigurnost hrane.

## **2.2. Definiranje sigurnosti primjene probiotika**

Blagotvorno djelovanje probiotika na zdravlje čovjeka dokazano je nizom studija. Kako ipak govorimo o živim organizmima koji kod domaćina mogu uzrokovati promjene u fiziološkim funkcijama organizma, neizostavna je procjena sigurnosti za ljudsku uporabu na razini zasebnog soja. Danas još uvijek ne postoji globalno potvrđeni protokol kojim bi procjena sigurnosti novih sojeva bila standardizirana, već različita regulatorna tijela preporučuju različite pristupe. Kada govorimo na razini Europske unije, nije dan točan regulatorni model za odobrenje novog probiotičkog mikroorganizma. Međutim, EFSA je 2007. godine predstavila QPS – listu kriterija s ciljem generičke pred-evaluacije sigurne uporabe mikroorganizama namjerno unesenih u lanac hrane i hrane za životinje. Novi sojevi posljednji put su na listu dodani u ožujku 2019. godine. Nadalje, Europski forum za provedbu sigurnosti proizvoda (EU – PROSAFE) također je dao svoje preporuke za procjenu sigurnosti probiotika. Preporuke su se preklapale s kasnije izdanim preporukama od strane FAO/WHO i Međunarodnog instituta za životne znanosti (ILSI). S ciljem razlučivanja rezistentnih sojeva od onih osjetljivih, EFSA Znanstveni odbor za dodatke i proizvode ili tvari koji se koriste u hrani za životinje predložio je 'mikrobiološke kontrolne točke' za nekoliko rodova BMK prema odabranim značajnijim antibioticima. Procjena sigurnosti probiotika započinje s točnom identifikacijom soja. Identifikacija do razine soja nužna je obzirom da su svojstva probiotika visoko specifična za pojedini soj, što rezultira i različitim efektima na zdravlje ovisno o prisutnom soju. Utvrđivanje soja uključuje osnovne fenotipske metode čiji rezultati se potvrđuju novijim molekularnim tehnikama, kao što su metoda lančane reakcije polimeraze (engl. polymerase chain reaction; PCR), sekvencioniranje 16S rRNA i tehnika otiska DNA. Laboratorijska ispitivanja primijenjena u procjeni sigurnosti probiotika uključuju *in vitro* analize kojima se određuju različita svojstva sojeva, poput otpornosti na antibiotike ili proizvodnje toksičnih metabolita (Pradhan i sur., 2019).

## **2.3. Antibiotička rezistencija komensalnih bakterija iz majčinog mlijeka**

Još od otkrića penicilina 1928., primjena antibiotika je ključna terapija prilikom brojnih bakterijskih infekcija, što je značajno utjecalo i na produljenje životnog vijeka svjetske populacije. Nasuprot tome, nekontrolirana i nepropisana primjena tijekom desetljeća rezultirala je pojavom antibiotske rezistencije/otpornosti kod mikroorganizama koji su uspješno tretirani ovim lijekovima. Antibiotička rezistencija predstavlja sposobnost bakterije da preživi i raste pri

koncentraciji antibiotika koje inače inhibirale njen rast i razmnožavanje (Fraqueza, 2015). Antibiotička rezistencija je posljedica nekontrolirane primjene antibiotika u humanoj i veterinarskoj medicini, poljoprivredi i akvakulturi. Međutim, znanstvene spoznaje upućuju i na spontanu prisutnost gena za antibiotičku rezistenciju kod mikroorganizama i mnogo prije nego što su otkriveni antibiotici kao lijekovi (Fraqueza, 2015; D'Costa i sur., 2011). Dodatni problem u kontekstu globalne zdravstvene krize je i nedostatak učinkovitih lijekova kako bi nadomjestili one koji gube efikasnost. U protekla dva desetljeća, intenzivna istraživanja BMK, uglavnom modelne BMK *Lactococcus lactis* i pojedinih vrsta roda *Lactobacillus*, doprinijela su novim, potencijalnim biomedicinskim primjenama uključujući proizvodnju imunostimulatora, pomoćničkih molekula koje imaju ulogu u dodatnoj stimulaciji imunskog sustava (eng. adjuvant), kao vektori za isporuku lijekova pa i kao proizvođači tvari s ljekovitim djelovanjem (Wyszyńska i sur., 2015). Danas je poznato da su zdravstvene tvrdnje povezane s BMK specifične za pojedini soj, stoga i njihova sigurnost za upotrebu treba biti procijenjena na razina svakog soja zasebno.

Karakterizacija antibiotičke rezistencije od iznimne je važnosti kod odabira sojeva promatrano s aspekta sigurnosti upotrebe. Mehanizmi kojima mikroorganizam izbjegava fatalan ishod primjene antibiotika mogu djelovati 1. izravnom inaktivacijom aktivne molekule; 2. gubitkom osjetljivosti na antimikrobnu supstancu modifikacijom područja ciljanog djelovanja; 3. smanjenjem koncentracije lijeka koja djeluje na ciljane molekule, bez modifikacije samog lijeka (Fraqueza, 2015). S evolucijske točke gledišta, bakterije karakterizira urođena ili primarna (intrinzična) te sekundarna ili stečena rezistencija. Intrinzična rezistencija je kromosomski kodirana te se ne prenosi horizontalno. Suprotno tome, stečena rezistencija može biti prisutna kod nekih sojeva unutar vrste koja je inače podložna na promatrani antibiotik i može se širiti horizontalno među bakterijama (Pradhan i sur., 2019). Razvoj stečene rezistencije javlja se kao rezultat mutacije gena na razini kromosoma ali i stjecanjem vanjskih genetskih determinanti otpornosti. Usvajanje stranog genetičkog materijala putem horizontalnog prijenosa jedan je od najvažnijih pokretača bakterijske evolucije (Munita i Arias, 2016). BMK su također sklone razmjeni genetskog materijala s ciljem preživljavanja u okolišu u kojem je primijenjen antibiotik, no BMK ne bi smjele služiti kao izvor gena antibiotičke rezistencije (Pradhan i sur., 2019). Primarni razlog tome je neželjen prijenos gena za antibiotičku rezistenciju na patogene mikroorganizme, budući da se infekcije uzrokovane ovim bakterijama teže liječe. Posebno su pogođeni najranjiviji pacijenti, što rezultira produženom bolešću i povećanom smrtnošću. K tome, obzirom da je liječenje dugotrajnije, i troškovi su viši. U svom izvještaju iz 2014. godine, World Health Organization (WHO) izvještava o antibiotičkoj rezistenciji kao rastućem javnozdravstvenom problemu koji ugrožava postignuća moderne

medicine. Također, WHO upozorava da post – antibiotička era, u kojoj česte infekcije i manje ozljede mogu dovesti do velikih zdravstvenih komplikacija, nije tako daleko kao što se mislilo.

Horizontalni prijenos gena podrazumijeva prijenos genetičkog materijala između stanica koje nisu u srodstvu. Izmjena genetskog materijala kod bakterija može se odvijati na tri načina: transformacijom, transdukcijom ili konjugacijom. U bolničkim uvjetima, nagla pojava rezistencije uslijed terapije antibiotikom često aktivira konjugaciju koja pokazuje visoku učinkovitost prenošenja gena sa stanice na stanicu te je vjerojatno da će se takav oblik stjecanja rezistencije aktivirati u gastrointestinalnom traktu čovjeka nakon antibiotičke terapije. Općenito, konjugacija se odvija putem izmjene mobilnih genetskih elemenata iako je primijećen i direktan prijenos s kromosoma na kromosom. Plazmidi i transpozoni su pokretljive genetičke determinante važne u kontekstu prijenosa antibiotičke rezistencije (Munita i Arias, 2016). Prisutnost pokretnih markera antibiotičke rezistencije u procjeni sigurnosti BMK sojeva vrlo je važan parametar, budući da su neki geni koji osiguravaju rezistenciju na pojedine antibiotike (npr. kloramfenikol, eritromicin, streptomycin, tetraciklin i vankomicin), a koji se nalaze na prenosivom genetičkom materijalu, opisani kod laktobacila (Pradhan i sur., 2019). *In vitro* istraživanja upućuju da BMK mogu prenijeti svoje determinante rezistencije na druge vrste bakterija. Sljedeće, provedeni su i *in vivo* eksperimenti na gnotobiotičkim štakorima i miševima u kojima je ustanovljena mogućnost prijenosa antibiotičke rezistencije među BMK i drugih komensalnih bakterija u gastrointestinalnom traktu (Jacobsen i sur., 2007; Feld i sur., 2008). Povećana frekvencije prijenosa primijećena je u eksperimentima kad je ispitivanim životinjama dana doza antibiotika manja od one s terapijskim učinkom što sugerira da povećanje antibiotičkog pritiska može pojačati transfer antibiotičke rezistencije (Licht i Wilcks, 2005). BMK mogu prenijeti determinante antibiotičke rezistencije, stoga je prije unošenja u organizam potrebno ispitati njihovu osjetljivost na antibiotike budući da mogu djelovati kao rezervoari gena rezistencije, što omogućuje širenje rezistencije posebno u mikrobnim populacijama visoke gustoće.

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu provedeno je ispitivanje osjetljivosti na antibiotike 25 sojeva izoliranih iz mikrobiote majčinog mlijeka. U tablici 1. su navedeni bakterijski izolati identificirani sekvencioniranjem 16S rDNA (Macrogen, Nizozemska). Sojevi su pohranjeni u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

**Tablica 1.** Komensalni bakterijski sojevi izolirani iz mikrobiote majčinog mlijeka korišteni u ovom radu:

<b>Oznaka bakterijskog soja</b>	<b>16S identifikacija</b>
KR19	<i>Lactobacillus plantarum</i>
KR20	<i>Enterococcus faecium</i>
MC1	<i>Lactobacillus fermentum</i>
MC2	<i>Enterococcus faecalis</i>
MC5	<i>Staphylococcus epidermis</i>
MC13	<i>Enterococcus faecium</i>
MC19	<i>Lactobacillus plantarum</i>
AF2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
AF4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
AF5	<i>Staphylococcus epidermis</i>
AF12	<i>Enterococcus durans</i>
AF16	<i>Enterococcus faecium</i>
MB5	<i>Streptococcus oralis</i> subsp. <i>dentisani</i>
MB6	<i>Staphylococcus epidermis</i>
MB7	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MB9	<i>Streptococcus</i> sp.
MB10	<i>Streptococcus salivarius</i>
MB11	<i>Streptococcus oralis</i>
MB12	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
MB15	<i>Lactobacillus plantarum</i>
RS4	<i>Streptococcus oralis</i>
RS8	<i>Staphylococcus epidermis</i>
RS10	<i>Lactobacillus plantarum</i>
RS17	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
RS19	<i>Streptococcus mitis</i>

### 3.1.2. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće hranjive podloge za uzgoj bakterija mliječne kiseline:

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/l destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  0,1;  $MnSO_4 \times 7H_2O$  0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.
- MRS bujon: istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara
- Hranjivi agar i hranjivi bujon

### 3.1.3. Kemikalije

- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- Nuclease Free Water, „Takara“, Japan
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- standard za elektroforezu proteina ProSieve QuadColor (molekulske mase 4,6-315 kDa), „Lonza“, SAD
- početnice „Invitrogen“, SAD
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim
- agarozna, „Appligane“, Francuska
- $\lambda$  DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada
- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- EmeraldAmp, Max HS PCR Master Mix (2x Premix), „Takara“, Japan

### 3.1.4. Aparatura i pribor

- epruvete
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- ependorfice
- kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml
- stalci za ependorfice
- stalci za epruvete
- pinceta
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija

- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD
- Sonopuls mini20 sonifikator, „Bandelin“, Njemačka
- elektroforetske kadice, „Cleaver, Scientific Ltd“, Velika Britanija
- DNA-termoblok, „Eppendorf“, SAD
- transiluminator MiniBIS Pro, DNT
- Petrijeve zdjelice

### **3.1.5. Antibiotici**

Za ispitivanje osjetljivosti izoliranih bakterijskih sojeva na antibiotike disk-difuzijskom metodom koriste se filter diskovi promjera 6 mm s poznatom koncentracijom određenog antibiotika BD BBL™ Sensi-Disc™ (BD Diagnostic Systems, SAD). U radu su korišteni sljedeći antibiotici:

- ampicilin 10 µg
- eritromicin 15 µg
- gentamicin 10 µg
- klindamicin 2 µg
- kloramfenikol 30 µg
- kanamicin 30 µg
- streptomycin 10 µg
- tetraciklin 30 µg
- vankomicin 30 µg

Osjetljivost odabranih bakterijskih sojeva na gore navedene antibiotike ispitana je i primjenom E-testa (M. I. C. E. Evaluators™, Oxoid Ltd, UK), odnosno očitavanjem minimalne inhibicijske koncentracije na vrhu zone inhibicije oko vrpce koja sadrži antibiotik (ampicilin, eritromicin, gentamicin, klindamicin, kloramfenikol, kanamicin, tetraciklin, vankomicin) u gradijentu koncentracije 0,016-256 µg/mL, odnosno streptomycin u gradijentu koncentracije 0,064-1026 µg/mL.



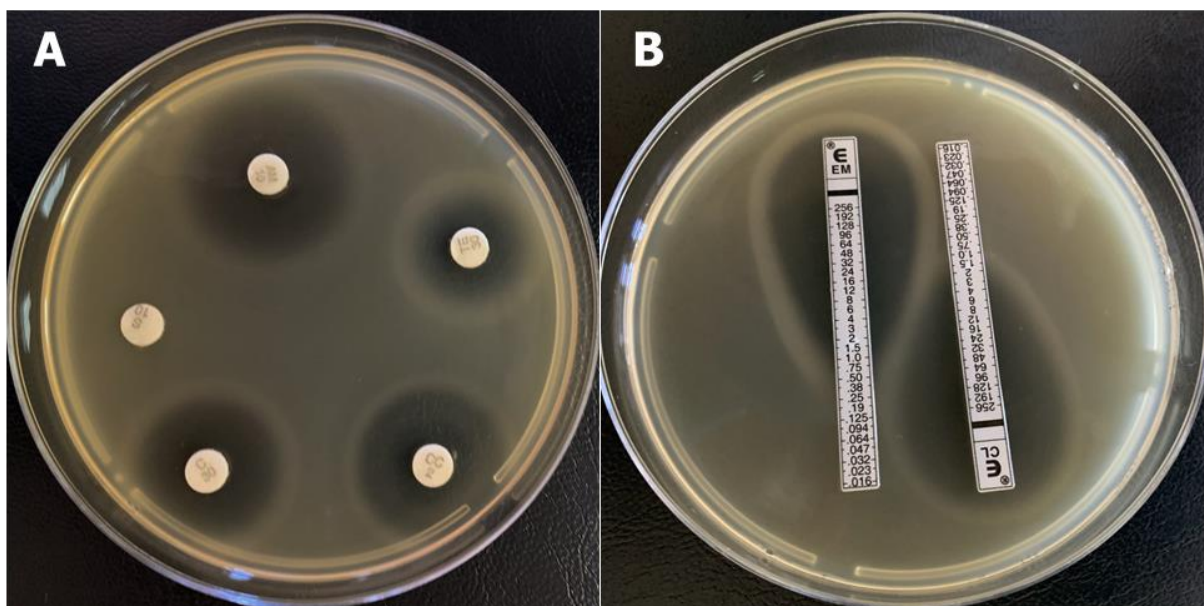
## **3.2. Metode rada**

### **3.2.1. Održavanje i čuvanje bakterijskih sojeva**

Sojevi bakterija mliječne kiseline su čuvani pri  $-80^{\circ}\text{C}$  u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi su inokulirani u svježu hranjivu podlogu te inkubirani anaerobno pri  $37^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.2. Ispitivanje osjetljivosti komensalnih bakterija na antibiotike**

Osjetljivost bakterija na antibiotike ispitana je metodom difuzije antibiotika na krutim hranjivim podlogama disk-difuzijskom metodom i E-testom za određivanje minimalne inhibicijske koncentracije antibiotika (MIC). 100  $\mu\text{l}$  prekončne bakterijske kulture, čija se osjetljivost ispituje, podešene optičke gustoće (engl. Optical Density, OD) na  $\text{OD}=2$ , inokulira se u 12 ml MRS-agar hranjive podloge koja je prethodno otopljena i ohlađena na  $50^{\circ}\text{C}$ . Tako inokulirana hranjiva podloga izlije se u Petrijeve zdjelice. Kad se hranjiva podloga skrutne, sterilnom pincetom nanose se filter-diskovi s antibioticima. Potom se ploče inkubiraju pri  $37^{\circ}\text{C}$  preko noći, nakon čega slijedi mjerenje promjera zona inhibicije, uključujući i promjer diska. Za pripremu E-testa, na hranjivu podlogu inokuliranu s bakterijskom kulturom se sterilnom pincetom nanose vrpce koje sadrže antibiotik u gradijentu koncentracije. Petrijeve ploče se inkubiraju pri  $37^{\circ}\text{C}$  preko noći nakon čega slijedi očitavanje minimalne inhibicijske koncentracije (engl. Minimal Inhibitory Concentration, MIC) na vrhu zone inhibicije oko vrpce, prema uputama proizvođača.



**Slika 2. A)** Zone inhibicije uslijed inhibicijskog djelovanja antibiotika prema soju *Staphylococcus epidermidis* RS17 ispitana disk-difuzijskom metodom te **B)** Određivanje minimalne inhibicijske koncentracije antibiotika ampicilina prema *S. epidermidis* primjenom E-testa.

### 3.2.3. Detekcija gena za rezistenciju na antibiotike lančanom reakcijom polimeraze

Nakon prekonocnog uzgoja pojedinih bakterijskih sojeva provedena je izolacija ukupne DNA. Izolacije DNA provedena je pomoću The Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, SAD) prema uputama proizvođača. Nakon ekstrakcije DNA iz odabranih bakterijskih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka provedena je PCR reakcija sa specifičnim početnicama za detekciju gena za rezistenciju na antibiotike (Tablica 2). Sastav reakcijske smjese volumena 20  $\mu$ L prikazan je u Tablici 3. PCR reakcija se odvija prema uvjetima navedenim u Tablici 4. Nakon završetka PCR reakcije, 17  $\mu$ l reakcijske smjese se nanosi na 2 % agarozni gel i elektroforeza se provodi u kadici za elektroforezu pri naponu od 100 V. Standard se sastoji od 0,25  $\mu$ L  $\lambda$  DNA HindIII i 0,5  $\mu$ L 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD). Nakon završetka elektroforeze, gel se boji u etidijevom bromidu koncentracije 0,5  $\mu$ g/mL i vizualizira ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture verzija 7.1 (DNR Bio - Imaging Systems Ltd., Izrael).

**Tablica 2.** Specifične početnice za gene za rezistenciju na antibiotike i uvjeti PCR reakcije.

Antibiotik	Ciljani gen	Početnice (5'-3')	Temp. vezanja početnica	Veličina PCR produkta	Referenca
gentamicin	<i>aac(6')Ie-aph(2'')Ia</i>	CACTATCATAACCACTACCG CAGAGCCTTGGGAAGATGAA G	58	348	Bujnakova i sur. (2014)
streptomycin	<i>aadE</i>	GCAGCGCAATGACATTCTTG ATGGAATTATCCACCTGA	50	565	Ouoba i sur. (2008)
kanamicin	<i>aph(3'')-III</i>	GCCTTTCCGCCACCTCACCG GCCGATGTGGATTGCGAAAA	52	292	Ouoba i sur. (2008)
tetraciklin	<i>tet(W)</i>	CAGCAGATCCTACTCCTT GAGAGCCTGCTATATGCCAG C	64	168	Kastner i sur. (2006)
eritromicin	<i>erm(B)</i>	GGGCGTATCCACAATGTAA C	54	639	Aquilanti i sur. (2007)
klindamicin	<i>lnu(B)</i>	GAAAAGGTAICTCAACCAAATA GCTTCTTTTCAAATACATGGT ATTTTTCGATC CCTACCTATTGTTTGTGGAA	54	925	Liu i sur. (2009)
kloramfenikol	<i>catA</i>	ATAACGTTACTCTCTATTTTC GGATATGAAATTTATCCCTC	50	486	Rojo-Bezares i sur. (2006)
ampicilin	<i>Bla</i>	TAGGTTTCAGATTGGCCCTTA G CATARTTCCGATAATASMGCC GTCGATTCTCGCTAATCC TCGCGGTAGTCCCACCATTC GTT	51	297	Hummel i sur. (2007)
vankomicin	<i>vanX</i>	AAATCATCGTTGACCTGCGTT AT	55	454	Liu i sur. (2009)

**Tablica 3.** Sastav reakcijske smjese za provođenje PCR reakcije.

Sastojci reakcijske smjese	Volumen
EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (2x Premix)	10 µL
Kalup (DNA)	1 µL
Početnica 1	0,04 µL
Početnica 2	0,04 µL
dH <sub>2</sub> O	8,92 µL
<b>Ukupno</b>	<b>20 µL</b>

**Tablica 4.** Uvjeti provođenja PCR reakcije.

Broj ponavljanja	T [°C]	Vrijeme
1	94	5 min
	94	1 min
30	Pogledati u tablici 2	1 min
	72	2 min
1	72	5 min

## **4. Rezultati i rasprava**

### **4.1. Osjetljivosti komensalnih bakterija mikrobiote majčinog mlijeka na antibiotike**

Pojava rezistencije na antibiotike različitih bakterijskih sojeva predstavlja jedan od najvećih zdravstvenih izazova medicine. Pojava višestruko rezistentnih bakterija, odnosno mutantnih sojeva koji pokazuju rezistenciju na više različitih antibiotika, kao posljedica prekomjernog i nepropisanog korištenja antibiotika širokog spektra u terapijske svrhe, kao i za poticanje rasta životinja na farmama, predstavlja globalni zdravstveni problem. Za sustavno prikupljanje podataka i analizu rezultata pojave antibiotske rezistencije značajno je uspostaviti standardizaciju rada mikrobioloških laboratorija, koja je potaknuta 2011. godine sukladno preporukama EUCAST (engl. European committee for antibiotic sensitivity testing) te su usvojeni europski standardi pri izradi i interpretaciji antibiograma. Zbog mogućnosti prijenosa gena za antibiotsku rezistenciju primjerice putem horizontalnog prijenosa gena među bakterijama, osim kontrole antibiotske rezistencije patogenih bakterija, neophodno je provoditi i ispitivanja prisutnosti rezistencije kod nepatogenih, komensalnih bakterija. To podrazumijeva karakterizaciju profila osjetljivosti na antibiotike bakterijskih sojeva koji su prirodno prisutni u fermentiranim mikrookolišima ili se primjenjuju kao (funkcionalne) starter kulture u ishrani životinja i prehrani čovjeka jer može doći do horizontalnog prijenosa gena za rezistenciju na antibiotik iz patogenih bakterija prisutnih u intestinalnoj mikrobioti domaćina (Šušković i sur., 2010). Stoga je jedan od glavnih općih izbornih kriterija pri odabiru potencijalnih probiotičkih sojeva njihova osjetljivost na antibiotike (Šušković i sur., 2001). Kako je posljednjih godina značajno povećan broj znanstvenih istraživanja o važnosti mikrobiote majčinog mlijeka u razvoju, rastu i očuvanju zdravlja novorođenčeta, značajno je i provesti karakterizaciju osjetljivosti komensalnih bakterija mikrobiote majčinog mlijeka na antibiotike, u kontekstu mogućeg doprinosa sprječavanja širenja antibiotske rezistencije. Upravo zato je u ovom radu pomoću disk – difuzijske metode i E- testa ispitana osjetljivost komensalnih bakterijskih sojeva izoliranih iz mikrobiote majčinog mlijeka na 9 različitih antibiotika (ampicilin, vankomicin, gentamicin, kanamicin, streptomycin, eritromicin, klindamicin, tetraciklin i kloramfenikol). Antibiotici su odabrani prema smjernicama Europske agencije za sigurnost hrane (engl. European Food Safety Authority, EFSA) iz 2012., prema kojima je ispitana osjetljivost probiotičkih sojeva namijenjenih za primjenu kod ljudi i životinja. Vrijednosti promjera zona inhibicije određene za pojedine sojeve komensalnih bakterija disk-difuzijskom

metodom su uspoređeni sa standardima Instituta za kliničke i laboratorijske studije (engl. Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI).

**Tablica 5.** Osjetljivost komensalnih bakterija mikrobiote majčinog mlijeka na antibiotike određena disk – difuzijskom metodom

Bakterijski soj	Antibiotik								
	AM	CC	C	E	VA	TE	K	CN	S
MC1	S	S	S	I	R	I	R	R	R
KR19	S	I	S	I	R	I	R	R	R
MB7	S	S	S	S	R	I	R	R	R
MB15	S	S	S	I	R	S	R	R	R
MC19	I	I	S	I	R	I	R	R	R
RS10	S	I	S	I	R	I	R	R	R
AF12	I	I	I	I	I	I	R	R	R
AF16	I	I	I	I	I	S	R	R	R
KR20	I	I	I	I	I	S	R	R	R
MC2	I	R	I	I	I	I	R	R	R
MC13	I	I	I	I	I	S	R	R	R
MB5	S	S	S	I	R	S	R	R	R
MB9	S	S	S	S	S	S	R	R	I
MB10	S	S	S	S	S	S	R	R	S
MB11	S	S	S	S	S	S	R	R	S
RS4	S	S	S	I	R	I	R	R	R
RS19	S	S	S	S	R	S	R	R	I
AF2	S	S	S	I	R	S	R	R	R
AF4	R	S	S	S	R	I	R	R	R
AF5	R	R	I	R	R	S	R	R	R
MB6	R	S	S	R	I	I	R	R	R
MB12	R	S	S	R	R	I	R	R	R
MC5	I	I	S	R	R	S	R	R	R
RS8	S	S	S	I	R	I	R	R	R
RS17	S	S	S	S	R	S	R	R	R

\*S-osjetljiv; I-srednje osjetljiv; R-rezistentan; \*(ampicilin (AM), klindamicin (CC), kloramfenikol (C), eritromicin (E), vankomicin (VA), tetraciklin (TE), kanamicin (K), gentamicin (CN) i streptomycin (S))

\*\*\* SIVA-*Lactobacillus*; PLAVA-*Enterococcus*; ZELENA-*Streptococcus*; ŽUTA-*Staphylococcus*

Prema CLSI standardima, bakterijski sojevi kojim su određene vrijednosti promjera zona inhibicije veće ili jednake 20 mm se smatraju osjetljivim (engl. Sensitive, S); vrijednosti promjera zona inhibicije od 15-19 mm se smatraju umjereno osjetljivim (engl. Intermediate, I); vrijednosti promjera zona inhibicije manjim ili jednakim 14 mm smatraju se rezistentnima na antibiotik prisutan u filter – disku. Prema rezultatima disk – difuzijske metode prikazanim u Tablici 5, svi ispitani sojevi pokazuju fenotipski rezistenciju na antibiotike kanamicin i gentamicin koji pripadaju skupini aminoglikozidnih antibiotika. Dodatno, svi ispitani sojevi su fenotipski osjetljivi ili srednje osjetljivi na kloramfenikol. Rezultati E-testa su izraženi pomoću MIC vrijednosti te uspoređeni s graničnim vrijednostima (engl. Cut-off values; Critical breakpoints) za antibiotsku osjetljivost bakterija koje je 2012. godine propisala EFSA za vrste *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum* i *Enterococcus faecium* te CLSI za preostale *Enterococcus* vrste te sve *Staphylococcus* i *Streptococcus* vrste. (Tablica 6).

**Tablica 6.** Vrijednosti MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) antibiotika potrebne za inhibiciju rasta komenzalnih bakterija mikrobiote majčinog mlijeka određene E - testom

Bakterijski soj	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )								
	AM	CM	CL	EM	VA	TC	KM	GM	SM
MC1	0,032 (S)	0,016 (S)	1,5 (S)	0,19 (S)	/ (n.p.)	1 (S)	96 (R)	6 (S)	32 (S)
KR19	0,125 (S)	0,19 (S)	1,5 (S)	0,75 (S)	/ (n.p.)	1 (S)	/ (R)	24 (R)	64 (n.p.)
MB7	0,016 (S)	0,016 (S)	1,5 (S)	0,75 (S)	/ (n.p.)	1,5 (S)	/ (R)	48 (R)	192 (n.p.)
MB15	0,032 (S)	0,047 (S)	2 (S)	0,75 (S)	/ (n.p.)	1,5 (S)	/ (R)	48 (R)	256 (n.p.)
MC19	1 (S)	0,38 (S)	2 (S)	0,75 (S)	/ (n.p.)	1,5 (S)	/ (R)	64 (R)	/ (n.p.)
RS10	0,047 (S)	0,094 (S)	2 (S)	0,25 (S)	/ (n.p.)	4 (S)	/ (R)	24 (R)	96 (n.p.)
AF12	0,125 (S)	0,38	1,5 (S)	3 (I)	1 (S)	1,5 (S)	/	48 (S)	96 (S)
AF16	0,25 (S)	0,38 (S)	1,5 (S)	3 (S)	1 (S)	0,094 (S)	/ (S)	24 (S)	192 (R)
KR20	0,125 (S)	0,25 (S)	2 (S)	3 (S)	0,75 (S)	0,094 (S)	/ (R)	24 (S)	64 (S)
MC2	0,19 (S)	/	2 (S)	/ (R)	2 (S)	12 (I)	/ (R)	/ (R)	256 (S)
MC13	/ (R)	0,5 (S)	2 (S)	3 (S)	1,5 (S)	0,125 (S)	/ (R)	/ (R)	/ (R)
MB5	0,032 (S)	0,023 (S)	3 (S)	0,5 (I)	/ (R)	6 (I)	/	48 (S)	256
MB9	0,016 (S)	0,016 (S)	0,19 (S)	0,19 (S)	0,38 (S)	4 (I)	/	32 (S)	3
MB10	0,75 (I)	0,016 (S)	0,38 (S)	0,5 (I)	0,75 (S)	6 (I)	/	128 (S)	3
MB11	0,023 (S)	0,016 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)	0,38 (S)	6 (I)	/	32 (S)	2

RS4	0,064 (S)	0,064 (S)	2 (S)	0,5 (I)	/ (R)	4 (I)	/	24 (S)	128
RS19	0,032 (S)	0,016 (S)	1 (S)	0,19 (S)	/ (R)	3 (I)	/	16 (S)	48
AF2	0,016	0,094 (S)	2 (S)	0,5 (S)	/ (R)	2 (S)	/	24 (R)	128
AF4	3	0,064 (S)	1 (S)	0,19 (S)	/ (R)	4 (S)	/	12 (I)	64
AF5	0,75	0,25 (S)	1,5 (S)	3 (I)	2 (S)	0,094 (S)	/	48 (R)	256
MB6	12	0,064 (S)	1,5 (S)	24 (R)	2 (S)	4 (S)	/	24 (R)	12
MB12	16	0,032 (S)	1,5 (S)	1,5 (I)	2 (S)	8 (I)	2	2 (S)	3
MC5	0,75	0,38 (S)	2 (S)	3 (I)	2 (S)	0,094 (S)	/	96 (R)	256
RS8	0,064	0,125 (S)	2 (S)	0,25 (S)	/ (R)	2 (S)	/	24 (R)	128
RS17	0,064	0,094 (S)	1,5 (S)	0,25 (S)	/ (R)	2 (S)	/	24 (R)	128

\*S-osjetljiv; I-srednje osjetljiv; R-rezistentan; n.p. – nije potrebno provjeravati (osjetljivost nije potrebno ispitati prema EFSA); n.o. – nije određeno (granična vrijednost nije propisana prema EFSA-ili prema CLSI)

\*\* ampicilin (AM), klindamicin (CM), kloramfenikol (CL), eritromicin (EM), vankomicin (VA), tetraciklin (TC), kanamicin (KM), gentamicin (GM) i streptomycin (SM)

Prema rezultatima sojevi *Lactobacillus* vrsta KR19, MC1, MC19, MB7, MB15 i RS10 pokazuju fenotip prema kojem su osjetljivi ili umjereno osjetljivi na pet primijenjenih antibiotika, no nisu pokazali osjetljivost na vankomicin te aminoglikozidne antibiotike (kanamicin, gentamicin i streptomycin). Većina bakterija iz roda *Lactobacillus* ima urođenu rezistenciju na kanamicin, gentamicin, streptomycin, vankomicin, neomicin, ciprofloksacin, trimetoprim, metronidazol, sulfametoksazol i bacitracin, dok su osjetljivi na  $\beta$ -laktamske antibiotike, kloramfenikol, tetraciklin, eritromicin, linezolid i kvinepristin-dalfopristin (Fraqueza, 2015; Abriouel i sur., 2015). Jedna od najbolje okarakteriziranih rezistencija *Lactobacillus* sojeva je na vankomicin, koja se ne smatra prijatnom jer su geni za rezistenciju locirani na kromosomu i prema tome njihova rezistencija nije prenosiva na druge bakterijske sojeve, za razliku od stečene rezistencije posredovane plazmidima i transpozonomima koja ima veliki potencijal za prenošenje na druge bakterijske vrste, što je slučaj kod pojedinih vankomicin – rezistentnih vrsta iz roda *Enterococcus* (Coeuret i sur., 2004). *Lactobacillus* sojevi su rezistentni na vankomicin jer se terminalni D-Ala-D-Ala dipeptid peptidoglikana na koji se veže vankomicin s citoplazmatske strane stanične stijenke bakterije zamjenjuje D-Ala-D-laktatom ili D-Ala-D-serinom, što sprječava vezanje vankomicina s citoplazmatske strane stanične stijenke (Gueimonde i sur., 2013). Iako postoji sve više dokaza o nefrotoksičnosti vankomicina (Neely i sur., 2018), ovaj antibiotik još uvijek predstavlja posljednju liniju obrane kod ozbiljnih infekcija uzrokovanim

stafilokokima, enterokokima i drugim Gram-pozitivnim patogenim bakterijama te u liječenju pseudomembranskog kolitisa (Dinu i sur., 2020). Rezistencija na aminoglikozidne antibiotike se također smatra urođenom kod *Lactobacillus* sojeva jer oni ne posjeduju citokromom-posredovani transport elektrona koji sudjeluje u unosu antibiotika (Gueimonde i sur., 2013).

Prema rezultatima E-testa i disk-difuzijske metode, *Lactobacillus* sojevi izolirani mikrobiote majčinog mlijeka se smatraju sigurnima za primjenu, ali da bi se potvrdilo da rezistencija nije stečena, provedena je i genotipska karakterizacija rezistencije pomoću PCR-metode primjenom početnica za gene za antibiotsku rezistenciju, odnosno koji se nalaze na prijenosnim genetičkim elementima (plazmidima i transpozonomima). Genotipska karakterizacija prisutnosti gena za rezistenciju na antibiotike je nužna za potvrdu sigurne primjene potencijalnih probiotičkih sojeva kod ljudi i životinja jer je već dokazana prisutnost gena rezistencije na više antibiotika poput kloramfenikola, eritromicina, streptomcina, tetraciklina i vankomicina na prijenosnim genetičkim elementima laktobacila (Comunian et al., 2010). Sojevi iz roda *Enterococcus* imaju urođenu rezistenciju na veliki broj antibiotika uključujući cefalosporine, sulfonamide, oksacilin, perfloksacin, ertapenem i perfloksacin, dok pojedini sojevi vrste *E. faecalis* i *E. faecium* dodatno nose rezistenciju i na aminoglikozidne antibiotike, klindamicin, eritromicin, trimetoprim–sulfametoksazol i fusidnu kiselinu (Kateete i sur., 2019). Prema rezultatima prikazanim u Tablici 5. i 6., većina enterokoka izoliranih iz majčinog mlijeka (KR20, MC13, AF12 i AF16) su fenotipski osjetljivi na većinu antibiotika osim pojedinih aminoglikozidnih antibiotika i ampicilina, na kojeg je fenotipsku rezistenciju pokazao samo soj MC13 koji se ubraja u vrstu *E. faecium* za koju je karakteristična urođena rezistencija na ampicilin. Iako je niska razina rezistencije na aminoglikozidne antibiotike intrinzična kod enterokoka, pokazalo se da sojevi visokorezistentni na aminoglikozide često imaju gene za rezistenciju na navedene antibiotike na plazmidima i konjugativnim transpozonomima (Zarrilli i sur., 2005). Soj *E. faecalis* MC2 pokazao je višestruku fenotipsku rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike i klindamicin, koja se smatra posljedicom intrinzične rezistencije, ali i rezistenciju na eritromicin te je potrebno PCR metodom provjeriti je li višestruka rezistencija koju je pokazao fenotipskim metodama urođena ili stečena. Poput enterokoka, streptokoki također posjeduju intrinzičnu rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike i fusidnu kiselinu (Cattoir, 2016) dok su rezistencije streptokoka na ostale antibiotike većinom stečene, iako su neki autori dokazali da određeni streptokoki posjeduju intrinzičnu rezistenciju na ciprofloksacin, oksacilin, linezolid, fosfomicin, daptomicin, mupirocin i vankomicin (Vestergaard i sur., 2016). Pokazalo se da su svi ispitani sojevi streptokoka (MB5, MB9, MB10, MB11, RS4 i RS19) fenotipski rezistentni na jedan ili više aminoglikozidnih antibiotika, dok su sojevi MB5,



RS4 i RS19 dodatno fenotipski rezistentni i na vankomicin. Svi stafilokoki korišteni u radu (MC5, AF2, AF4, AF5, MB6, MB12, RS8, RS17) su pokazali rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike i/ili vankomicin.

## 4.2. Detekcija gena za rezistenciju na antibiotike PCR reakcijom

S ciljem ispitivanja prisutnosti gena za rezistenciju na određene antibiotike u kromosomskoj DNA 25 komensalnih bakterija ili na pokretnim genetičkim elementima, provedena je PCR reakcija uz primjenu specifičnih početnica za gene antibiotičke rezistencije. Kod ispitivanja prisutnosti gena za rezistenciju na klindamicin, eritromicin i kanamicin nema vidljivog signala što znači da nije došlo do amplifikacije ciljanih DNA sekvenci, odnosno nisu prisutni geni za rezistenciju na navedene antibiotike. Nakon DNA elektroforeze PCR produkata, kod stafilokoka AF4, AF5, MB6, MB12 i RS8 te kod streptokoka MB5, uočena je specifična DNA vrpca veličine 297 pb koja ukazuje na prisutnost *bla* gena koji kodiraju za enzim  $\beta$ -laktamazu koja uvjetuje rezistenciju bakterijskih sojeva na ampicilin, a nalazi se na plazmidu što znači da su podložni horizontalnom transferu. Navedeni sojevi su eliminirani iz eksperimenata koji obuhvaćaju istraživanja probiotičkog koncepta jer nisu sigurni za primjenu. Osim toga, DNA elektroforezom produkata PCR reakcije u kojima su korištene početnice za gen *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* uočene su vrpce odgovarajuće veličine (348 pb) kod enterokoka MC2, streptokoka MB5, MB9, MB10 i MB11 te kod stafilokoka AF4 i MB12. Budući da se navedeni gen nalazi na pokretnim genetičkim elementima bakterija i podložan je horizontalnom transferu, navedeni sojevi se trebaju isključiti iz daljnjih eksperimenata. Niti jedan *Lactobacillus* soj nije pokazao stečenu rezistenciju na antibiotike stoga se s aspekta antibiotičke rezistencije mogu smatrati sigurnima za primjenu kao probiotici ili funkcionalne starter kulture. Naime, pojedina istraživanja upućuju na sličnost antibiotičkog rezistoma dojenčeta i pokretnih genetičkih elementa tipičnih za mikrobiom majčinog mlijeka i intestinalnu mikrobiotu majke, te se spekulira o mogućnosti prijenosa gena za rezistenciju između majke i djeteta (Pärnänen i sur., 2018). Stoga je karakterizacija prisutnosti antibiotičke rezistencije osim s aspekta provjere sigurnosti potencijalnih probiotičkih sojeva važna i s aspekta karakterizacije mogućih načina prijenosa antibiotičkih determinanti te i na taj način predstavlja doprinos sprječavanju antibiotičke rezistencije.



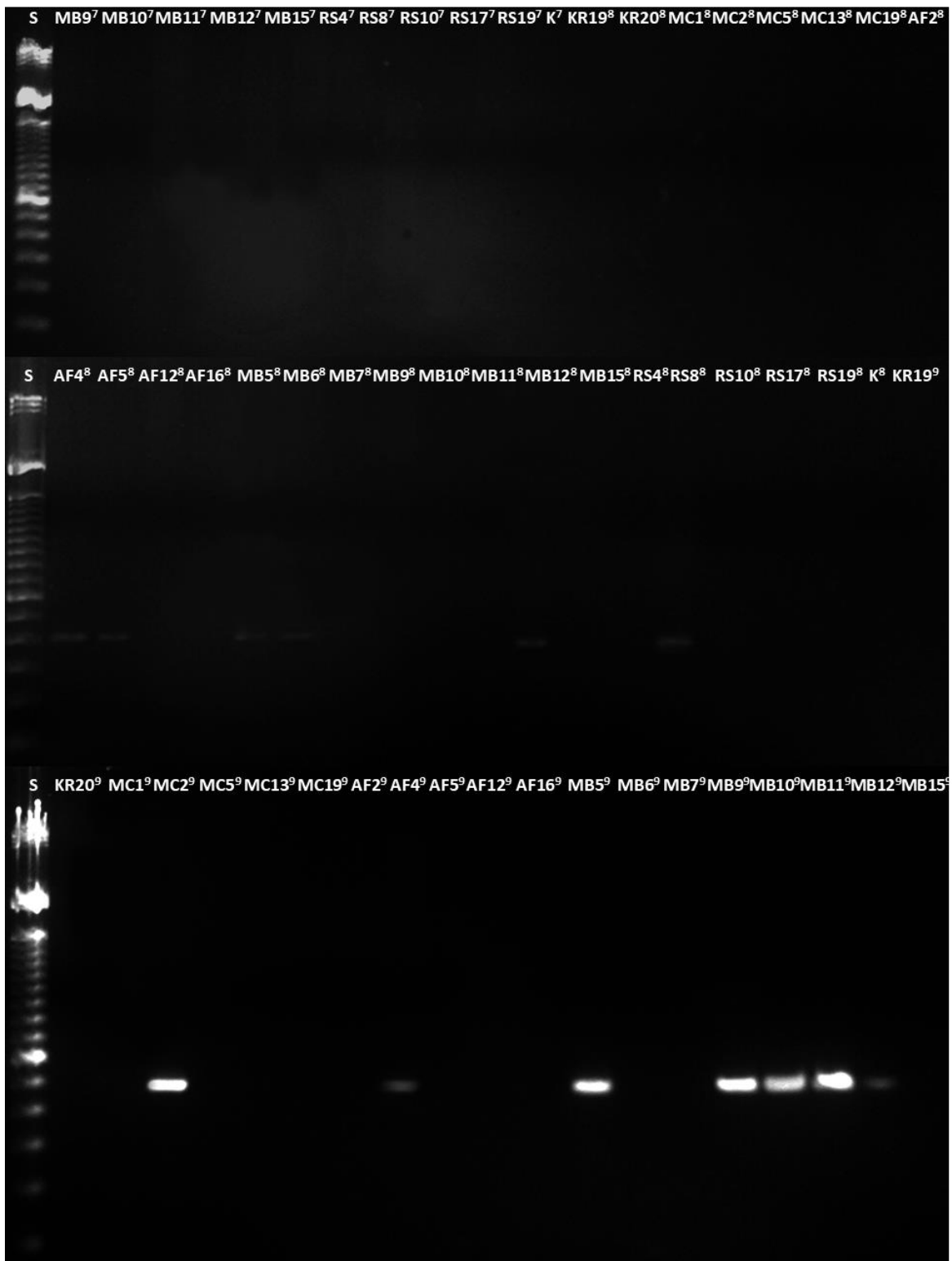
**Slika 3.** DNA elektroforeza produkata PCR (amplikona) reakcije sa specifičnim početnicama za gene koji kodiraju za rezistencije na klindamicin (1), eritromicin (2) i kanamicin (3).



**Slika 4.** DNA elektroforeza produkata PCR (amplikona) reakcije sa specifičnim početnicama za gene odgovorne za rezistenciju na kanamicin (3), vankomicin (4) i tetraciklin (5)



**Slika 5.** DNA elektroforeza produkata PCR reakcije sa specifičnim početnicama za gene rezistencije za tetraciklin (5), kloramfenikol (6) i streptomycin (7)



**Slika 6.** DNA elektroforeza produkata PCR reakcije sa specifičnim početnicama za gene rezistencije za streptomycin (7), ampicilin (8) i gentamicin (9).



**Slika 7.** DNA elektroforeza produkata PCR reakcije sa specifičnim početnicama za gene rezistencije za gentamicin (9)

## 5. Zaključci

1. Većina komesalnih sojeva iz majčinog mlijeka je osjetljiva na ispitivane antibiotike, što je potvrđeno i PCR metodom jer nije ustanovljena prisutnost amplikona koji bi upućivali na prisutnost genetičkih determinanti rezistencije na antibiotike.
2. Kod svih sojeva iz roda *Staphylococcus epidermis* AF4, AF5, MB6, MB12 i RS8 te kod *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani* MB5, uočena je specifična DNA vrpca veličine 297 pb koja ukazuje na prisutnost *bla* gena koji kodira za enzim  $\beta$ -laktamazu.

## 6. Literatura

Abriouel, H., Lerma, L. L., Casado Muñoz, M., Montoro, B. P., Kabisch, J., Pichner, R., Cho, G. S., Neve, H., Fusco, V., Franz, C. M., Gálvez, A., Benomar, N. (2015) The controversial nature of the *Weissella* genus: technological and functional aspects versus whole genome analysis-based pathogenic potential for their application in food and health. *Front. Microbiol.* **6**:1197.

Aquilanti, L., Garofalo, C., Osimani, A., Silvestri, G., Vignaroli, C., Clementi, F. (2007) Isolation and molecular characterization of antibiotic-resistant lactic acid bacteria from poultry and swine meat products. *J. Food. Prot.* **70**:557–65.

Broaders, E., Gahan, C. G., Marchesi, J. R. (2013) Mobile genetic elements of the human gastrointestinal tract: potential for spread of antibiotic resistance genes. *Gut Microbes*, **4**:271–80.

Bujnakova, D., Strakova, E., Kmet, V. (2014) *In vitro* evaluation of the safety and probiotic properties of Lactobacilli isolated from chicken and calves. *Anaerobe*, **29**:118–127.

Cattoir V. (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance, (Ferretti, J. J., Stevens, D. L., Fischetti, V. A., ured.). University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City.

Coeuret, V., Gueguen, M., Vernoux, J. (2004) *In vitro* screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *J. Dairy Res.* **71(4)**:451-460.

Comunian R., Daga E., Dupre I., Paba A., Devirgiliis C., Piccioni V., Perozzi, G., Zonenschain, D., Rebecchi, A., Morelli, L., De Lorentiis, A., Giraffa, G. (2010) Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.* **138**:151–156.

Comunian, R., Daga, E., Dupré, I., Paba, A., Devirgiliis, C., Piccioni, V., Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., Hols, P. (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**:159–84.

D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N., Wright, G.D. (2011) Antibiotic resistance is ancient. *Nature* **31**:477, 457-461.



Dinu, V., Lu, Y., Weston, N., Lithgo, R., Coupe, H., Channell, G., Adams, G. G., Gómez, A. T., Sabater, C., Mackie, A., Parmenter, C., Fisk, I., Phillips-Jones, M. K., Harding, S. E. (2020) The antibiotic vancomycin induces complexation and aggregation of gastrointestinal and submaxillary mucins. *Sci. Rep.* **10**:960.

Delaš I., Kaćunko T., Beganović J., Delaš F. (2005) Sastav masnih kiselina majčinog mlijeka i pripravaka dječje hrane. *Mljekarstvo* 55 (2) 101-112.

Feld, L., Schjorring, S., Hammer, K., Licht, T. R., Danielsen, M., Krogfelt, K. (2008) Selective pressure affects transfer and establishment of a *Lactobacillus plantarum* resistance plasmid in the gastrointestinal environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61(4)**:845–852.

Fraqueza, M. J. (2015) Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dry-fermented Sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **212**:76-88.

Gavin, A., Ostovar, K. (1977) Microbiological characterization of human milk. *J. Food Prot.* **40**:614–616.

Gueimonde, M., Sánchez, B., De los Reyes-Gavilán, C., Margolles, A. (2013) Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front. Microbiol.* **4**:202.

Hummel, A. S., Hertel, C., Holzappel, W. H., Franz, C. M. (2007) Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:730–39.

Jacobsen, L., Wilcks, A., Hammer, K., Huys, G., Gevers, D., Andersen, S. R. (2007) Horizontal transfer of tet(M) and erm(B) resistance plasmids from food strains of *Lactobacillus plantarum* to *Enterococcus faecalis* JH2-2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. *FEMS Microbiology Ecology* **59(1)**:158–166.

Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C., Meile, L. (2006) Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**:145-55.

Kateete, D. P., Kimani, C. N., Katabazi, F. A., Okeng, A., Okee, M. S., Nanteza, A., Joloba, M. L., Najjuka, F. C. (2010) Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **9**:23.

Kuper, K. M., Boles, D. M., Mohr, J. F., Wanger, A. (2009) Antimicrobial susceptibility testing: a primer for clinicians. *Pharmacotherapy.* **29(11)**:1326-43.

Lackey, K.A.; Williams, J.E.; Meehan, C.L.; Zachek, J.A.; Benda, E.D.; Price, W.J.; Foster, J.A.; Sellen, D.W.; Kamau-Mbuthia, E.W.; Kamundia, E.W. What's normal? microbiomes in human milk and infant feces are related to each other but vary geographically: The INSPIRE study. *Front. Nutr.* 2019, 6, 45.

Licht, T. R., & Wilcks, A. (2005) Conjugative gene transfer in the gastrointestinal environment. *Advances in Applied Microbiology* **58**:77–95.

Liu, C., Zhang, Z. Y., Dong, K., Yuan, J. P., Guo, X. K. (2009) Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomed. Environ. Sci.* **22**:401–12.

Lyons, K.E., Ryan, C.A., Dempsey, E.M., Ross, R.P., Stanton, C. (2020) Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients* **12(4)**:1039

Martín, R.; Jiménez, E.; Heilig, H.; Fernández, L.; Marín, M.L.; Zoetendal, E.G.; Rodríguez, J.M. Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75, 965–969.

Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arboleña Montes, S., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodríguez, J. M., Bode, L., de Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., Ventura, M. (2017) The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews* **81(4)**.

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum* **4(2)**.

Neely, M., Kato, L., Youn, G., Kraler, L., Bayard, D.S., Guilder, M.V., Schumitzky, A., Yamada, W.M., Jones, B.E., Minejima, E. (2018) Prospective Trial on the Use of Trough Concentration versus Area under the Curve To Determine Therapeutic Vancomycin Dosing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**:2.

Ouoba, L. I., Lei, V., Jensen, L. B. (2008) Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **121**:217–24.

Pärnänen, K., Karkman, A., Hultman, J. *et al.* Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistome and mobile genetic elements. *Nat Commun* **9**, 3891 (2018).

Pannaraj, P. S., Li, F., Cerini, C., Bender, J. M., Yang, S., Rollie, A., Adisetiyo, H., Zabih, S., Lincez, P. J., Bittinger, K., Bailey, A., Bushman, F. D., Sleasman, J. W., Aldrovandi, G. M. (2017) Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. *JAMA pediatrics* **171(7)**:647–654.

Rojo-Bezares, B., Saenz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. (2006) Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *Int. J. Food Microbiol.* **111**:234–40.

Šušković J., Brkić B., Matošić S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47(1)**:57-73.

Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001) Role of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in Synbiotic Effect. *Food Technology and Biotechnology* **39**:227-235.

Šušković J., B. Kos, Beganović J., A. Leboš Pavunc, K. Habjanič, S. Matošić, Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria, *Food Technology and Biotechnology* 48 (3) 296-307 (2010).WHO, 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. Geneva, Switzerland. ISBN 978 92 4 156474 8.

Wyszyńska, A., Kobierecka, P., Bardowski, J., & Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2015) Lactic acid bacteria – 20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Applied microbiology and biotechnology* **99(7)**:2967–2977.

Zarrilli, R., Tripodi, M. F., Di Popolo, A., Fortunato, R., Bagattini, M., Crispino, M., Florio, A., Triassi, M., Uti, R. (2005) Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. *J. Antimicrob. Chemother* **56(5)**:827-35.

## **Izjava o izvornosti**

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Ime i prezime studenta