

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET



MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA HUMANIH
IZOLATA LAKTOBACILA REZISTENTNIH
NA ANTIBIOTIKE

JELENA BEGOVIĆ

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 2008

PA 20153

01611101
17380

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET



MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA HUMANIH
IZOLATA LAKTOBACILA REZISTENTNIH
NA ANTIBIOTIKE

JELENA BEGOVIĆ

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 2008

MENTORI: dr Ljubiša Topisirović, redovni profesor
Biološki fakultet, Beograd

dr Ivana Strahinić, viši naučni saradnik
Institut za molekularnu genetiku i
genetičko inženjerstvo, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE: dr Ljubiša Topisirović, redovni profesor
Biološki fakultet, Beograd

dr Ivana Strahinić, viši naučni saradnik
Institut za molekularnu genetiku i
genetičko inženjerstvo, Beograd

dr Đorđe Fira, docent
Biološki fakultet, Beograd

dr Milan Kojić, naučni savetnik
Institut za molekularnu genetiku i
genetičko inženjerstvo, Beograd

DATUM ODBRANE:

DATUM PROMOCIJE:

DOKTORAT NAUKA:

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Prof. dr Ljubiši Topisiroviću na ukazanom poverenju, strpljenju i velikoj slobodi u toku mog rada, podršci u mnogobrojnim idejama i lutanjima kao i brojnim korisnim diskusijama koje su doprinele efikasnoj izradi ove teze;

dr Geert Huys-u iz Laboratorije za mikrobiologiju (Faculty of Sciences, Ghent University, Gent, Belgium), za veliku pomoć i sugestije u tumačenju dobijenih rezultata, kao i za povezivanje sa dr Mayo Baltasar-om (Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Asturias, Spain) kome se zahvaljujem što je doprineo finalizaciji ove teze;

dr Ivani Strahinić za pomoć i za izuzetno korisne sugestije tokom pisanja ove teze kao i kritičku ocenu rada;

dr Milanu Kojiću za pomoć i mnogobrojne savete tokom eksperimentalne izrade ovog rada;

dr Đorđu Firi za kritičku ocenu rada;

dr Nataši Golić za pomoć tokom izrade ovog rada;

dr Vesni Cvetković koja je obezbedila humane bakterijske izolate korišćene u ovoj tezi;

Branku za razumevanje svih mojih nerazumnih ideja i teorija, i za smeh koji je bio neophodan da se ovaj posao uspešno završi.

Jelki za unošenje reda u naš sistem, za iskrenost i opet naravno smeh i prijateljsku atmosferu koja vlada u ovoj laboratoriji.

Amareli, Kaći, Maji, Milici pre svega na razumevanju, razgovorima i svakom lepom trenutku provedenom u ovoj laboratoriji.

APSTRAKT

Humani vaginalni izolati izolovani su iz 39 žena poreklom iz Srbije. Analizom profila traka dobijenih pomoću (GTG)₅-PCR-a ovi izolati identifikovani su kao *Lactobacillus rhamnosus* (n=17), *Lactobacillus fermentum* (n=11) i *Lactobacillus plantarum* (n=11). Među izolovanim sojevima, 19 pokazuje antimikrobnu aktivnost kada se kao indikator koristi soj *Salmonella enteritidis*, dok svi deluju antimikrobno kada se kao indikator sojevi koriste *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NS1 i *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. Takođe za 11 izolata pokazano je da sintetiše H₂O₂. Rezultati određivanja minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) za šest antibiotika (ampicilin, eritromicin, tetraciklin, streptomycin, gentamicin i vankomicin) otkrili su različite stepene fenotipske rezistencije među sojevima. Takođe, rezultati ovih testiranja pokazuju zavisnost od medijuma koji su korišćeni za testiranje (MRS i LSM). Međutim, u sojevima rezistentnim na eritromicin i tetraciklin PCR-om nije utvrđeno prisustvo *ermA*, *ermB*, *ermC*, *tetK* i *tetL* gena kao ni *tet* gena iz familije proteina za protekciju ribozoma (RPP). Dalja istraživanja obuhvatila su PCR-RFLP analizu i sekvenciranje gena za 23S rRNK poreklom iz pet *Lb. rhamnosus* sojeva koji su pokazivali visok stepen rezistencije na eritromicin ($\geq 256 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Za sojeve BGHV1', BGHV20, BGHV29, BGHV389, i BGHV719 pokazano je prisustvo tranzicione A→G mutacije na poziciji 2058 u okviru V petlje 23S rDNA. Stepem heterozigotnosti mutacije među ovim sojevima se razlikovao. Na osnovu rezultata "Southern blot" hibridizacije soj *Lb. rhamnosus* BGHV719 poseduje najmanje šest kopija gena za 23S rRNK. Promenom sastava MRS medijuma kao i dodavanjem različitih šećera u modifikovani MRS medijum dolazi do značajnih promena nekih osobina *Lb. rhamnosus* sojeva. Prvo, promene u MRS medijumu utiču na hidrofobnost površine ćelija sojeva *Lb. rhamnosus* BGHV719 i *Lb. rhamnosus* BGHV954 kao i na rezultate testiranja rezistencije na eritromicin i gentamicin.. Drugo, u soju BGHV719 dolazi i do promena u obliku ćelija, u formiranju agregata kao i u sastavu proteina ćelijskog zida. Na kraju, promenom sastava MRS medijuma kao i dodavanjem različitih šećera u modifikovani MRS medijum, dolazi i do promene u mukoidnosti kolonija proizvođača egzopolisaharida- soja *Lb. rhamnosus* BGHV954.

Ključne reči: vaginalni laktobacili, (GTG)₅-PCR, MIK, antibiotska rezistencija, mutacija A2058, površinske osobine

ABSTRACT

Human vaginal isolates were isolated from 39 Serbian women. According to analysis of (GTG)₅-PCR fingerprints, the isolates were found to belong to *Lactobacillus rhamnosus* (n=17), *Lactobacillus fermentum* (n=11) and *Lactobacillus plantarum* (n=11). Among these isolates, 19 showed antimicrobial activity against *Salmonella enteritidis*, while all human vaginal isolates inhibited growth of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NS1 and *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. Among human vaginal isolates, 11 were found to produce H₂O₂. MIC results obtained for six antibiotics (ampicillin, erythromycin, tetracycline, streptomycin, gentamicin and vancomycin) revealed different levels of phenotypic resistance among strains. In addition, the results of susceptibility testing differed when two media, MRS and LSM were used. Erythromycin-resistant and tetracycline-resistant isolates were screened for the presence of *ermA*, *ermB*, *ermC*, *tetK* and *tetL* genes and *tet* genes of the ribosomal protection (RP) family, but no positive signal was obtained in PCR reactions with respective primers. Subsequent research was focused on PCR-RFLP and sequencing analysis of 23S rRNA gene from five highly erythromycin resistant (≥ 256 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *Lb. rhamnosus* strains. In strains BGHV1', BGHV20, BGHV29, BGHV389 and BGHV719 the presence of A→G transition mutation at the position 2058 in 23S rRNA gene was detected. Among the strains, different levels of mutation heterozygosity were encountered. Results of Southern blot hybridization revealed the presence of at least six 23S rRNA gene copies for *Lb. rhamnosus* BGHV719. The changes in MRS composition as well as the addition of different sugars to modified MRS significantly influence some features of *Lb. rhamnosus* strains. First, these changes reduce hydrophobicity of *Lb. rhamnosus* BGHV719 and *Lb. rhamnosus* BGHV954 and also influence their survival rate in the presence of erythromycin and gentamycin. In addition, for strain BGHV719, changes in cell shape, aggregate formation as well as differences in cell wall protein composition were observed. Additionally, MRS composition and sugar source in modified MRS induce changes in colony mucoidity of exopolysaccharide producer strain *Lb. rhamnosus* BGHV954.

Key words: vaginal lactobacilli, (GTG)₅-PCR, MIC, antibiotic resistance, A2058 mutation, cell surface properties.



SADRŽAJ

I UVOD	1
1.1 BAKTERIJE MLEČNE KISELINE IZ RODA <i>Lactobacillus</i>	1
1.1.1. Opšte karakteristike	1
1.1.2 Identifikacija vrsta iz roda <i>Lactobacillus</i>	4
1.1.3. Uloga i primena laktobacila u zaštiti urogenitalnog trakta	5
1.1.4. Laktobacili kao potencijalni humani patogeni	7
1.1.5. Humani laktobacili kao probiotici	7
1.2. ANTIBIOTICI	8
1.2.1 Definicija	8
1.2.2. Klasifikacija antibiotika	9
1.2.3. Rezistencija bakterija na delovanje antibakterijskih agenasa	11
1.2.4. Mehanizmi bakterijske rezistencije na antibiotike	12
1.2.5. β -laktamski antibiotici – delovanje i mehanizmi bakterijskih rezistencija	15
1.2.6. Glikopeptidi - delovanje i mehanizmi bakterijskih rezistencija	15
1.2.7. Makrolidi - delovanje i mehanizmi bakterijskih rezistencija	17
1.2.7.1. Ribozomi prokariota	17
1.2.7.2. 23S rRNK	19
1.2.7.3. Eritromicin - delovanje i mehanizmi bakterijskih rezistencija	21
1.2.8. Aminoglikozidi - delovanje i mehanizmi bakterijskih rezistencija	24
1.2.9. Tetraciklin - delovanje i mehanizmi bakterijskih rezistencija	25
1.3 METODE I PROBLEMI STANDARDIZACIJE TESTIRANJA OSETLJIVOSTI BAKTERIJA NA ANTIBIOTIKE	27
1.4. HORIZONTALNI TRANSFER ANTIBIOTSKE REZISTENCIJE	28
1.5. POVRŠINSKE OSOBINE LAKTOBACILA	30

II CILJ RADA	33
III MATERIJAL I METODE	34
3.1. BAKTERIJSKI SOJEVI	34
3.2. MEDIJUMI ZA RAST I KULTIVACIJU BAKTERIJA	36
3.3. ODREĐIVANJE BROJA KOLONIJA (CFU- „ <u>C</u> OLONY <u>F</u> ORMING <u>U</u> NITS”)	37
3.4. METODE IZOLACIJE DNK	38
3.4.1. Izolacija ukupne DNK iz bakterija	38
3.5. METODE RADA SA BAKTERIJAMA	39
3.5.1. Biohemijske reakcije	39
3.5.1.1. Određivanje pH vrednosti prekonoćne culture	39
3.5.1.2. Detekcija produkcije vodonik peroksida (H ₂ O ₂) u bakterijama	39
3.5.2. Bojenje bakterija	40
3.5.2.1. Bojenje po Gramu	40
3.6. ENZIMSKE REAKCIJE SA DNK	41
3.6.1. Sečenje DNK restrikcionim enzimima	41
3.6.2. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom („ <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction“)	41
3.6.3. Metoda umnožavanja repetitivnih sekvenci-(REP PCR)	43
3.6.4. PCR-RFLP („ <u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism”) analiza	43
3.7. ELEKTROFOREZA DNK	44
3.7.1. Elektroforeza totalne DNK i PCR-om umnoženih fragmenata	44
3.8. ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE (MIK) ANTIBIOTIKA	44
3.8.1. Test makrodilucije	44
3.8.2. Test mikrodilucije	45
3.8.3. E-test	46
3.9. DNK/DNK HIBRIDIZACIJA („Southern Blot”)	46
3.9.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane	46
3.9.2. Obeležavanje probe sa dioksigenin-dUTP-om	47
3.9.3. Neradiokativna DNK/DNK hibridizacija	48

3.10. PREŽIVLJAVANJE SOJA BGHV719 U RAZLIČITIM MRS MEDIJUMIMA	49
3.11. METODE RADA SA PROTEINIMA	49
3.11.1. Izolacija proteina ćelijskog zida tretiranjem sa LiCl	49
3.11.2. Elektroforeza proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)	50
3.12. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST BAKTERIJA	51
3.12.1. Detekcija antimikrobne aktivnosti difuzionim metodom u bunarčićima	51
3.13. TEST ADHEZIJE BAKTERIJA ZA HEKSADEKAN (MATH)	52
3.14. PROIZVODNJA EGZOPOLISAHARIDA (EPS)	53
3.15. SEKVENCIRANJE 23S rDNK	53
IV REZULTATI	54
4.1. IDENTIFIKACIJA HUMANIH VAGINALNIH IZOLATA	54
4.1.1. Izolacija i identifikacija humanih vaginalnih izolata	54
4.1.2. Molekularna determinacija bakterija do nivoa vrste	54
4.2. ANTIMIKROBNO DEJSTVO BGHV IZOLATA	56
4.2.1. Antimikrobno dejstvo BGHV izolata na indikator sojeve	56
4.2.2. Proizvodnja vodonik peroksida (H ₂ O ₂)	58
4.3. MINIMALNA INHIBITORNA KONCENTRACIJA (MIK) ANTIBIOTIKA	59
4.3.1. Test makrodilucije	59
4.3.2. Test mikrodilucije	61
4.3.3. E-test	63
4.3.4. Uticaj različitih šećera na stepen rezistencije izolata <i>Lb. rhamnosus</i> BGHV719	64
4.4. MOLEKULARNA OSNOVA REZISTENCIJE BGHV IZOLATA	66
4.4.1. Detekcija gena odgovornih za rezistenciju na eritromicin i tetraciklin PCR metodom	66
4.4.2. Određivanje broja rRNK operona u <i>Lb. rhamnosus</i> BGHV719	67
4.4.3. Tranziciona mutacija A2058→G2058	69
4.4.4. Sekvenciranje R amplikona iz gena za 23S rRNK	71
4.5. UTICAJ RAZLIČITIH ŠEĆERA NA POVRŠINSKE OSOBINE IZOLATA <i>Lb. rhamnosus</i> BGHV 719	73

4.5.1. Utvrđivanje broja živih ćelija i pH vrednosti kultura humanog vaginalnog izolata <i>Lb. rhamnosus</i> BGHV 719 gajenog u različitim medijumima	73
4.5.2. Kriva rasta humanog vaginalnog izolata <i>Lb. rhamnosus</i> BGHV719 u različitim medijumima za rast	74
4.5.3. Morfologija bakterijskih ćelija soja <i>Lb. rhamnosus</i> BGHV719	76
4.5.4. Hidrofobnost površine ćelija <i>Lb. rhamnosus</i> BGHV719	78
4.5.5. Proteini ćelijskog zida <i>Lb. rhamnosus</i> BGHV719	79
4.5.6. Mukoidnost kolonija i njen uticaj na različite ćelijske osobine soja <i>Lb. rhamnosus</i> BGHV954	81
IV DISKUSIJA	83
V ZAKLJUČCI	100
VI LITERATURA	102



I UVOD

1.1. BAKTERIJE MLEČNE KISELINE IZ RODA *Lactobacillus*

1.1.1. Opšte karakteristike

Laktobacili predstavljaju Gram-pozitivne, nesporogene, katalaza-negativne mikroaerofilne mlečno kiselinske bakterije koje kao krajnji produkt metabolizma šećera daju mlečnu kiselinu (Axelsson, 1998). Ovaj rod danas obuhvata preko 100 različitih vrsta koje se na osnovu fermentacionog metabolizma mogu podeliti u tri grupe:

- i. Obligatni homofermentativni laktobacili (*Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lb. salivarius*, *Lb. mali*, *Lb. ruminis*, *Lb. aviarins*);
- ii. Fakultativni heterofermentativni laktobacili (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. paracasei*, *Lb. pentosus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. sake*);
- iii. Obligatni heterofermentativni laktobacili (*Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*, *Lb. buchneri*, *Lb. hilgardii*).

Diverzitet vrsta u okviru ovog roda je izuzetno veliki što se može zaključiti na osnovu filogenetske analize njihovih 16S rRNK nukleotidnih sekvenci (Slika 1). Do danas je objavljeno 10 genomskih sekvenci laktobacila i najmanje još 11 projekata sekvenciranja kompletnog genoma laktobacila je u toku (Claesson *et al.*, 2007).

Kao i većina bakterija mlečne kiseline (BMK) laktobacili su auktotrofi za različiti broj aminokiselina zbog čega njihovo preživljavanje i rast zavise od prisustva složenog proteolitičkog sistema. Ovaj sistem finalno obezbeđuje neophodne peptide i aminokiseline za njihov rast. Pojedini predstavnici ovog roda (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) koriste se kao glavne komponente starter kultura u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda (jogurta i sireva), a takođe se mogu naći u sirovom mleku i zrelim sirevima kao deo nestarterskih kultura gde mogu uticati na formiranje i razvoj arome i teksture finalnog fermentisanog proizvoda (Fitzsimons *et al.*, 1999). Pored navedenih proizvoda laktobacili se koriste i u proizvodnji fermentisanog povrća (kiseli kupus), pića (pivo, vino, sokovi), kao i tokom fermentacije kiselih testa i nekih mesnih proizvoda (kobasice) i silaže (Stiles, 1996).

Predstavnici ovog roda sačinjavaju deo normalne gastrointestinalne flore kod ljudi (*Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus*, *Lb. gasseri*) i potencijalno imaju povoljan, probiotički efekat na zdravlje ljudi i drugih sisara (Ouweland *et al.*, 2002). Međutim, za neke sojeve je utvrđeno da kod starijih osoba i ljudi sa oslabljenim imunitetom mogu izazivati oportunističke infekcije (Adams, 1999). Laktobacili kao što su *Lb. rhamnosus*, *Lb. fermentum* i *Lb. plantarum* takođe predstavljaju konstituente normalne urogenitalne flore ljudi (Redondo-Lopez *et al.*, 1990). Pored toga, laktobacili (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. salivarius*) se mogu izolovati i sa biljaka koje takođe predstavljaju prirodno stanište ovih bakterija (Mundt and Hammer, 1968).

1.1.2. Identifikacija vrsta iz roda *Lactobacillus*

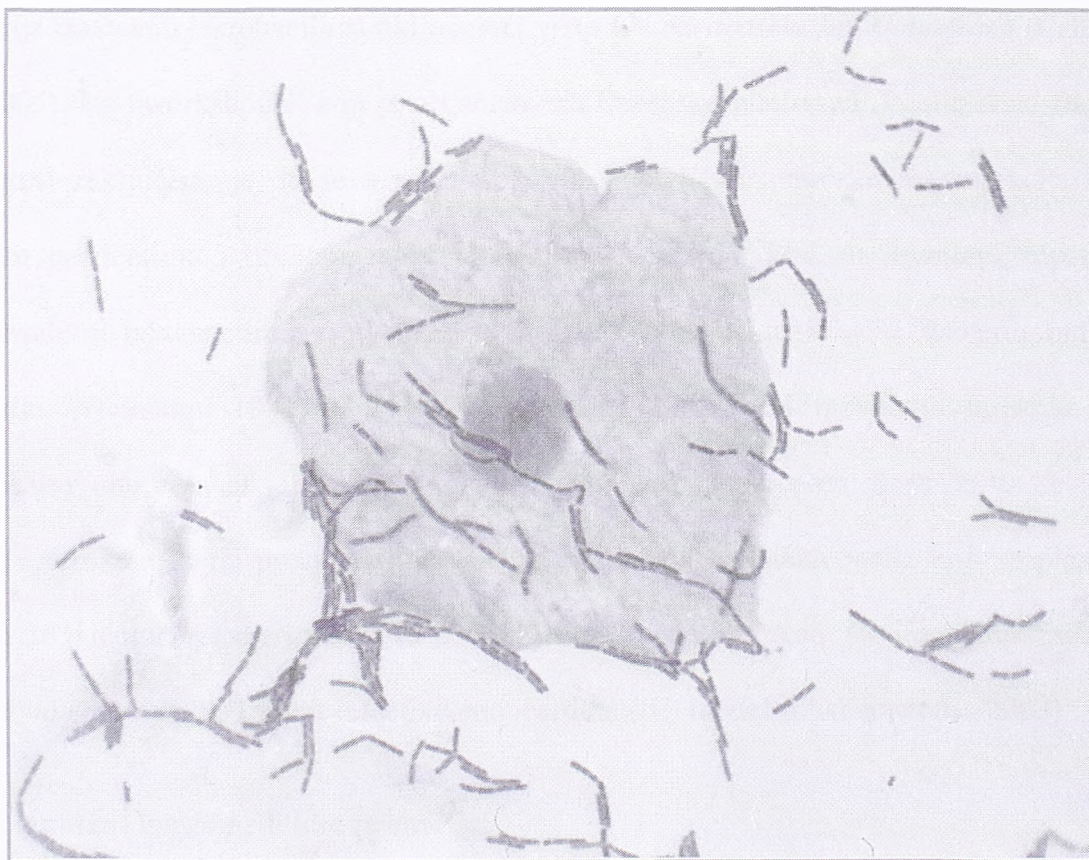
Do sada je objavljen veliki broj različitih tehnika za identifikaciju laktobacila (Bouton *et al.*, 2002; Boyd *et al.*, 2005). Na osnovu prethodnih studija uključujući i rezultate projekta EU-PROSAFE pokazano je da veliki broj klasičnih taksonomskih metoda, kao što je na primer API50 CH sistem, koje se rutinski koriste za identifikaciju BMK, nisu dovoljno precizne i informativne te zahtevaju dodatne analize (Vankerckhoven *et al.*, 2008). Danas, ove metode mogu da se koriste kao smernice u procesu identifikacije laktobacila, ali samo u kombinaciji sa molekularnim metodama uz pomoć kojih se određeni izolat može identifikovati do nivoa vrste. Biohemijski sistemi za identifikaciju nisu dovoljno precizni usled velike fenotipske raznolikosti u okviru same vrste ali često i zbog nedostatka dobrih baza podataka koje predstavljaju izvor informacija o vrstama. Molekularne tehnike kao što su Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE) i Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) „fingerprinting” metode, iako korisne u identifikaciji i poređenju različitih sojeva BMK, ne mogu se same koristiti za identifikaciju ovih bakterija do nivoa vrste. Čak ni u kombinaciji sa biohemijskim metodama ove tehnike ne omogućavaju dovoljno preciznu identifikaciju laktobacila (Vankerckhoven *et al.*, 2008). DNK „fingerprinting”, metoda koja se bazira na umnožavanju repetitivnih sekvenci u bakterijskom genomu - rep-PCR (Versalovic *et al.*, 1994) predstavlja metodu koja daje dovoljno precizne i nedvosmislene rezultate u identifikaciji laktobacila pod uslovom da se koristi baza podataka sa proverenim referentnim sojevima (Gevers *et al.*, 2001). Naravno, kao najpreciznija metoda za identifikaciju bakterijskih vrsta smatra se sekvenciranje gena za 16S rRNK iako ponekad ni na osnovu rezultata dobijenih ovom metodom nije moguće razlikovati srodne vrste laktobacila. Sekvenciranje celokupnog genoma bakterije predstavlja najpotpuniji način identifikacije, ali

pored ekonomskog faktora, još uvek zahteva razvoj softvera koji mogu da podrže analizu velike količine podataka koji se na ovaj način dobijaju.

1.1.3. Uloga i primena laktobacila u zaštiti urogenitalnog trakta

Vaginalni ekosistem zdrave žene naseljava bogata mikroflora koja se sastoji od Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija koje učestvuju u zaštiti genitalnog trakta od bakterijskih infekcija i bolesti prenosivih seksualnim putem (Boris *et al.*, 1998). U ovom okruženju predstavnici roda *Lactobacillus* čine dominantnu mikrofloru, pre svega vrste *Lb. acidophilus* kompleksa (*Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus*, *Lb. jonsonii*, *Lb. gasseri*) (Lachlak *et al.*, 1996), ali i druge vrste koje su izolovane kao na primer *Lb. fermentum*, *Lb. rhamnous*, *Lb. brevis* i *Lb. plantarum* (Redondo-Lopez *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1999). Vagina predstavlja dinamičan ekosistem koji prolazi različite promene u strukturi i sastavu pod uticajem godina, menstrualnog ciklusa, trudnoće, infekcija, kontraceptivne zaštite kao i seksualnih odnosa (Zhou *et al.*, 2004). Pretpostavlja se da laktobacili svoju zaštitnu ulogu u sprečavanju rasta patogenih mikroorganizama obezbeđuju različitim mehanizmima. U tom smislu najbitnija uloga laktobacila ogleda se u sposobnosti formiranja biofilma na vaginalnom epitelu (Slika 2) i kompetitivnoj ekskluziji tj. sprečavanju vezivanja patogena za receptore prisutne na površini vaginalnog epitela (Velraeds *et al.*, 1996; Zarate *et al.*, 2007). Drugo, neki laktobacili koagregiraju sa uropatogenim bakterijama i na taj način imaju potencijal da uklone ove bakterije iz urogenitalnog sistema (Redondo-Lopez *et al.*, 1990). Kontinualnom proizvodnjom mlečne kiseline i održavanjem niskog pH (između 4-5) kao i sintezom antimikrobijalnih supstanci kao što su vodonik peroksid (H_2O_2) i bakteriocini laktobacili sprečavaju razvoj patogenih sojeva uzročnika bakterijske vaginoze (BV) kao što

su *Escherichia coli* i *Gardnerella vaginalis* (Gupta *et al.*, 1988; Hawes *et al.*, 1996; Hillier, 1998). Epidemiološke studije kao i *in vitro* eksperimenti pokazali su da poremećaj u mikrobijanoj flori i infekcije genitalnog trakta značajno povećavaju rizik od HIV infekcije (Martin *et al.*, 1999). Zahvaljujući svim navedenim svojstvima laktobacili su počeli komercijalno da se primenjuju u terapijske svrhe u lečenju poremećaja urogenitalnog trakta (Reid and Bruce, 2003). Nedavno je pokazano da odabrani laktobacili mogu imati važnu terapijsku ulogu kod infekcija urogenitalnog trakta žena kada se administriraju kako intravaginalno tako i oralno (Morelli *et al.*, 2004).



Slika 2. *Lactobacillus acidophilus* na ćelijama vaginalnog skvamoznog epitela (Zarate *et al.*, 2007).

1.1.4. Laktobacili kao potencijalni humani patogeni

Imajući u vidu dugu istoriju upotrebe BMK u ljudskoj ishrani, pre svega u proizvodnji fermentisanih prehrambenih proizvoda, kao i činjenicu da sačinjavaju normalnu mikrofloru ljudskog organizama, predstavnici roda *Lactobacillus* smatraju se nepatogenim bakterijama (Pigeon *et al.*, 2002). Međutim, kada je prvi put opisan slučaj peritonitisa izazvan infekcijom laktobacilima (Schlefeir *et al.*, 1989) ovaj rod je povezan sa različitim patološkim stanjima uključujući karijes, infektivni endokarditis i reumatsku vaskularnu bolest (Rao *et al.*, 1990; Gasser, 1994; Byin *et al.*, 2004). Do 2005 godine u literaturi je opisano preko 200 slučajeva infekcija izazvanih laktobacilima uključujući vrste *Lb. paracasei* i *Lb. rhamnosus* (Cannon *et al.*, 2005). Na „workshopu” koji je organizovala Evropska platforma (Lactic Acid Bacterial Platform) zaključeno je da se u svim do sada prijavljenim slučajevima infekcija radi o starijim pacijentima i osobama sa oslabljenim imunitetom koji su inficirani sopstvenim komensalnim laktobacilima (Organizing Committee of the Lactic acid Bacteria Industrial Platform Workshop, 1994). Zato se smatra, da je rizik od razvijanja infekcije usled spoljašnjeg unošenja laktobacila hranom izuzetno mali. Ipak, predloženo je da se u cilju zaštite potrošača izvrši procena sigurnosti za svaki novi soj laktobacila koji se plasira na tržište uključujući eksperimente sa životinjskim modelima kao što je zečiji model za infektivni endokarditis (rabbit infective endocarditis (IE) model) (Ashara *et al.*, 2003)

1.1.5. Humani laktobacili kao probiotici

Probiotici su definisani kao živi mikroorganizmi koji po unošenju u organizam u adekvatnoj dozi pozitivno utiču na zdravlje domaćina (Reid *et al.*, 2003; Havenar and Huis in't Veld, 1992). Jedan od osnovnih zahteva kada je reč o probioticima jeste da je dati



mikroorganizam humanog porekla. Bakterije iz roda *Lactobacillus* su predloženi kao probiotski mikroorganizmi koji su u stanju da restauriraju ekološki ekvilibrijum gastrointestinalnog, respiratornog i urogenitalnog trakta (Hammes *et al.*, 1995; Falagas *et al.*, 2006). Pokazano je da probiotski laktobacili mogu da inhibiraju *in vitro* rast vaginalnih patogena kao što je *Candida* sp. (Rönqvist *et al.*, 2007). Zato, postoji sve veće interesovanje za upotrebu humanih laktobacila kao probiotika u cilju obnavljanja i održavanja normalne vaginalne flore i prevencije nastanka ili povratka različitih infekcija izazvanih patogenim mikroorganizmima. Iako je broj kliničkih dokaza o pozitivnom uticaju probiotika u porastu, još uvek na komercijalnom frontu ima nedovoljno preparata baziranih na laktobacilima (Reid and Bruce, 2003). U nekim zemljama, na primer u Austriji i Australiji, na tržište su već pušteni probiotski laktobacili (*Lb. rhamnosus* GR-1 i *Lb. fermentum* RC-14) koji se koriste u lečenju infekcija urinarnog trakta. Za navedene sojeve je takođe pokazano da dovode do smanjenja broja koliformnih bakterija i gljivica u vagini kao i da kod bakterijskih vaginoza restauriraju normalnu vaginalnu floru u 81% slučajeva u poređenju sa 50% kod placebo grupe žena (Reid *et al.*, 2001).

1.2. ANTIBIOTICI

1.2.1 Definicija

Antibiotici se definišu kao hemijske supstance koje proizvode mikroorganizmi i koje utiču na funkcije, strukture ili procese od suštinskog značaja za rast bakterija (bakteriostatici) ili preživljavanje (baktericidno dejstvo), a da pri tome ne oštećuju eukariotskog domaćina koji nosi date bakterije (Mascaretti, 2003). Antibiotici se sintetišu kao krajnji produkti sekundarnog metabolizma aktinomiceta, gljiva i bakterija. Termin antibiotici takođe obuhvata

i polusintetske varijante prirodnih antibiotika. Ovaj termin se razlikuje od termina „antibakterijski agensi” koji su iako hemijski srodni prirodnim antibioticima, u potpunosti sintetisani od strane čoveka - tzv. sintetski antibakterijski agensi (sulfonamidi, trimetoprim, kvinoloni).

1.2.2. Klasifikacija antibiotika

Antibiotici se mogu klasifikovati na više načina. Najčešće se njihova podela vrši na osnovu mehanizma delovanja i to na one koji:

- i. inhibiraju sintezu ćelijskog zida bakterija (penicilin, vankomicin);
- ii. deluju na membranu bakterija (polimiksin, polien);
- iii. interferiraju sa bakterijskim enzimskim sistemom (sulfametoksazol);
- iv. inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina u bakterijama (rifampicin, hlorokin);
- v. inhibiraju sintezu proteina u bakterijama (tetraciklin, hloramfenikol).

Klasifikacija antibiotika na osnovu njihove hemijske strukture, kao i na osnovu mehanizma njihovog delovanja i vrste mikroorganizama na koje deluju sumirana je u okviru Tabele 1.

Tabela 1. Klasifikacija antibiotika

klasa (hemijska struktura)	mehanizam delovanja	primer
β -laktamski antibiotici penicilini cephalosporini karbapenemi	inhibicija sinteze ćelijskog zida bakterije	penicilini penicilin G amoksicilin ampicilin cefalosporini cefoksitin
makrolidi	inhibicija proteinske sinteze u bakterijama	eritromicin azitromicin claritromcin
tetraciklini	inhibicija proteinske sinteze u bakterijama	tetraciklin minociklin doksiciklin
fluorokinoloni	inhibicija sinteze DNK bakterija	norfloksacin ciprofloksacin
sulfonamidi	blokiranje bakterijskog metabolizma putem inhibicije enzima	kotrimoksazol trimetoprim
aminoglikozidi	inhibicija proteinske sinteze u bakterijama	gentamicin streptomycin
imidazoli	inhibicija sinteze DNK bakterija	metrinidazol
ciklični peptidi	inhibicija sinteze ćelijskog zida bakterije	bacitracin kolistin
linkozamidi	inhibicija proteinske sinteze u bakterijama	klindamicin lincomicin
ansamicini	inhibicija proteinske sinteze u bakterijama	rifampicin
hloramfenikol	inhibicija proteinske sinteze u bakterijama	hloramfenikol
glikopeptidi	inhibicija sinteze ćelijskog zida bakterije	vankomicin teikoplanin

<http://dermnetnz.org/treatments/antibiotics.html>

1.2.3. Rezistencija bakterija na delovanje antibakterijskih agenasa

Uvođenje antibiotika u lečenje bolesti izazvanih bakterijskim infekcijama verovatno predstavlja jedan od najvećih uspeha moderne medicine. Međutim, nakon više od pedeset godina upotrebe, mnogi antimikrobni agensi više nisu efikasni kao nekada. Zahvaljujući sposobnosti brze adaptacije i kratkom vremenu generacije bakterije su tokom vremena razvile evolutivne adaptacije koje im omogućavaju da na različite načine prežive efekte antibiotika.

Iako je do sada objavljen veliki broj definicija, bakterijska rezistencija na antibakterijski agens može se definisati kao kvantitativna mera efikasnosti (koncentracija antibiotika izražena u mikrogramima po mililitru ili kao zona inhibicije rasta mikroorganizma izražena u milimetrima) antibakterijskog agenasa koji se koristi protiv specifične bakterije (Mascaretti, 2003). Metode koje se koriste za *in vitro* merenje antibakterijske aktivnosti baziraju se na testiranju povećavanja koncentracija antibakterijskog agenasa koji deluje na bakterijsku ćeliju u cilju otkrivanja koncentracije koja inhibira rast bakterije. Takva koncentracija naziva se minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) za dati antibiotik. Ona predstavlja relativnu meru najmanje količine antibakterijskog agenasa potrebnog za inhibiciju rasta (ćelijske deobe) bakterije.

Na osnovu podataka Centra za kontrolu bolesti iz 2006. godine (Center for Disease Control, CDC, Atlanta, USA) u Sjedinjenim Američkim Državama:

- i. godišnje, od bolničkih bakterijskih infekcija oboli blizu 2 miliona pacijenata;
- ii. tokom poslednjih godina, od ovog broja blizu 90 000 pacijenata godišnje umre kao rezultat posledica infekcije (u odnosu na 13 300 pacijenata u 1992. godini);



- iii. više od 70% bakterija koje izazivaju bolničke infekcije rezistentno je najmanje na jedan antibiotik koji se najčešće koristi u lečenju bakterijskih infekcija.

Izvor: The Problem of Antimicrobial Resistance. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Division of Microbiology and infectious Diseases.

(www.niaid.nih.gov/dmid/antimicrob)

1.2.4. Mehanizmi bakterijske rezistencije na antibiotike

Iako je antibiotska rezistencija postojala i pre početka upotrebe antibiotika od strane čoveka, povećanje broja, diverziteta i opsega bakterijske rezistencije postao je veliki klinički problem (Tenover, 2006). Bakterije koje naseljavaju ljudski organizam predstavljaju heterogene populacije koje se nalaze u konstantnoj deobi i rastu. Tretiranje pacijenta sa antibiotikom predstavlja snažan selektivni pritisak kako za ciljani bakterijski patogen tako i za ukupnu mikrofloru čovekovog organizma. U tom slučaju, relativno mali procenat bakterija rezistentnih na dati antibiotik opstaje dok osetljive bakterije polako bivaju uklonjene. Ovaj proces predstavlja selekciju tako što dejstvo antibiotika vrši selektivni pritisak u korist rezistentnih bakterija (Mascaretti, 2003). Mehanizmi bakterijske rezistencije odnose se na molekularne mehanizme koji omogućavaju bakteriji da preživi neželjene efekte antibiotika. Tokom evolucije bakterije su razvile izuzetno efikasne mehanizme rezistencije na antibiotike (Slika 3) koji se mogu grupisati na sledeći način:

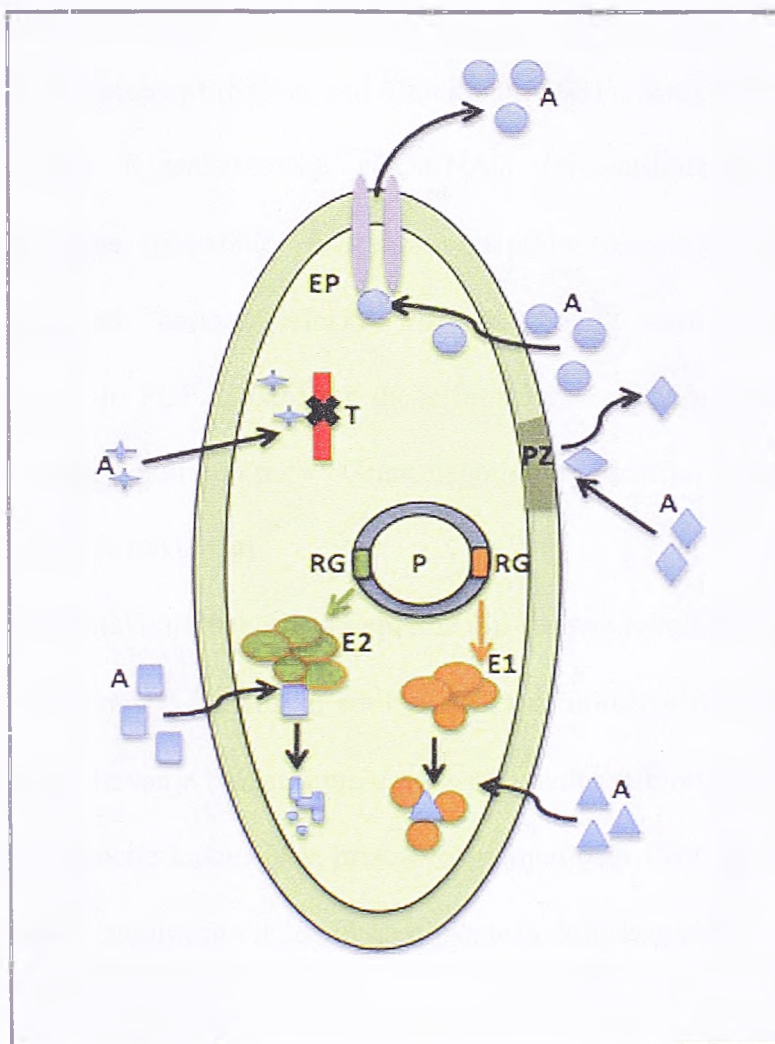
- i. mehanizam smanjene akumulacije antibiotika – gde dolazi do fizičkog izbacivanja antibiotika iz bakterijske citoplazme uz pomoć proteina vezanih za bakterijsku membranu (efluks pumpe). Efluks pumpe postoje kao pojedinačni proteini ili kao grupe proteina (Paulsen *et al.*, 1993; Nikaido, 1996). Ove pumpe mogu se podeliti u dve glavne grupe i to na one koje kao izvor energije koriste ATP, (na primer LMR protein u

laktobacilima) (van Veen *et al.*, 1999) i na one koje koriste „proton motive force” - elektrohemijsku razliku potencijala u slučaju Tet proteina (Levy, 1992). Postoje takođe i višekomponentni sistemi kao što je MexAB/OmpM proteinski kompleks u *Pseudomonas* sp. (Li *et al.*, 1995) koji obuhvata integralni membranski protein, porin spoljašnje membrane i citoplazmatski fuzioni protein koji ih povezuje. S druge strane, smanjena količina antibiotika u citoplazmi može biti i rezultat smanjene permeabilnosti membrane za taj antibiotik (Cohen *et al.*, 1988).

ii. mehanizam enzimske inaktivacije antibiotika modifikacijom njegove strukture – u ovom slučaju rezistentne bakterije poseduju nepromenjeno mesto za delovanje antibiotika kao i senzitivni ishodni bakterijski soj, a rezistenciju ostvaruju zahvaljujući prisustvu enzima koji inaktivira ili modifikuje dati antibiotik (Hawkey, 1998). Na primer, β -laktamaze predstavljaju grupu enzima koji katalizuju hidrolizu β -laktamskog prstena u okviru β -laktamskih antibiotika što dovodi do njihove inaktivacije (Mascaretti, 2003). Glavni mehanizam inaktivacije aminoglikozida uključuje veliki broj različitih enzima koji se mogu podeliti u tri grupe: aminoglikozid acetiltransferaze koji prenose acetil grupu sa acetil koenzima A, aminoglikozid fosforilaminotransferaze koje prebacuju fosforil grupu sa ATP-a kao i aminoglikozid nukleotidiltransferaze koje prebacuju nukleotid sa nukleotid trifosfata na antibiotik i na taj način ga modifikuju.

iii. mehanizam promene mesta delovanje antibiotika – ovaj mehanizam se odnosi na promenu primarnog mesta delovanja antibiotika. To znači da antibiotik i pored ulaska u bakterijsku ćeliju i dolaska do mesta svog delovanja, ne prepoznaje mesto za vezivanje tako da bakterija ostaje neosetljiva na njega. Ovaj mehanizam uključuje različite metilaze (erm metilaze) koje mono ili di- metiluju N⁶ amino grupu adenina u 23S rRNA smanjujući afinitet vezivanja antibiotika za ribosome (Weisblum, 1995), tačkaste mutacije u 23S rRNK koje su

na primer, uzrok rezistencije *Helicobacter pylori* na klaritomicin (Versalovic *et al.*, 1996), mutacije u okviru DNK giraze koje obezbeđuju rezistenciju na 4-kvinolin kod *E. coli* (Oram and Fisher, 1991) i druge.



Slika 3. Grafički prikaz nekih od mehanizama rezistencije bakterija na antibiotike (A). Na slici su prikazani sledeći mehanizmi: izbacivanje antibiotika putem efluks pumpe (EP), promena mesta delovanja antibiotika (T), mehanizam enzimske inaktivacije antibiotika putem modifikacije njegove strukture (E1) ili degradacije (E2) zahvaljujući prisustvu gena za rezistenciju (RG) na plazmidu (P) i sprečavanje ulaska antibiotika u bakterijsku ćeliju usled promene ćelijskog zida (PZ).

1.2.5. β -laktamski antibiotici - delovanje i mehanizmi bakterijskih rezistencija

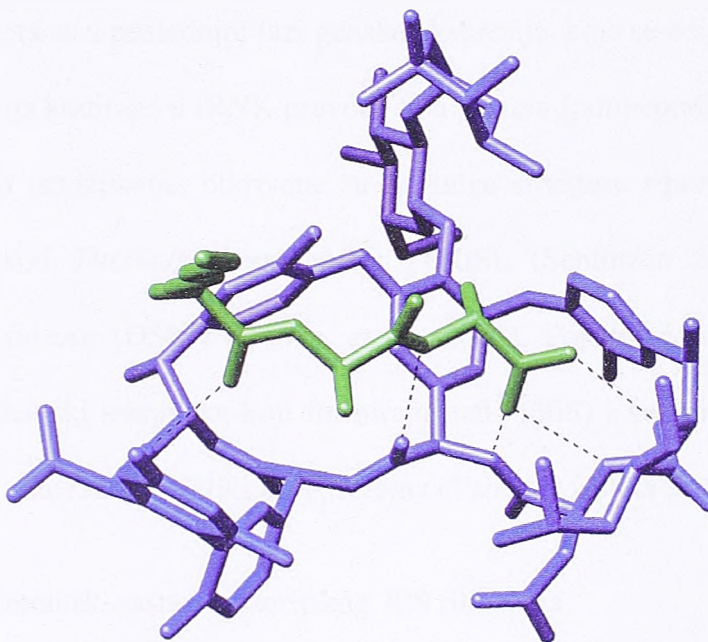
Svi β -laktamski antibiotici uključujući i ampicilin, su baktericidni antibiotici koji deluju kao ireverzibilni inhibitori PBP (penicilin binding protein) enzima koji katalizuju umrežavanje peptidoglikana u finalnoj fazi biosinteze ćelijskog zida (D-alanil-D-alanin karboksipeptidaze/transpeptidaze) (Salton and Shockman, 1981). Strukturna sličnost između β -laktamskih antibiotika i prekursorske NAM/NAG (N-acetilmuraminska kiselina/N-acetilglukozamin) peptidne subjedinice nascentnog peptidoglikanskog sloja (u okviru D-alanil-D-alanin terminalnih aminokisleinskih ostataka) ovim antibioticima omogućava vezivanje za aktivno mesto PBP. S ozbirom da je biosinteza peptidoglikana esencijalna za preživljavanje kako Gram-pozitivnih tako i Gram-negativnih bakterija, zaustavljanje njegove sinteze ima fatalan ishod za bakteriju.

β -laktamaze predstavljaju bakterijske enzime čiji su geni lokalizovani na hromozomu ili plazmidu koje inaktiviraju β -laktamske antibiotike kroz hidrolizu β -laktamskog prstena i tako omogućavaju preživljavanje bakterijama u prisustvu ovih antibiotika (Mascaretti, 2003). Drugi mehanizam rezistencije bakterija je prisustvo promenjenih PBP, za koje se β -laktami ne mogu efikasno vezati i samim tim delovati na biosintezu ćelijskog zida.

1.2.6. Glikopeptidi - delovanje i mehanizmi bakterijskih rezistencija

Vankomicin predstavlja prirodni antibiotik koji spada u grupu glikopeptida koji se koristi u lečenju teških infekcija izazvanih Gram-pozitivnim bakterijama. Vezivanje ovog molekula za prekursore peptidoglikana (NAM/NAG) sprečava ključne enzimske reakcije u procesu nastanka bakterijskog zida Gram-pozitivnih bakterija i dovodi do lize ćelija. Ovaj antibiotik se preko pet vodoničnih veza reverzibilno vezuje za terminalni dipeptidni segment

NAM/NAG, D-alanil-D-alanin (Slika 4), koji se nalazi u peptidoglikanskim monomerima izložen na spoljašnjoj površini citoplazmatske membrane bakterije i kao takav nikada ne ulazi u citoplazmu (Nagarajan, 1991).



Slika 4. Prikaz prekursora ćelijskog zida bakterije, peptid - L-lizil-D-alanil-D-alanine (zelena boja) koji je vezan za vankomicin (plava boja) preko pet vodoničnih veza (isprekidane linije), (Knox and Pratt, 1990).

Vrste roda *Leuconostoc*, *Pediococcus* kao i većina predstavnika roda *Lactobacillus*, sa izuzetkom *Lb. acidophilus* poseduje unutrašnju rezistentnost na vankomicin (Swenson *et al.*, 1990; Hamilton-Muller i Shah, 1998). Mehanizam rezistencije bakterija na vankomicin bazira se na prisustvu *van* gena čiji krajnji proizvodi dovode do promene terminalnih aminokiselinskih ostataka D-alanil-D-alanin u različite varijante ovog peptida - kao na primer, D-alanil-D-laktat i D-alanil-D-serin. Na ovaj način vankomicin se vezuje za dipeptid preko četiri vodonične veze što dovodi do smanjenja afiniteta ovog antibiotika za oko 1000 puta (Arthur *et al.*, 1996).

1.2.7. Makrolidi - delovanje i mehanizmi bakterijskih rezistencija

1.2.7.1 Ribozomi prokariota

Kod prokariota se u poslednjoj fazi genske ekspresije, koja se odigrava u ribozomima, genomska informacija kodirana u iRNK prevodi se u protein (polipeptid). Nakon više od dve decenije intenzivnih istraživanja, otkrivene su kristalne strukture ribozomalnih subjedinica visoke rezolucije kod *Thermus thermophilus* (T30S), (Schlützen *et al.*, 2000) i kod *Deinococcus radiodurans*, (D50S) (Harms, *et al.*, 2001). Pojedinačan bakterijski ribozom predstavlja ribonukleinski kompleks koji formiraju mala (30S) i velika (50S) subjedinica u čiji sastav ulaze tri vrste rRNK i veliki broj proteina (Tabela 2 i Slika 5).

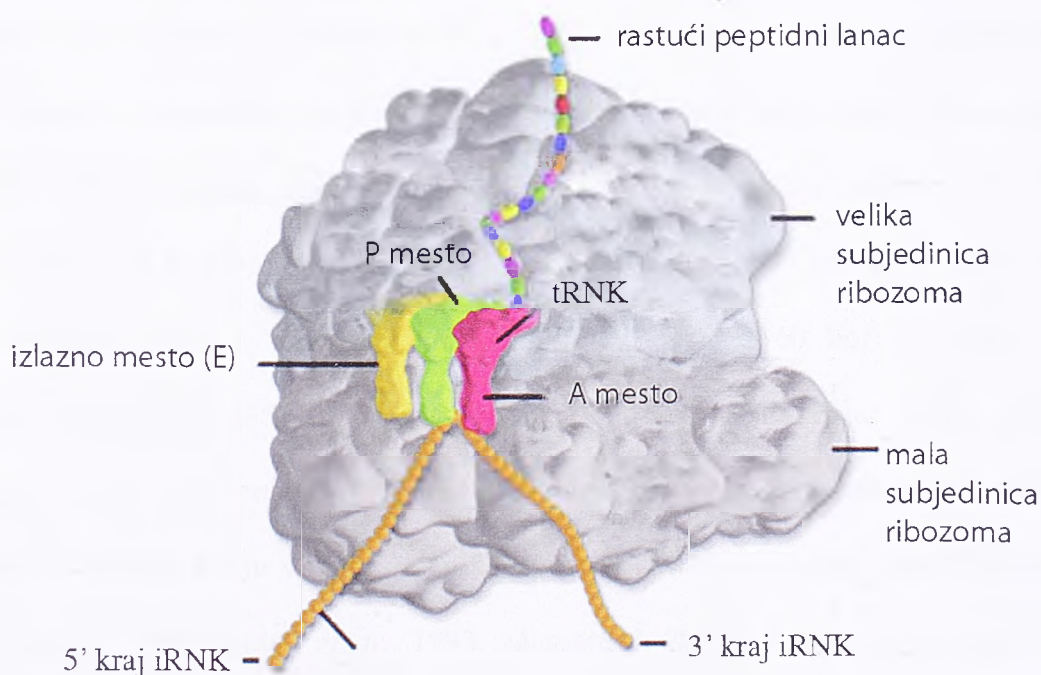
Tabela 2. Nukleoproteinski sastav bakterijskog 70S ribozoma

ribozom	70S	
subjedinica	mala	velika
veličina subjedinice	30S	50S
rRNK	16S rRNK	5S rRNK, 23S rRNK
broj ribozomalnih proteina	22	34

S- sedimentaciona konstanta

Biosinteza proteina odigrava se kooperativnim delovanjem dve ribozomalne subjedinice i nekoliko neribozomalnih faktora. Dok se odvija proces elongacije mala subjedinica obezbeđuje centar za dekodiranje iRNK i kontroliše tačnost prevođenja kroz uspostavljanje preciznih kodon-antikodon interakcija. S druge strane, u okviru velike subjedinice nalazi se katalitičko mesto - peptidil-transferazni centar (PTC) u čijoj blizini je lociran i izlazni tunel za proteine (Yonath, 2005). U ovoj subjedinici katalizuje se formiranje

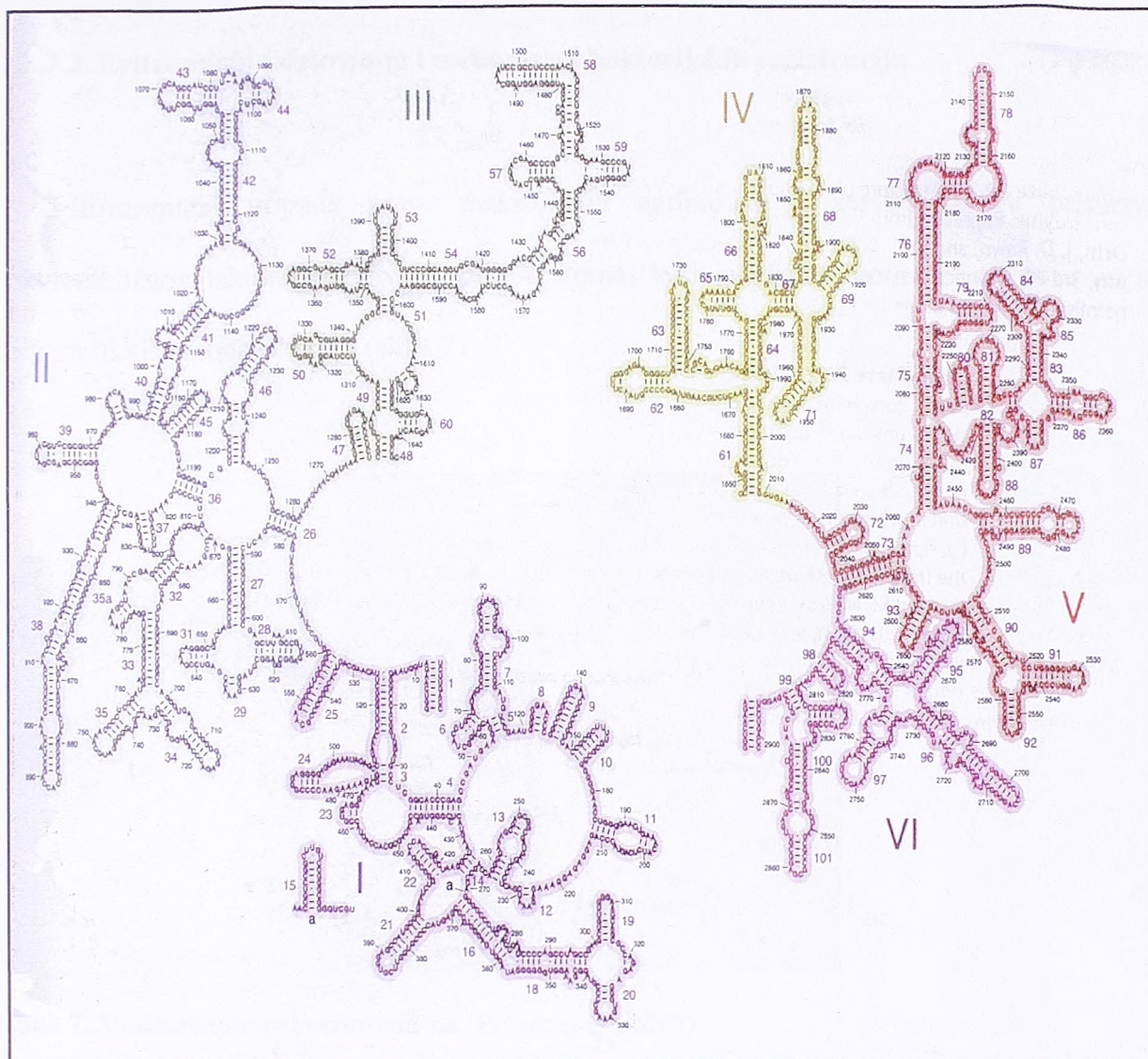
peptidne veze i elongacija nascentnog polipeptida, koji dalje prolazi kroz izlazni kanal ribozoma (Yonath, 2005). U okviru ribozoma nalaze se tri mesta za vezivanje tRNK, A- (aminoacil), P- (peptidil) i E- („exit“) mesto. Molekul tRNK interaguje sa komponentama obe subjedinice. Ciklus elongacije uključuje dekodiranje, formiranje peptidne veze, odvajanje tRNK od rastućeg polipeptidnog lanca i napredovanje iRNK sa A- na P- i na kraju na E- mesto odakle polipeptid napušta ribozom kroz izlazni tunel. Predloženo je da tunel predstavlja normalan izlazni put nascentnih proteina. Iako su zidovi tunela sastavljeni uglavnom od rRNK, u njegov sastav ulaze i proteini. Na primer, najuži deo tunela formiraju uglavnom ribozomalni proteini L22 i L4 (Harms *et al.*, 2001).



Slika 5. Slika sinteze polipeptidnog lanca i 70S ribozom u kompleksu sa iRNK, (<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/ribosomes/ribosomes.html>).

1.2.7.2. 23S rRNK

Ribozomalne RNK predstavljaju centralnu strukturnu i funkcionalnu komponentu ribozoma - organele koja omogućava proces sinteze proteina u svim organizmima. Bakterijski geni za 16S, 23S i 5S rRNK najčešće su organizovani kao jedan operon i predstavljaju najkonzerviranije gene u bakterijskoj ćeliji. rRNK predstavljaju takođe i mesta delovanja velikog broja antibiotika, kao na primer eritromicina, hloramfenikola i streptomicina (Versalovic *et al.*, 1996). Broj kopija gena za 23S rRNK po bakterijskom genomu varira od jedne (*Mycoplasma pneumoniae* M129) pa sve do 14 (*Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052). Uzimajući u obzir centralnu ulogu koju rRNK imaju u regulaciji sinteze proteina pretpostavlja se da broj rRNK operona (uključujući gene za 23S rRNK) diktira brzinu kojom bakterije sintetišu proteine i odgovaraju na promene koje se dešavaju u njihovom okruženju (Klappenbach *et al.*, 2000). Pored razlika u broju 23S rRNK operona i veličina 23S rRNK molekula varira kako u okviru roda *Lactobacillus* tako i u okviru iste vrste (*Lb. delbrueckii bulgaricus* ATCC 1842 (2845 bp) i ATCC BAA 365 (2560 bp) pa čak i u okviru jednog soja (*Lb. salivarius* UCC118, (2780 bp i 2960 bp)). U okviru 50S ribozomalne subjedinice 23S rRNK formira peptidiltransferazni centar i na taj način obezbeđuje peptidil transferaznu aktivnost ribozoma (Schulze and Nierhaus, 1982). U bakterijama 23S rRNK imaju veoma sličnu sekundarnu strukturu i obuhvataju šest domena (Slika 6) (Larsen, 1992; Gutell *et al.*, 1993; Mascaretti, 2003). Nukleotidne interakcije u okviru i između ovih domena definišu tercijarnu strukturu molekula koja je takođe filogenetski konzervirana (Larsen, 1992). Iako među bakterijama postoji divergencija u primarnoj strukturi, regioni sa nesparenim nukleotidima u modelu sekundarne strukture, kao što je peptidiltransferazna petlja, evolutivno su konzervirani (Gutell *et al.*, 1993).

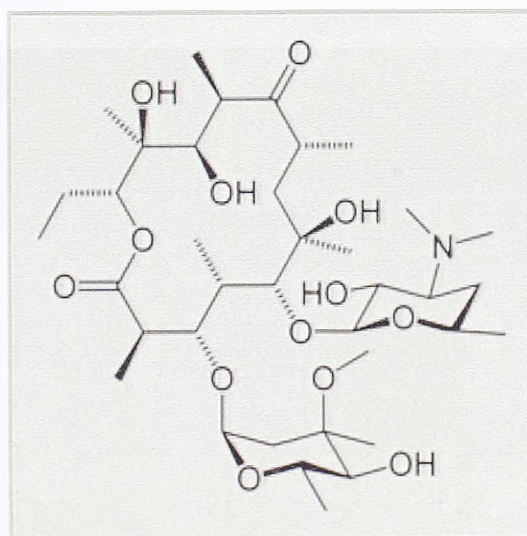


Slika 6. Šematski dijagram sekundarne strukture 23S rRNK (Mascaretti, 2003). Rimski brojevi označavaju domene, a arapski brojevi označavaju poziciju nukleotida u okviru molekula 23S rRNK.

Rezultati eksperimenata sa foto-afinitivnim obeležavanjem potvrdili su hipotezu da je centralna petlja V domena 23S rRNK integralni i funkcionalno izuzetno važan deo peptidil tranferaze (Steiner *et al.*, 1988). U okviru ovog regiona 23S rRNK lokalizovani su A- i P-mesto u ribozomu i zato je ovaj region strukturno izuzetno konzerviran (Steiner *et al.*, 1988).

1.2.7.3. Eritromicin - delovanje i mehanizmi bakterijskih rezistencija

Eritromicin pripada grupi makrolidnih antibiotika i karakteriše ga prisustvo makrocikličnog laktona (sastavljen od 14 atoma) koji je glikozidnom vezom povezan sa jednim ili više monosaharida (slika 7).

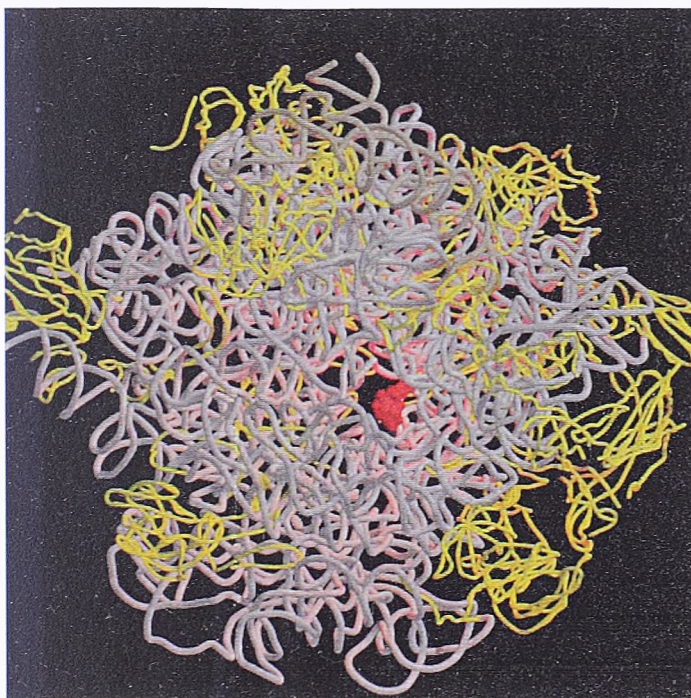


Slika 7. Strukturna formula eritromicina (Bolam *et al.*, 2007)

Ovaj antibiotik ima relativno širok spektar delovanja koji uključuje većinu Gram-pozitivnih bakterija, neke Gram-negativne bakterije, mikoplazme, hlamidije i rikecije (Mascaretti, 2003). Utvrđeno je da se eritromicinska grupa makrolida (eritromicin, klaritromicin i roksitromicin) vezuje za peptidiltransferazni centar ribozoma na samom ulazu u tunel ribozoma ali da ne blokira samu peptidil transferaznu aktivnost (Vasquez, 1975). Svoje dejstvo na sintezu proteina eritromicin ispoljava putem blokiranja tunela u velikoj subjedinici ribozoma i sprečavanjem daljeg rasta nascentnog peptida. S druge strane, on dovodi i do prevremene disocijacije peptidil-tRNK sa ribozoma tokom translokacije, jer blokira P mesto i sprečava njen prenos sa A-mesta rRNK kompleksa na P-mesto (Menninger,

1995; Schlützen *et al.*, 2001). Dodatno, pokazano je da ovaj antibiotik inhibira sastavljanje 50S ribozomalnih subjedinica što dovodi do disocijacije ribozoma u ćeliji (Champney and Tober, 1999).

Ekperimenti RNK protekcije sa dimetil sulfatom (hemijski "footprinting") pokazali su da se kod *E. coli* eritromicin direktno vezuje u okviru V domena 23S rRNK i to za nukleotidna mesta A2058 i A2059 (*E. coli* numerisanje) (Moazed and Noller, 1987) (Slika 8).



Slika 8. Grafički prikaz 50S subjedinica *D. radiodurans* sa eritromicinom (crven) vezanim za ulaz u tunel. Ribozomalni proteini su prikazani žuto, 23S rRNK sivo i 5S rRNK tamno sivo (Schlünzen *et al.*, 2001).

Eritromicin sintetiše *Saccharopolyspora erythrea* koja svoje ribosome štiti od delovanja antibiotika ekspimirajući metiltransferazu, ErmE, koja specifično modifikuje nukleotid A2058 dodajući mu dve metil grupe na N6 poziciji (Skinener and Cundliffe, 1982).

Promene koje omogućavaju bakterijama da prežive inhibitorno dejstvo eritromicina su sledeće:

- i. promena mesta delovanja eritromicina;
- ii. enzimska modifikacija antibiotika;
- iii. aktivni transport antibiotika.

Različite bakterije poseduju sposobnost sinteze Erm rRNK metilaza - enzima koji imaju ulogu metilacije rRNK i povezani su sa eritromicinskom rezistencijom. Geni koji obezbeđuju rezistenciju na eritromicin - *erm* geni, od kojih su najrasprostranjeniji *ermA*, *ermB* i *ermC*, podeljeni su u najmanje 20 klasa na osnovu hibridizacionih rezultata kao i poređenja njihovih sekvenci (Weisblum, 1995). Metilacija 23S rRNK bakterija dovodi do konformacionih promena u okviru, pre svega, velike subjedinice ribozoma koje za posledicu imaju rezistenciju bakterije na makrolidne antibiotike, jer sprečava vezivanje ovih jedinjenja za ribozom (Mascaretti, 2003).

Pokazano je da mutacije u okviru 23S rRNK identifikovane kao A→G tranzicije na pozicijama A2058 i A2059 (*E. coli* numerisanje), onemogućavaju vezivanje eritromicina, obezbeđujući rezistenciju na makrolide u velikom broju kliničkih izolata uključujući *Helicobacter pylori* i *Streptococcus pneumoniae* (Versalovic *et al.*, 1996; Farrell *et al.*, 2003). U *E. coli* je takođe pokazano da vezivanje eritromicina za ribozom zavisi od ribozomalnih proteina i da ovaj antibiotik snažno inetraguje sa L22 proteinom i nešto slabije sa L2, L4 i L15 proteinom (Arévalo *et al.*, 1988). Dodatno, pokazano je da mutacije u L22 proteinu mogu dovesti do rezistencije bakterije na makrolide jer se eritromicin ne vezuje efikasno za ribozom usled promene konformacije tunela u čiji sastav pored ovog proteina, ulazi 23S rRNK (Pardo and Rosset, 1977).

Preživljavanje nekih bakterija u prisustvu eritromicina omogućeno je strukturnom promenom antibiotika delovanjem esteraza koji hidrolizuju laktonski prsten, putem fosforilacije ili glikozilacije (Weisblum, 1995). Aktivni efluks eritromicina je omogućen

prisustvom membranskih efluks proteina koji ispumpavaju makrolide kroz ćelijsku membranu (*mef* gen) (Ambrose *et al.*, 2005)

1.2.8. Aminoglikozidi - delovanje i mehanizmi bakterijskih rezistencija

Bakteriocidni efekat aminoglikozidnih antibiotika na bakterije ispoljava se u njihovom vezivanju za konzervirane regione u okviru 16S rRNK male (30S) subjedinice ribozoma u blizini A mesta). Na ovaj način gentamicin, streptomycin kao i ostali aminoglikozidi interferiraju sa procesima koji obezbeđuju tačnost procesa translacije ali mogu dovesti i do inhibicije translacije (Yoshizawa *et al.*, 1998; Carter *et al.*, 2002)

Rezistencije bakterija na delovanje aminoglikozida uključuje sledeće mehanizme

- i. inaktivaciju putem acetilacije, fosforilacije ili adenilacije samog antibiotika pomoću N-acetiltransferaza, O-fosfontransferaza i O-nukleotidiltransferaza (najčešći mehanizam);
- ii. smanjeni unos antibiotika u bakteriju;
- iii. promene u bakterijskim ribozomima koje značajno smanjuju afinitet vezivanja antibiotika za ribozom (Mascaretti, 2003).

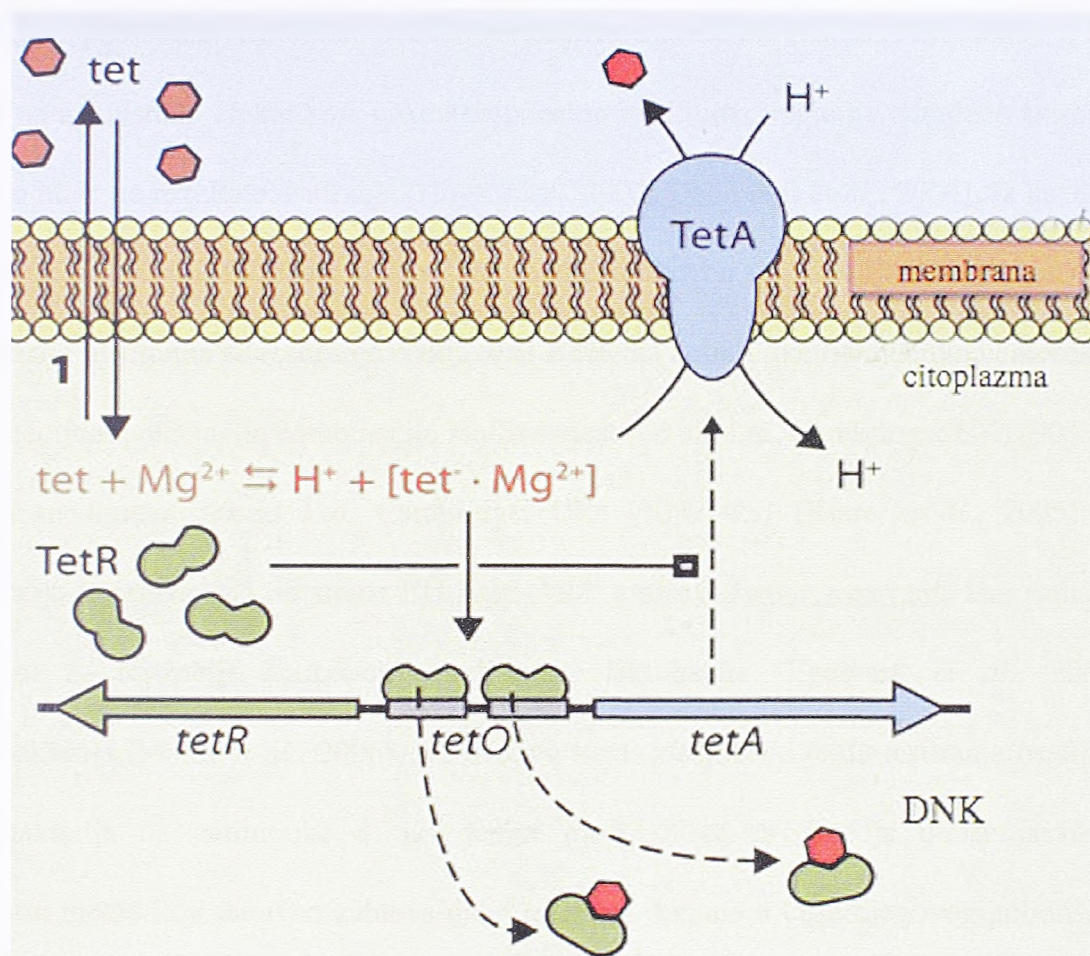
Dosadašnje studije su pokazale da su laktobacili često rezistentni na različite aminoglikozidne antibiotike (Charteris *et al.*, 1998) iako se još uvek nedovoljno zna o molekularnoj osnovi mehanizmima rezistencije (Tenorio *et al.*, 2001). Inače, aminoglikozidi se uglavnom koriste za lečenje infekcija (septicemije, komplikovane infekcije urinarnog trakta, peritonitis i bolničke respiratorne infekcije) koje su izazvane aerobnim Gram-negativnim bakterijama (*Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp.) (Gonzales and Spencer, 1998).

1.2.9. Tetraciklin - delovanje i mehanizmi bakterijskih rezistencija

Tetraciklin se najčešće vezuje za 30S subjedinicu bakterijskog ribozoma gde inhibiraju proteinsku sintezu sprečavanjem vezivanja aminoacil tRNK za A mesto. Ovaj antibiotik sprečava vezivanje RF-1 i RF-2 faktora (faktori terminacije) tokom procesa terminacije translacije (Chopra and Roberts, 2001). U literaturi je do sada opisano da tetraciklinska rezistencija kod kliničkih izolata najčešće nastaje usled horizontalnog transfera gena koji obezbeđuju rezistenciju - stečena rezistencija (Mascaretti, 2003). Mehanizmi bakterijske rezistencije na delovanje tetraciklina su sledeći:

- i. efluks antibiotika zahvaljujući prisustvu transmembranskih proteina;
- ii. zaštita ribozoma;
- iii. hemijska modifikacija antibiotika (ređi mehanizam rezistencije).

Levy je još 1992. godine otkrio da efluks predstavlja glavni mehanizam rezistencije na tetraciklin u bakterijama. Determinante koje obezbeđuju rezistenciju na tetraciklin putem njegovog uklanjanja iz citoplazme, kodiraju proteine transportere (na pr., Tet(A), Tet(P), Tet(V) proteine) koji su locirani u citoplazmatičnoj membrani (Mascaretti, 2003). Ovi proteini obezbeđuju energetsko zavistan efluks tetraciklina iz citoplazme (Sika 9). Do sada su u laktobacilima opisani Tet(O) i Tet(M) proteini koji interaguju sa ribozomom i na taj način ga štite od dejstva tetraciklina, a bakterija postaje neosetljiva na ovaj antibiotik (Mascaretti, 2003; Gevers *et al.*, 2003a). Mehanizam hemijske modifikacije tetraciklina predstavlja ređi način na koji bakterija prevazilazi problem prisustva ovog antibiotika. Ovaj mehanizam zahteva prisustvo citoplazmatskih proteina koji za svoju aktivnost zahtevaju kiseonik i NADPH (Speer *et al.*, 1991).



Slika 9. Grafički prikaz efluks pumpe za tetraciklin (Hillen and Berens, 2002).

1.3. METODE I PROBLEMI STANDARDIZACIJE TESTIRANJA OSETLJIVOSTI BAKTERIJA NA ANTIBIOTIKE

Testiranje osjetljivosti bakterija na određen antibiotik trebalo bi da se vrši standardizovanim metodama. Međutim, za BMK (osim u slučaju enterokoka) još uvek nisu do kraja definisani standardi za ovu vrstu testiranja kako od strane Clinical Laboratory Standard Institute (www.clsi.org) tako ni od strane drugih relevantnih komiteta.

S obzirom da BMK imaju posebne zahteve za rast, konvencionalni test medijumi kao što je Müller-Hinton i Iso-Sensitest medijumi nisu pogodni za testiranje osjetljivosti svih

laktobacila, pediokoka, laktokoka i bifidobakterija na antibiotike (Klare *et al.*, 2005). S druge strane, antagonistički efekat koje neke komponente medijuma imaju na određene antibiotike dodatno utiču na rezultate testiranja (Huys *et al.*, 2002; Danielsen *et al.*, 2004). Iz navedenih razloga je u okviru PROSAFE projekta (Vankerckhoven *et al.*, 2008) razvijena nova formulacija medijuma za testiranje osetljivosti BMK na antibiotike (isključujući enterokoke). LSM medijum predstavlja kombinaciju Iso-Sensitest (Oxoid Ltd, Cambridge, UK) (90%, v/v) i MRS medijuma (Oxoid Ltd, Cambridge, UK) (10% v/v) (Klare *et al.*, 2005). Ova formulacija je prihvaćena od strane EU-ACE-ART projekta (www.sceart.nrt) kao standardni medijum za testiranje antibiotske osetljivosti laktobacila (Egervarn *et al.*, 2006) i bifidobakterija (Mättö *et al.*, 2006). Na osnovu toga, zaključeno je da testiranje osetljivosti ovih bakterija na antibiotike u navedenim medijumima predstavlja dobar privremeni referentni metod koji naravno zahteva dalje tehničke dopune u cilju njegovog poboljšanja i standardizacije.

Granične vrednosti („breakpoint values”) antibiotika, tj. MIK vrednosti iznad kojih se bakterija smatra rezistentnom na dati antibiotik za ne-enterokokalne BMK još uvek nisu usaglašene. Na osnovu rezultata PROSAFE projekta predložene su epidemiološke granične vrednosti koje se mogu koristiti samo kao privremene dok se ne dobiju potpuniji podaci iz budućih studija (Klare *et al.*, 2007).

1.4. HORIZONTALNI TRANSFER ANTIBIOTSKE REZISTENCIJE

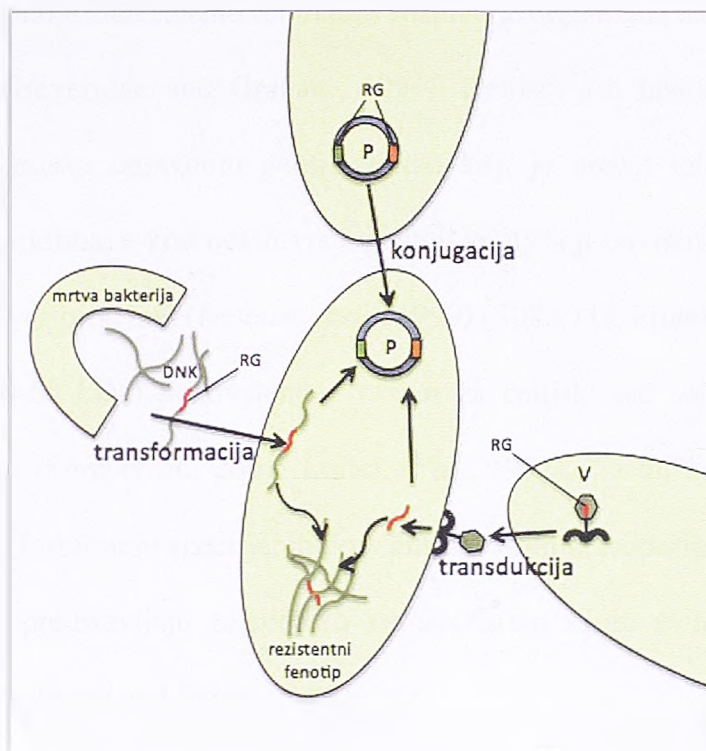
Kada se razmatra pojam antibiotske rezistencije treba razlikovati prirodnu (unutrašnju) rezistenciju i stečenu rezistenciju (Tenover, 2006). Prirodna rezistencija na antibiotik predstavlja najverovatnije neprenosivi element i prisutna je kod svih predstavnika

populacije divljeg tipa („wild type” ili WT) date taksonomske grupe. Za razliku od ovog tipa, bakterijske sojeve sa stečenom antibiotskom rezistencijom karakterišu MIK-ovi koji su značajno viši u donosu na MIK-ove dobijene u okviru WT populacija date taksonomske grupe. Stečena rezistencija može biti rezultat:

- i. mutacija ili akumulacija mutacija u okviru bakterijske DNK koja finalno dovodi do rezistencije na odgovarajući antibiotik, ili
- ii. sticanja transferabilnih gena koji obezbeđuju rezistenciju i potiču od donornog mikroorganizma. Na ovaj način stečena rezistencija se može horizontalno širiti kroz populaciju u okviru iste ali i različitih vrsta (Slika 10) (Levy, 2002).

Diseminacija antibiotske rezistencije može da redukuje terapijske efekte u slučaju lečenja infektivnih bolesti. Uzimajući u obzir da BMK mogu služiti kao rezervoari gena koji obezbeđuju rezistenciju i da potencijalno mogu da prenose ove gene horizontalnim putem (Tannock 1987; Morelli *et al.*, 1988; Ahn *et al.*, 1992; Gevers *et al.*, 2003b; Jacobsen *et al.*, 2006; Klare *et al.*, 2007) jako je važno proveriti prisustvo gena odgovornih za rezistenciju u BMK izolatima koji će se potencijalno koristiti kao probiotici ili starter kulture u proizvodnji fermentisanih proizvoda.

Još uvek je teško sa sigurnošću utvrditi da li je određena rezistencija prenosiva, pre svega zbog nedostatka standardizovanih metoda za demonstraciju transfera gena za rezistenciju u BMK.



Slika 10. Grafički prikaz horizontalnog transfera gena koji obezbeđuju rezistenciju bakterija na određeni antibiotik. Prikazani su sledeći mehanizmi: konjugacija i prenos plazmida (P) koji poseduje gene odgovorne za rezistenciju (RG) iz donorske u recipijentnu bakterijsku ćeliju; unošenje egzogene DNK u bakteriju putem transformacije; transdukcija tj. transfer RG putem infekcije virusom (V).

1.5. POVRŠINSKE OSOBINE LAKTOBACILA

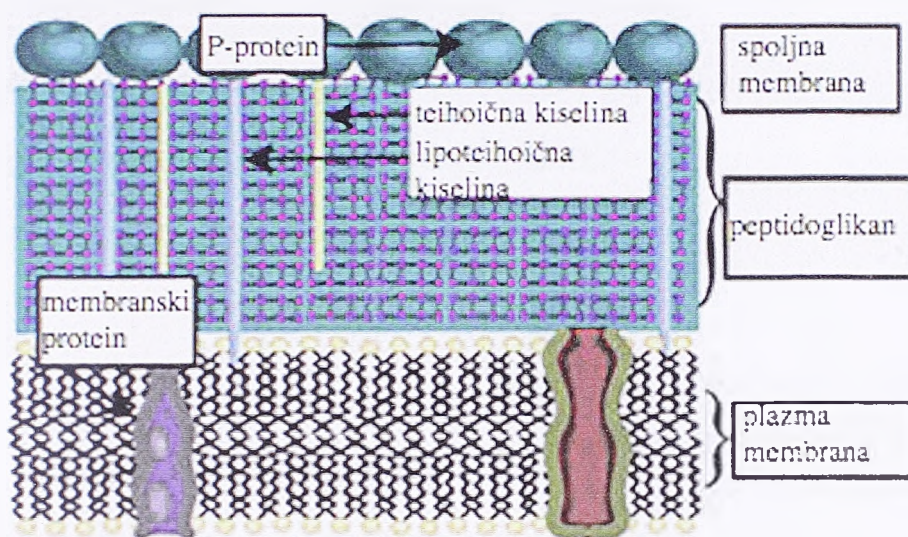
Površinske osobine bakterija u velikoj meri određuju način na koji one interaguju sa okruženjem, uključujući interakcije sa drugim mikroorganizmima i različitim domaćinima. Ove osobine imaju dalje uticaj na razmenu nutrijenata između bakterija i sredine, kao i na rezistenciju na spoljašnji stres izazvanu mehaničkim, hemijskim, toplotnim i osmotskim faktorima (Schär-Zammaretti and Ubbnik, 2003).

Ćelijski zid predstavlja važnu strukturnu komponentu prokariotskih organizama i od suštinske je važnosti za mnoge aspekte njihovog života. Posebno treba naglasiti da raznolika

struktura spoljašnjeg sloja zida snažno reflektuje adaptacije organizma na specifične ekološke i sredinske uslove (Beveridge and Graham, 1991). Ćelijski zid laktobacila sastoji se od sakulusa kojega sačinjava uglavnom peptidoglikan koji je prožet teihoičnom kiselinom, površinskim polisaharidima, a kod nekih vrsta postoji spoljašnji površinski sloj proteina tzv. proteini P-sloja (S-layer proteins) (Delcour *et al.*, 1999) (Slika 11). Proteini P-sloja uglavnom su mali proteini (40-60 kDa) nekovalentno vezani za ćelijski zid bakterija i često ga u potpunosti prekrivaju (Smit *et al.*, 2001; Lortal *et al.*, 1992). Na taj način proteini P-sloja igraju važnu ulogu u formiranju specifičnih površinskih osobina bakterije (Schär-Zammaretti and Ubbnik, 2003) i predstavljaju zajedničku karakteristiku skoro svih *Arhea* (Sleytr and Beveridge, 1999; Engelhardt and Peters, 1998).

Proteini P-sloja su do sada opisani u stotinama različitih vrsta koje pripadaju glavnim filogenetskim grupama bakterija (Sleytr and Beveridge, 1999). Ovi makromolekuli se mogu naći i kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, gde je potvrđena njihova povezanost sa različitim supramolekularnim strukturama ćelijskog zida kao što je peptidoglikanski sloj kod Gram-pozitivnih bakterija ili lipopolisaharidni sloj kod Gram-negativnih bakterija. Kod većine bakterija stepen sinteze subjedinica koje ulaze u sastav ovih proteina je striktno kontrolisan (Sara and Sleytr, 1996).

Iako nije u potpunosti poznato kako konstituenti bakterijskog zida doprinose površinskim osobinama bakterije, veza površinskih proteina, egzopolisaharida i lipoteihoičnih kiselina je nedvosmislena (Boonaert and Rouxhet, 2000; Schär-Zammaretti and Ubbnik, 2003).



Slika 11. Grafički prikaz ćelijskog zida Gram-pozitivnih bakterija.

Pokazano je da adhezija laktobacila za vaginalne epitelijalne ćelije predstavlja važan faktor u procesu kolonizacije mukoznih membrana kod ljudi. Međutim, još uvek se malo zna o mehanizmima pomoću kojih se vaginalni laktobacili u zdravim ženama vezuju za epitelijalne ćelije. Prisustvo različitih struktura na površini laktobacila (proteini P-sloja, ugljeni hidrati, teihoična kiselina) ukazuju na postojanje čitavog spektra različitih mehanizama adhezije u kojima učestvuju konstituenti zida bakterija. Autogregacija takođe povećava potencijal kolonizacije laktobacila u sredinama gde se bakterije teško zadržavaju duži vremenski period (Boris *et al.*, 1998). Fiziko-hemijske osobine površine ćelije kao što je hidrofobnost, mogu uticati na adheziju i autoagregaciju bakterija za različite površine (Wadström *et al.*, 1987). Nedavno je pokazano da površinske osobine *Lb. acidophilus* NCC2628, uključujući interakcije sa ćelijama gastrointestinalnog trakta zavise od sastava medijuma za gajenje bakterija (Schär-Zammaretti *et al.*, 2005). Inicijalna faza u procesu adhezije bakterija posredovana je kompleksom fizikohemijskih interakcija uključujući nespecifične interakcije kao što je hidrofobnost i ukupno površinsko naelektrisanje bakterija

(Pelletier *et al.*, 1997). Međutim, i dalje ostaje kao otvoreno pitanje kako strukturalna organizacija ćelijskog zida, hemijske osobine površinskih konstituenata i posebno, konformacija površinskih makromolekula determinišu fizičko hemijske osobine ćelijskog zida.



CILJ RADA

Laktobacili predstavljaju dominantnu vaginalnu floru koja ima važnu ulogu u zaštiti humanog urogenitalnog trakta od mnogobrojnih patogena. Porast bakterijske rezistencije na antibiotike predstavlja danas veliki izazov za modernu medicinu. Međutim, još uvek ne postoje standardizovane metode za identifikaciju rezistentnih BMK. Zato su definisani sledeći ciljevi ovog rada:

1. Izolacija i preliminarna identifikacija humanih vaginalnih izolata iz 39 žena poreklom iz Srbije;
2. Determinacija odabranih 39 humanih vaginalnih izolata do nivoa vrste pomoću (GTG)₅-PCR metode;
3. Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti 39 humanih vaginalnih izolata;
4. Utvrđivanje sposobnosti proizvodnje H₂O₂ 39 humanih vaginalnih izolata;
5. Određivanje MIK-ova za 39 humanih vaginalnih izolata za ampicilin, tetraciklin, eritromicin, gentamicin, streptomycin i vankomicin u MRS i LSM medijumu.
Nakon konstatovanja da u kolekciji postoje izolati rezistentni na eritromicin i tetraciklin dalji cilj istraživanja bio je:
6. Molekularna karakterizacija eritromicinske i tetraciklinske rezistencije detektovane u humanim vaginalnim izolatima;
7. Molekularna karakterizacija eritromicinske rezistencije u humanim vaginalnim izolatima *Lb. rhamnosus* BGHV1', BGHV20, BGHV29, BGHV389 i BGHV719;
8. Određivanje broja kopija gena za 23S rRNK u izolatu *Lb. rhamnosus* BGHV719;
9. Utvrđivanje uticaja šećera u modifikovanom MRS medijumu na promenu antibiotske osetljivosti humanog izolata *Lb. rhamnosus* BGHV719;
10. Izučavanje uticaja modifikovanog MRS medijuma koji sadrži različite šećere na površinske osobine kao i na sintezu proteina zida humanog vaginalnog izolata *Lb. rhamnosus* BGHV719;
11. Utvrđivanje uticaja različitih šećera u modifikovanom MRS medijumu na sintezu egzopolisaharida u humanom vaginalnom izolatu BGHV954.



III MATERIJAL I METODE

3.1. BAKTERIJSKI SOJEVI

Bakterijski sojevi korišćeni u ovom radu predstavljani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Spisak bakterijskih sojeva

Soj	Relevantne karakteristike	Starost subjekta	Izvor ili referenca
<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV1'	humani vaginalni izolat	77	Lab. kolekcija
<i>Lb. fermentum</i> BGHV2	humani vaginalni izolat	63	Lab. kolekcija
<i>Lb. fermentum</i> BGHV11	humani vaginalni izolat	48	Lab. kolekcija
<i>Lb. fermentum</i> BGHV12	humani vaginalni izolat	68	Lab. kolekcija
<i>Lb. plantarum</i> BGHV16	humani vaginalni izolat	72	Lab. kolekcija
<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV20	humani vaginalni izolat	27	Lab. kolekcija
<i>Lb. fermentum</i> BGHV252K	humani vaginalni izolat	69	Lab. kolekcija
<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV262K	humani vaginalni izolat	69	Lab. kolekcija
<i>Lb. fermentum</i> BGHV282K	humani vaginalni izolat	55	Lab. kolekcija
<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV28	humani vaginalni izolat	63	Lab. kolekcija
<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV29	humani vaginalni izolat	36	Lab. kolekcija
<i>Lb. fermentum</i> BGHV30	humani vaginalni izolat	55	Lab. kolekcija
<i>Lb. plantarum</i> BGHV32	humani vaginalni izolat	57	Lab. kolekcija
<i>Lb. plantarum</i> BGHV43	humani vaginalni izolat	75	Lab. kolekcija
<i>Lb. fermentum</i> BGHV44	humani vaginalni izolat	67	Lab. kolekcija
<i>Lb. fermentum</i> BGHV51K	humani vaginalni izolat	72	Lab. kolekcija
<i>Lb. plantarum</i> BGHV52	humani vaginalni izolat	73	Lab. kolekcija
<i>Lb. plantarum</i> BGHV54	humani vaginalni izolat	61	Lab. kolekcija
<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV54K	humani vaginalni izolat	61	Lab. kolekcija
<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV55	humani vaginalni izolat	67	Lab. kolekcija

<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV55K	humani vaginalni izolat	67	Lab. kolekcija
<i>Lb. plantarum</i> BGHV58	humani vaginalni izolat	74	Lab. kolekcija
<i>Lb. plantarum</i> BGHV90	humani vaginalni izolat	27	Lab. kolekcija
<i>Lb. fermentum</i> BGHV105	humani vaginalni izolat	31	Lab. kolekcija
<i>Lb. plantarum</i> BGHV106	humani vaginalni izolat	31	Lab. kolekcija
<i>Lb. fermentum</i> BGHV110	humani vaginalni izolat	31	Lab. kolekcija
<i>Lb. plantarum</i> BGHV135	humani vaginalni izolat	25	Lab. kolekcija
<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV 224	humani vaginalni izolat	30	Lab. kolekcija
<i>Lb. plantarum</i> BGHV240	humani vaginalni izolat	25	Lab. kolekcija
<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV389	humani vaginalni izolat	78	Lab. kolekcija
<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV425	humani vaginalni izolat	27	Lab. kolekcija
<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV719	humani vaginalni izolat	34	Lab. kolekcija
<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV747	humani vaginalni izolat	55	Lab. kolekcija
<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV805	humani vaginalni izolat	29	Lab. kolekcija
<i>Lb. fermentum</i> BGHV815	humani vaginalni izolat	26	Lab. kolekcija
<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV872	humani vaginalni izolat	34	Lab. kolekcija
<i>Lb. rhamnosus</i> BGHV954	humani vaginalni izolat	32	Lab. kolekcija
<i>Lb. plantarum</i> BGHVV2	humani vaginalni izolat	38	Lab. kolekcija
<i>Lb. fermentum</i> BGHVV2'	humani vaginalni izolat	29	Lab. kolekcija
<i>Lb. casei</i> ATCC393	/	/	ATCC kolekcija
<i>Lb. casei</i> ATCC334	/	/	ATCC kolekcija
<i>Lb. rhamnosus</i> LMG 8153	humani izolat (uretra žene)	/	BCCM/LMG kolekcija
<i>Lactococcus lactis</i> . subsp. <i>cremoris</i> MG1363	/	/	Gasson, 1983
<i>L. lactis</i> . subsp. <i>lactis</i> S50	/	/	Kojic <i>et al.</i> , 1991
<i>L. lactis</i> . subsp. <i>cremoris</i> NS1	/	/	Kojic <i>et al.</i> , 1991
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> BGBUK2-16	/	/	Lozo <i>et al.</i> , 2004
<i>Salmonella enteritidis</i>	klinički izolat	/	IZZS Dr Milan Jovanović Batut, Beograd

Laktobacili su izolovani iz vaginalnih briseva 39 žena različite starosne strukture (Tabela 3). Brisevi su uzimani tokom rutinskih ginekoloških pregleda zdravih subjekata (bez očiglednih zdravstvenih tegoba). Od svakog brisa napravljen je razmaz na MRS Petri šolji i

bakterije su dalje gajene u mikroaerofilnim uslovima na 37°C. Pojedinačne kolonije koje su se pojavile nakon 48 sati rasta su presejavane na nove MRS Petri šolje da bi se dobile čiste kulture (metod iscrpljivanja). Potencijalni izolati iz roda *Lactobacillus* sp. odabrani su na osnovu rasta na selektivnom medijumu, bojenja po Gramu i negativnih rezultata dobijenih nakon katalaza i oksidaza testova. Preliminarna determinacija sojeva izvršena je pomoću API 50 CH sistema (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France).

3.2. MEDIJUMI ZA RAST I KULTIVACIJU BAKTERIJA

Za rast laktobacila korišćeni su, u zavisnosti od vrste eksperimenta, komercijalan MRS medijum (Merck, GmbH Dermstadt, Germany) i modifikovani MRS medijum (deMan *et al.*, 1960) koji je sadržao: bakto-proteazni pepton No.3 (Difco, Becton Dickinson and Company, NJ, USA) (10 g/l), mesni ekstrakt (8 g/l), ekstrakt kvasca (4 g/l), Tween-80 (1 g/l), amonijum-citrat (2 g/l), natrijum-acetat (5 g/l), magnezijum-sulfat (0,2 g/l), mangan-sulfat (0,04 g/l) i natrijum-fosfat (2 g/l), finalna pH 6,8. Medijumi označeni kao Mglu, Mfru, Mman, Mram, Msuc, Mlac and Mcel, označavaju modifikovani MRS medijum kome je kao izvor šećera dodavana glukoza (20 g/l), fruktoza (20 g/l), manozna (20 g/l), ramnoza (20 g/l), saharoza (40 g/l), laktoza (20 g/l) i celobioza (40 g/l) (svi šećeri su nabavljeni od Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Rastvori šećera su pre dodavanja sterilisani autoklaviranjem na 117°C u trajanju od 20 min. Čvrsta podloga za rast je dobijena dodavanjem agara (15 g/l) u odgovarajući medijum. Temperatura kultivacije laktobacila je bila 37°C osim za *Lb. casei* ATCC334 koji je gajen na temperaturi od 30°C. Svi bakterijski izolati gajeni su u aerobnim uslovima.

Za testiranje osetljivosti bakterije na antibiotike u testu mikrodilucije kao i u E testu korišćen je LSM medijum (Klare *et al.*, 2005). LSM medijum je mešavina koju sačinjava

90% IsoSensi Test medijum (OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England) i 10% MRS medijum (OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England).

Za gajenje laktokoka korišćen je M17 medijum (Merck, GmbH Dermstadt, Germany). U M17 medijum je dodavana glukoza (5 g/l) kao izvor ugljenika. Za pravljenje čvrste podloge za rast, u medijum je dodavan agar (15 g/l). Svi sojevi su gajeni u aerobnim uslovima i temperatura kultivacije je bila 30°C. Za gajenje soja *Salmonella enteritidis* korišćen je TSA (Tryptic soy agar, OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England) i soj je gajen aerobno na 30°C.

3.3. ODREĐIVANJE BROJA KOLONIJA CFU („COLONY FORMING UNITS“)

U cilju određivanja ukupnog broja živih bakterija, ćelije su gajene u adekvatnom medijumu, aerobno na temperaturi 37°C, tokom 20 sati. Nakon ovog vremena bakterijske ćelije su oborene centrifugiranjem (13000 rpm, 10 min +4°C, Eppendorf Centrifuge 5415 D) i zatim prane dva puta u 0,9% NaCl. Broj živih ćelija (CFU po mililitru) određen je nanošenjem po 10 µl određenog serijskog razblaženja uzorka (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) na čvrtsti MRS agar. Kolonije su rasle aerobno na adekvatnoj temperaturi tokom 48 sati. Nakon izrastanja kolonije su prebrojavane i CFU je određen na sledeći način:

$$\text{br. ćelija/ml prekončne kulture} = \text{br. kolonija} \times 100 \times (1/\text{razblaženje})$$

3.4. METODE IZOLACIJE DNK

3.4.1. Izolacija ukupne DNK iz bakterija

Izolacija ukupne DNK iz bakterija rađena je po modifikovanoj proceduri Hopwood-a i saradnika (1985). U sveži MRS medijum dodavan je 10% inokulum prekonocne kulture koji je zatim inkubiran do optičke gustine izmerene na spektrofotometru (ULTROSPEC 500 pro, Amersham, Biosciences, GE Healthcare, UK), na talasnoj dužini od 600 nm (OD_{600}), $OD_{600}=0,4 - 0,5$ na temperaturi 37°C. Tečna kultura bakterija u logaritamskoj fazi rasta centrifugirana je 2 min na 13000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415 D) i zatim su bakterije oprane dva puta u TEN puferu (50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA i 50 mM NaCl, pH 8,0). Talog je zatim resuspendovan u 0,5 ml pufera (6,7% saharoza, 50 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, finalno pH 8,0) u koji je dodavan lizozim u koncentraciji od 10 mg/ml i mutanolizin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) u koncentraciji 1 U/ml. Rastvor je inkubiran preko noći na temperaturi od 37°C i nakon toga je dodato 250 µl 2% SDS-a. Dobijena suspenzija je intenzivno mešana na vorteksu sve dok se primetan viskozitet rastvora nije redukovao. Odstranjivanje proteina vršeno je višestrukim fenolskim ekstrakcijama pri čemu je u svaki put dodavano 250 µl neutralnog fenol-hloroforma (PCI) do iščezavanja bele interfaze. Posle svakog dodavanja PCI smeše rastvor je vorteksovan 30 sekundi, zatim centrifugirana 2 min na 13000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415 D). Pažljivo sakupljenom supernatantu dodavana je 1/10 zapremine 3M Na-acetata pH 4,8 i jedna zapremina izopropanola, a zatim je rastvor lagano mešan i inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi. Ukupna DNK taložena je centrifugiranjem (20 min, 13000 rpm u Eppendorf Centrifuge 5415 D). Posle centrifugiranja talog je ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C), ponovo centrifugiran (2 min, 13000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415 D), a zatim sušen i na kraju

resuspendovan u 30-50 μ l bidestilovane vode. RNK je uklonjena inkubiranjem uzoraka sa RN-azom (10 μ g/ml) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), 15 min na temperaturi 37°C.

3.5. METODE RADA SA BAKTERIJAMA

3.5.1. Biohemijske reakcije

3.5.1.1. Određivanje pH vrednosti prekončne kulture

Vrednosti pH prekončne kulture stare 20 sati određivane su merenjem ovog parametra pH-metrom u zapremini od 10 ml (Hi9321 Microprocessor pHmeter, Hanna Instruments®, SAD).

3.5.1.2. Detekcija produkcije vodonik peroksida (H_2O_2) u bakterijama

Merenje proizvodnje H_2O_2 u bakterijama rađeno je po metodi Eschenbach i saradnika (1989). Bakterije su sterilnom čačalicom zasejavane na MRS Petri šolje koje su sadržale 5 mg 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) hromogenog supstrata peroksidaze, i 0,02 mg peroksidaze rena (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany). Peroksidaza generiše O_2 od H_2O_2 koju proizvode laktobacili dok TMB boji kolonije u plavo u prisustvu O_2 . Nakon 48 sati inkubacije u mikroaerofilnim uslovima (Anaerocult® A, Merck, GmbH Darmstadt, Germany) kolonije koje proizvode H_2O_2 na MRS agaru postaju tamno plave dok one koje ne proizvode ostaju bele.

3.5.2. Bojenje bakterija

3.5.2.1. Bojenje po Gramu

Metoda bojenja bakterija rađena je po proceduri koju je opisao Gram (1884). Na prethodno očišćenu i obezmašćenu predmetnu pločicu (spaljivanjem na plamenu), nanošena je kap prekonocne bakterijske suspenzije, nakon čega je napravljen razmaz na staklenoj pločici. Razmaz je sušen na vazduhu, na sobnoj temperaturi, a zatim fiksiran na plamenu, tako što je pločica provlačena laganim potezima 3-5 puta iznad plamena. Fiksirani preparat je bojen prema sledećoj proceduri: nanošena je kap genicijan violeta (Sinex Laboratory, Beograd, Srbija) i preparat je inkubiran 2 min. Genicijan violet je ispiran vodom a zatim je nanošena jedna kap lugola (J_2 u KJ) (Sinex Laboratory, Beograd, Srbija) i preparat je inkubiran još 2 min. Višak lugola je odlivan, tj. nije ispiran se vodom, nakon čega je stavljana jedna kap 96%-tnog alkohola koji je inkubiran na preparatu 30 sekundi, da ne bi došlo do potpunog odbojavanja preparata. Na preparat je nakon toga pipetom naneta kap fuksina (Sinex Laboratory, Beograd, Srbija) koja je nakon 30-60 sekundi ispirana vodom a preparat sušen filter papirom blagim tapkanjem, ne brisanjem. Na preparat je pre posmatranja pod mikroskopom stavljana jedna kap kedrovog ulja (Sinex Laboratory, Beograd, Srbija). Preparat je posmatran pod mikroskopom, objektivom uljane imerzije. Svi preparati su pregledavani na mikroskopu (Olimpus U-RFL-T, GmbH, Hamburg, Germany) na uvećanju 300X i fotografisani. Gram-pozitivne bakterije su pod mikroskopom ljubičaste boje, a Gram-negativne crvene boje.

3.6. ENZIMSKE REAKCIJE SA DNK

3.6.1. Sečenje DNK restrikcionim enzimima

Sečenje restrikcionim enzimima (Sambrook *et al.*, 1989) rađeno je u komercijalnim puferima u zavisnosti od korišćenih enzima. Uslovi sečenja DNK restrikcionim enzimima kao što su količina enzima, pufer i temperatura inkubacije određivani su prema savetu proizvođača.

3.6.2. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom („Polymerase Chain Reaction“)

Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom rađeno je tako što je pripremljena reakciona smeša koja sadrži: 1 x reakcioni pufer (10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, pH 9,0), 2,5 mM MgCl₂, 200 μM svakog dezoksinukleotida (dNTP), dva prajmera (10 pmol-a) i 1U *Taq* DNK polimeraze (Fermentas UAB, Vilnius, Lituanija). Količina DNK matrice u eksperimentima bila je 50 ng.

PCR reakcija je rađena po sledećem programu: ciklus 1: početna denaturacija 5 min na 94°C; 30 ciklusa: denaturacija 1 min na 94°C, vezivanje prajmera 30 s (sekvence korišćenih prajmera i njihove temperature vezivanja date su u Tabeli 4), polimerizacija 1 min na 72°C; finalna polimerizacija 7 min na 72°C. Pri svakom postavljanju PCR reakcije kao negativna kontrola korišćena je reakciona smeša koja je imala sve prethodno navedene komponente osim DNK matrice.

Za detekciju RPP-tipa *tet* gena korišćen je „touchdown“ PCR program: početna denaturacija 5 min na 94°C; 22 ciklusa: denaturacija 30 s na 94°C, vezivanje prajmera 30 s sa smanjenjem temperature u svakom sledećem ciklusu po 1°C od početne 72 do krajnje 50°C, i

polimerizacija 30 s na 72°C; 20 ciklusa: denaturacija 30 s na 94°C, vezivanje prajmera 30 s na 50°C, i polimerizacija 30 s 72°C; finalna polimerizacija 7 min na 72°C.

Tabela 4. Sekvence i opis prajmera kao i temperature vezivanja i korišćene pozitivne kontrole.

prajmer	gen	sekvencija prajmera 5'→3'	temperatura vezivanja	pozitivna kontrola (referenca)	prajmer - referenca
1104f 2241r	deo gena za 23S rRNK-R amplikon	WCGGTAAYAGCTCAC ACCGCCCCAGTHAACT	57°C	/	Hunt <i>et al.</i> , 2006
3SlcF2 23SlcR2	deo gena za 23S rRNK	CCGACCCGCACGAAAGGCG GCCCGACTTTCGTCCCTGC	55°C	/	ovaj rad
GTG ₅	repetitivne skvence	GTGGTGGTGGTGGTG	50°C	/	Versalovic <i>et al.</i> , 1994
TETK-FW1 TETK-RV1	<i>tet(K)</i>	TTATGGTGGTTGTAGCTAGAAA AAAGGGTTAGAAACTCTTGAAA	55°C	pAT102 (Zilhao <i>et al.</i> , 1988)	J.-M. Collard (lična komunikacija)
TETL-FW3 TETL-RV3	<i>tet(L)</i>	GTMGTTGCGCGCTATATTCC GTGAAMGRWAGCCACCTAA	55°C	pAT103 (Zilhao <i>et al.</i> , 1988)	J.-M. Collard (lična komunikacija)
DI DII	RPP	GAYACNCCNGGNCA YRTNGAYTT GCCCARWANGGRITNGGNGNACYTC	45°C	pJ13 (Morse <i>et al.</i> , 1986)	Clermont <i>et al.</i> , 1997
Ribo2-FW Ribo2-RV	RPP	GGMCA YRTGGATTTYWTIGC TCIGMIGGIGTRCTIRCIGGRC	„Touchdown“ ^a	pJ13 (Morse <i>et al.</i> , 1986)	Aminov <i>et al.</i> , 2001
ERMA-FW ERMA-RV	<i>erm(A)</i>	AAGCGGTA AACCCCTCTGA TTCCCAAATCCCTTCTCAAC	55°C	soj 694/01 (Strommenger <i>et al.</i> , 2003)	Strommenger <i>et al.</i> , 2003
ERMB-FW ERMB-RV	<i>erm(B)</i>	CATTTAACGACGAAACTGGC GGAACATCTGTGGTATGGCG	55°C	Tn1545 (lična komunikacija)	Jensen <i>et al.</i> , 1999
ERMC-FW ERMC-RV	<i>erm(C)</i>	AATCGTCAATTCCTGCATGT TAATCGTGAATACGGGTTTG	55°C	soj 694/01 (Strommenger <i>et al.</i> , 2003)	Strommenger <i>et al.</i> , 2003

N=A, C, G, ili T; R=A ili G; W=A ili T; Y=C ili T; H=A, C ili T; M=A ili C; I= inozin

RPP-geni iz *tet* genske familije koji kodiraju proteine za protekciju ribozoma

^a – videti Materijal i Metode (3.6.2.)

3.6.3. Metoda umnožavanja repetitivnih sekvenci (REP-PCR)

Za identifikaciju laktobacila do nivoa vrste korišćena je metoda umnožavanja repetitivnih DNK elemenata (Versalovic *et al.*, 1994 Gevers *et al.*, 2001). U PCR reakciji korišćen je (GTG)₅ prajmer i reakcija je rađena po sledećem programu: početna denaturacija 7 min na 95°C, umnožavanje DNK fragmenata u 33 ciklusa: denaturacija 1 min na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 40°C, polimerizacija 8 min na 65°C; poslednji ciklus polimerizacije 16 min na 65°C (Versalovic *et al.*, 1994).

Digitalizovani (GTG)₅-PCR profili izolata („fingerprints”) obrađeni su i upoređeni sa postojećom bazom podataka DNK profila i referentnih sojeva laktobacila (Laboratory of Microbiology, Faculty of Sciences, Ghent University, Belgium). Za ove analize korišćen je BioNumerics V3.5 softverski paket (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

3.6.4. PCR-RFLP („**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism”) analiza

Ova metoda omogućava brzu detekciju mutacija pomoću digestije PCR proizvoda sa restrikcionim enzimima bez koraka sekvenciranja DNK. Utvrđeno je da tranziciona A→G mutacija na poziciji 2058 u okviru 23S rDNK sekvenci kod eritromicin-rezistentnog genotipa uvodi *Bbs*I restrikciono mesto (Sevin *et al.*, 1998). U PCR reakciji u kojoj su korišćeni prajmeri 1104f i 2241r i totalna DNK izolata kao matrica, umnožen je R ampikon veličine 1,2 kb, koji obuhvata A2058 nukleotid. Po jedan mikrogram R ampikona sečen je sa *Bbs*I i odvojeno sa *Hind*III enzimima, 1 sat na temperaturi 37°C. Proizvodi sečenja su razdvojeni na 1% agaroznom gelu u TBE puferu (89 mM Tris-acetat, 2 mM EDTA i 0,89 mM borna kisleina, pH 8,3). Dobijeni proizvodi sečenja R ampikona sa restrikcionim enzimima razdvojeni su na 1% agaroznom gelu.

3.7. ELEKTROFOREZA DNK

3.7.1. Elektroforeza totalne DNK i PCR-om umnoženih fragmenata

Elektroforeza totalne DNK i fragmenata umnoženih PCR-om rađena je na horizontalnim 1% agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani rastvaranjem agaroze u 1 x TAE puferu (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA - pH 8,0) uz dodavanje etidijum bromida (0,5 µg/ml). Za elektroforezu je korišćen 1 x TAE pufer. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela.

Elektroforeza rep-PCR-om umnoženih DNK fragmenata je rađena na horizontalnim 1,5% agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani rastvaranjem agaroze u 1 x TAE puferu uz dodavanje etidijum bromida (0,5 µg/ml). Za elektroforezu je korišćen 1 x TAE pufer. Elektroforeza je tekla 20 sati na +4°C, pri konstantnom naponu od 60 V.

Veličine analiziranih fragmenata su određivane upoređivanjem dužine pređenog puta dobijenih fragmenata sa pređenim putem DNK fragmenata poznate dužine pri čemu je kao standard korišćen „Gene Ruler™ DNA Ladder Mix” (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania).

3.8. ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE (MIK) ANTIBIOTIKA

3.8.1. Test makrodilucije

Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) za testirane antibiotike (ampicilin, eritromicin, tetraciklin, gentamicin, streptomycin i vankomicin) rađeno je pomoću testa makrodilucije u MRS medijumu. Za potrebe ovog testa bakterije su gajene u tečnom

MRS medijumu koji je sadržao rastuće koncentracije određenog antibiotika ili u MRS medijumu bez antibiotika (kontrola). Zatim su pravljena serijska razblaženja koja su razmazivana na Petri šolje. Broj formiranih kolonija (CFU) na Petri šoljama bez antibiotika određen je nakon 48 sati inkubacije i poređene su vrednosti između kultura gajenih sa i bez određenog antibiotika. MIK predstavlja najnižu koncentraciju antibiotika pri kojoj se ne opaža porast broja bakterijskih kolonija koji se testira nakon 48 sati rasta u odgovarajućim uslovima. MIK-ovi su u ovom radu definisani na osnovu privremenih mikrobioloških graničnih vrednosti za *Lactobacillus* sp. koje su predložili Danielsen i Wind (2003): za ampicilin, ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$; eritromicin, ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$; gentamicin, ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$; tetraciklin, ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ (≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ za *Lb. plantarum*); streptomycin, > 256 $\mu\text{g/ml}$ i vankomicin, ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$.

3.8.2. Test mikrodilucije

Određivanje MIK vrednosti za šest testiranih antibiotika takođe je rađeno pomoću testa mikrodilucije u LSM medijumu koji se sastojao od Iso-Sensitest Broth medijuma (90%) (OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England) i MRS medijuma (10%) (OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England) (Klare *et al.*, 2005). U komercijalno pripremljene bunarčice na mikrotitar ploči (ACE-ART VetMIC panels, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden), u kojima se nalaze rastuće koncentracije antibiotika, naneto je po 100 μl 16 sati stare prekonocne kulture. Paralelno kulturama je određen ukupan broj ćelija (CFU). Inokulisane mikrotitar ploče su zatim inkubane 48 sati na temperaturi od 37°C. Za MIK je uzimana najmanja koncentracija antibiotika za koju se u bunarčiću ne detektuje rast bakterija tj. prvi bunarčić bez vidljivog bakterijskog taloga.

3.8.3. E test

Za određivanje MIK vrednosti kod izolata koji su pokazali visok stepen rezistencije na eritromicin korišćen je i treći metod - E test. Ovaj test uveden je u praksu 1988. godine i trenutno se koristi u mnogima laboratorijama. Standardna E test procedura rađena je u LSM medijumu po protokolu proizvođača (AB Biodisk, Solna, Sweden). Količina inokuluma koja je stavljana na LSM Petri šolje odgovarala je inokulumu jednakom McFarland standardu 0,5 ($OD_{600} = 0,132$). Po 200 μ l kulture razmazivano je na LSM Petri šolje. Eritromicinski pravougaoni listići na kojima se nalazio gradijent koncentracije ovog antibiotika, stavljeni su preko razmaza kulture, a zatim su Petri šolje inkubirane aerobno 48 sati na temperaturi od 37°C. Elipse inhibicije očitavane su nakon 24 i 48 sata u skladu sa preporukama proizvođača (AB Biodisk, Solna, Sweden).

3.9. DNK/DNK HIBRIDIZACIJA („Southern Blot”)

3.9.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane

Za određivanje broja kopija gena za 23S rRNK korišćena je metoda DNK/DNK hibridizacije. Totalna DNK izolovana iz izolata *Lb. rhamnosus* BGHV719 i *Lb. casei* ATCC334 koje su isečene sa *KpnI* restrikcionim enzimom razdvojene su na 1% agaroznom gelu. Po završenoj elektroforezi DNK je prenošena na najlonske membrane po metodi Southern-a (1975). Po završetku elektroforeze, agarozni gel je tretiran sa 0,25 M HCl tokom 15 min, da bi se ostvarilo delimično prekidanje molekula DNK uzrokovano depurinacijom. Gel je zatim ispiran u destilovanoj vodi, a denaturacija DNK je vršena potapanjem gela 2 puta po 15 min u rastvor koji sadrži 0,5 M NaOH i 1,5 M NaCl (denaturacioni rastvor). Pre transfera gel je neutralisan u neutralizacionom puferu (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, finalno pH

7,5) inkubacijom 2 puta po 20 min. Za sledeću fazu eksperimenta pripremani su listovi Whatman 3 MM filter papira odgovarajućih dimenzija. Najlonska membrana (SensiBlot™ Olus Nylon Membrane, Fermentas UAB, Lituanija), na koju će DNK biti preneti, je potapana na kratko u 10 x SSC puferu (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-citrat, finalno pH 7,0). Dva lista 3 MM papira, veći od gela, su potapana u 10 x SSC pufer i slagana jedan na drugi. Na njih je stavljan tretiran gel, tako da je strana sa DNK bila okrenuta na gore, a oko gela su stavljeni graničnici. Preko gela je stavljena najlonska membrana dimenzija kao i sam gel i preko nje još dva 3 MM papira navlažena u 10 x SSC puferu. Pri stavljanju papira vođeno je računa da mehurići vazduha ne ostanu zarobljeni između papira. Na kraju je preko svega stavljen 10 cm debeo sloj upijajućeg papira i sve je ravnomerno opterećeno tegom od 1 kg. Transfer je vršen preko noći u 10 x SSC puferu.

Posle završenog transfera najlonska membrana je skinuta i dva puta potopljena u 5 x SSC pufer u trajanju od 5 min. Fiksiranje DNK za membranu je rađeno tako što je prosušena membrana je stavljena između dva 3 MM papira i ostavljena 2 sata na temperaturi od 80°C u pećnici.

3.9.2. Obeležavanje probe sa dioksigenin-dUTP-om

Specifična proba koja je korišćena u eksperimentu DNK/DNK hibridizacije dobijena je PCR reakcijom pomoću prajmera 23SlcF2 i 23SlcR2 koji umnožavaju fragment od 429 bp u okviru 23S rDNK *Lb. casei* ATCC334. Za obeležavanje DNK probe korišćen je „DIG DNA Labeling and Detection Kit” (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany). Ovaj protokol se bazira na hibridizaciji „random” oligonukleotida za denaturisanu DNK probu („random primed labeling”). Komplementarni lanac DNK sintetiše se pomoću Klenow-og

enzima koji koristi 3'(OH) kraj „random” oligonukleotida kao prajmer i mešavine dezoksioligonukleotida sa dioksinom (DIG-11-dUTP) za produžavanje lanca DNK. DIG-11-dUTP se ugrađuje u novosintetisanu DNK na svakih 20-25 nukleotida. U 1 µg probe (PCR proizvod) je dodata smeša koja se sastoji od: 2 µl dNTP smeše za obeležavanje (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP i 0,65 mM dTTP i 0,35 mM DIG-11-dUTP pH 7,5), 2 µl mešavine heksanukleotida (10 x koncentrisan) i Klenow enzim za obeležavanje (2U/µl), a finalna zapremina do 15 µl podešena je destilovanom vodom. Dobijena smeša je promešana, kratko centrifugirana i inkubirana preko noći na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8). Pre hibridizacije proba je denaturisana kuvanjem 5 min na temperaturi od 100°C, a zatim prebačena na led do sledećeg koraka hibridizacije. Ovako je dobijena neradioaktivno obeležena proba.

3.9.3. Neradiokativna DNK/DNK hibridizacija

Procedura za hibridizaciju DNK sa neradioaktivno obeleženom probom je bila sledeća: membrana je pakovana u najlonsku kesicu i inkubirana 1 sat na temperaturi od 65°C sa 10 ml hibridizacionog pufera (5 x SSC, 0,1% N-lauril sarkozil, 0,02% SDS, 1% kazein). Nakon toga, u kesicu je sipan 1 ml svežeg hibridizacionog pufera po cm² membrane u koji je prethodno dodata neradioaktivno obeležena i denaturisana proba. Hibridizacija je vršena preko noći (16 sati). Membrana je nakon hibridizacije oprana dva puta u rastvoru I (2 x SSC, 0,1% SDS) na sobnoj temperaturi, a zatim dva puta oprana u rastvoru II (0,5 x SSC, 0,1 % SDS) na temperaturi od 65°C.

Za detekciju hibrida korišćen je „DIG DNA Labeling and Detection Kit” (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany). Proces detekcije uključio je:

- 1) vezivanje hibridizovane probe sa anti-dioksigenin-AP i Fab fragmentima konjugovanim sa alkalnom fosfatazom;
- 2) vizualizaciju sa kolorimetrijskim supstratima NBT/BCIP koji reaguju sa alkalnom fosfatazom.

Pranje membrane i detekcija hibrida su vršeni po uputstvu proizvođača (Roche Diagnostics GmbH).

3.10. PREŽIVLJAVANJE SOJA BGHV719 U RAZLIČITIM MRS

MEDIJUMIMA

U ovom eksperimentu praćeno je preživljavanje bakterija u komercijalnom MRS medijumu i modifikovanom MRS medijumu gde su kao izvor ugljenika korišćeni različiti monosaharidi, glukoza (obeležen kao Mglu), fruktoza (Mfru), manoza (Mman) i ramnoza (Mram) i disaharidi, laktoza (Mlac), saharoza (Msuc) i celobioza (Mcel). U odgovarajući medijum zasejavan je 0,5 % inokulum 16 sati stare prekonoćne kulture bakterije. Vrednosti OD₆₀₀ za svaku kulturu očitavana je svakih sat vremena tokom 20 sati (ULTROSPEC 500 pro, Amersham, Biosciences, GE Healthcare, UK).

3.11. METODE RADA SA PROTEINIMA

3.11.1. Izolacija proteina ćelijskog zida tretiranjem sa LiCl

Izolacija proteinskog sadržaja ćelijskog zida humanih vaginalnih laktobacila gajenih u MRS-u kao i u modifikovanim MRS medijumima sa dodatkom različitih šećera, vršena je sa 5M LiCl po modifikovanoj metodi Schär-Zammaretti i saradnika (2005). Bakterije su gajene u 50 ml odgovarajućeg medijuma na temperaturi 37°C tokom 10 sati. Bakterije su zatim sakupljene centrifugiranjem (10000 rpm, 20 min, +4°C; Sorvall® RC-5B, DuPont

Instruments, Newtown, CT, USA) i talozi su tri puta isprani sa 15 ml 10 mM KH_2PO_4 . Nakon trećeg pranja, u 15 ml 10 mM KH_2PO_4 resuspendovana je ista količina bakterijskog taloga za svaki uzorak (OD_{600} za svaki uzorak je bio 2,5). Ista zapremina (15 ml) 5M LiCl je dodavana u suspenziju koja je zatim ostavljena da stoji na sobnoj temperaturi 1 sat. Nakon ovog perioda bakterije i druge nečistoće su istaložene centrifugiranjem 10000 rpm, u trajanju od 20 min na temperaturi od $+4^\circ\text{C}$ (Sorvall® RC-5B, DuPont Instruments, Newtown, CT, USA). Nakon toga, supernatanti su ukoncentrisani sa MICROCON YM-10 vajlicama za koncentrisanje proteina sa „cut off” od 10000 Da (Millipore, USA) do zapremine od 100 μl . Nerazblaženi supernatant je dalje analiziran na SDS-PAGE.

3.12.2. Elektroforeza proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Na aparaturi za vertikalnu elektroforezu (Se 600 Vertical Slab Gel Unit, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco USA) korišćen je diskontinualan sistem gelova, koji je podrazumevo prisustvo gela za koncentrisanje i gela za razdvajanje. Debljina gela iznosila je 1,5 mm. Gel za koncentrisanje je sadržao 6% akrilamida, 0,2% bisakrilamida, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% TEMED i 0,005% amonijum persulfata, a gel za razdvajanje je sadržao akrilamid i bisakrilamid u odnosima 10% i 0,3%, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% TEMED i 0,005% amonijum persulfata. Gel za razdvajanje zauzima 4/5 ukupne zapremine i polimerizovan je 2 sata pre elektroforeze, dok je gel za koncentrovanje nalivan 30 min pre elektroforeze. Pufer za elektroforezu je sadržao: 25 mM Tris bazu, 192 mM glicin i 0,1% SDS, finalne pH 8,3. Dobijeni supernatanti su pomešani sa puferom za uzorak (125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10 mM dinatrijum EDTA, i 4% natrijum dodecil sulfat (SDS), 25% glicerol, 5% 2-merkptoetanol, 0,07% bromfenol plavo) u odnosu 1:1. Uzorci su pre

nanošenja inkubirani 10 min na 80°C. Elektroforeza je vršena u trajanju od 16 sati pri konstantnoj struji od 10 mA. Po završenoj elektroforezi, sa ploče za elektroforezu je odstranjivan gel za koncentrisanje. Fiksiranje i bojenje gela za razdvajanje vršeno je 1 sat uz mešanje, u rastvoru koji sadrži 45% metanola, 47% vode, 8% sirćetne kiseline i 0.5% Coomassie brilliant blue R250. Odbojavanje gela je vršeno u rastvoru koji sadrži 10% metanola, 82% vode i 8% sirćetne kiseline uz mešanje i promenu rastvora za odbojavanje na 2 do 3 sata. Po završenom odbojavanju gel je čuvan na +4°C.

Analiza supernatanta je urađena poređenjem dobijenih traka na gelu sa trakama proteinskog markera koji obuhvata trake sledećih molekulskih masa: 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 60 kDa, 70 kDa, 85 kDa, 100 kDa, 120 kDa, 150 kDa and 200 kDa (Page Ruler™ prestained Protein Ladder, Fermentas UAB, Lithuania).

3.12. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST BAKTERIJA

3.12.1. Detekcija antimikrobne aktivnosti difuzionim metodom u bunarčićima

Za detekciju sinteze antimikrobnih supstanci korišćen je difuzioni metod u bunarčićima (Harris *et al.*, 1989). Petri šolje sa čvrstom MRS podlogom prelivane su sa 5 ml mekog (0,7%) GM17 ili MRS agara, u koga je inokulisano približno 10^5 - 10^6 ćelija indikatorskog soja po mililitru medijuma. U mekom agaru su pravljene bunarčiči prečnika 5 mm u koje je sipano 50 μ l 16 sati stare kulture potencijalnog antimikrobnog producenta. Prisustvo antimikrobnih supstanci je detektovano na osnovu pojave svetle zone oko bunarčića koja se javlja kao posledice inhibicije rasta senzitivnog bakterijskog soja. Za ispitivanje proteinske prirode antimikrobne supstance na samu ivicu bunarčića dodavan je kristal proteaze, tip XIV (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA).

3.13. TEST ADHEZIJE BAKTERIJA ZA HEKSADEKAN (MATH)

Za testiranje stepena adhezije bakterija za organske rastvarače korišćena je metoda adhezije bakterija za heksadekan (MATH metoda) opisana od strane Reid i saradnika (1992). Prekonoćna kultura bakterija (16 sati stara) je centrifugirana na 13500 rpm u trajanju od 5 min (Eppendorf Centrifuge 5415 D) i bakterijski talozi su prani dva puta sa 15 ml 10 mM KH_2PO_4 . Dobijena bakterijska suspenzija nakon pranja je dodavana u 10 ml 10 mM KH_2PO_4 do OD_{600} od $0,5 \pm 0,05$ (OD_0). Nakon homogenizacije blagim vorteksovanjem, po 3 ml suspenzije je prebacivano u epruvetu u koju je zatim dodato 150 μl heksadekana (čistoća >99%, Merck Schuchardt, Hohenbrunn, Germany). Suspenzija je vorteksovana dva puta po 30 sekundi sa pauzom od 1 min između vorteksovanja. Rastvor je ostavljen da stoji tokom 30 min na sobnoj temperaturi da bi došlo do odvajanja faza (voda i heksadekan). Zatim je 1 ml donje - vodene faze prebacivano pomoću automatske pipete u kivetu i izmeren je OD_{600} (OD_1). Procenat ćelija vezanih za frakciju heksadekana, (θ), izračunavan je po sledećoj formuli:

$$\theta = 100 \times \text{OD}_0 - \text{OD}_1 / \text{OD}_0$$

U slučaju da se kao organsko jedinjenje koristi heksadekan, vrednosti θ od 0-35 označavaju nisku hidrofobnost, 36-70 srednju hidrofobnost i 71-100 visoku hidrofobnost odnosno brojevi označavaju procenat bakterija koji se vezuju za heksadekan (Ocaña *et al.*, 1999).

3.14. PROIZVODNJA EGZOPOLISAHARIDA (EPS)

Mukoidnost kolonija, kao jedan od parametara proizvodnje EPS-a, određena je vizuelno, a stepen mukoidnosti procenjen je razvlačenjem kolonija pomoću sterilne čačkalice (Mayeux *et al.*, 1962). Visok stepen mukoidnosti označen je kao ++, redukovana mukoidnost označena je kao +, odsustvo mukoidnosti je označeno kao –.



IV REZULTATI

4.1. IDENTIFIKACIJA HUMANIH VAGINALNIH IZOLATA

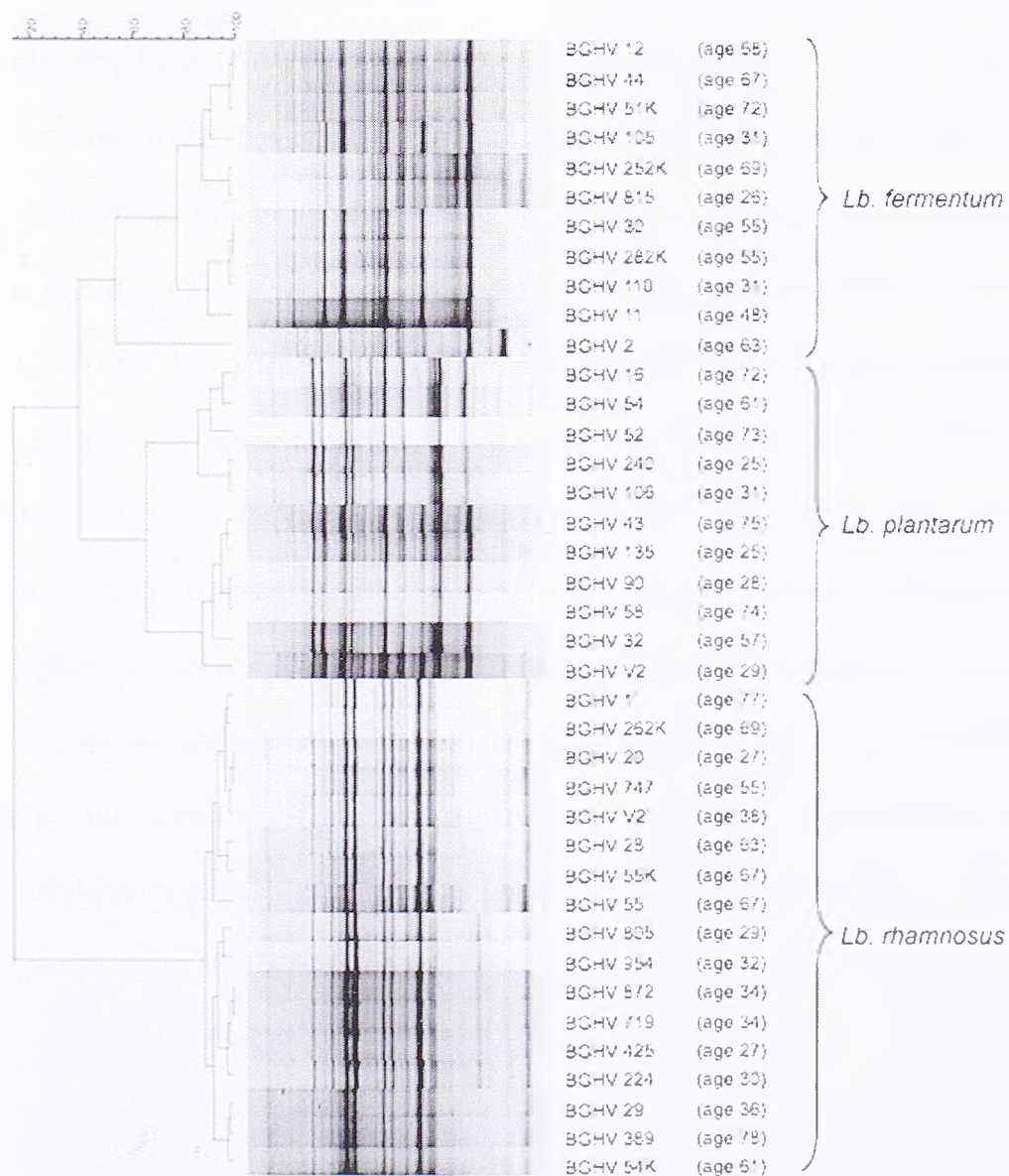
4.1.1. Izolacija i identifikacija humanih vaginalnih izolata

Laktobacili su izolovani iz vaginalnih briseva 39 zdravih žena različite starosne grupe (od 25 do 78 godina), tokom rutinskih ginekoloških pregleda. Izolovana je jedna vrsta potencijalnog laktobacila po subjektu, a na osnovu sledećih testova: rasta na selektivnom medijumu, bojenja po Gramu i negativnih rezultata dobijenih nakon katalaza i oksidaza testova. Preliminarna identifikacija izolata pomoću API 50 CH sistema pokazala je da su izolovane sledeće vrste humanih vaginalnih laktobacila: *Lb. rhamnosus* (27 izolata), *Lb. salivarius* (4 izolata), *Lb. brevis* (2 izolata), *Lb. plantarum* (4 izolata), *Lb. fermentum* (1 izolat) i *Lb. acidophilus* (1 izolat).

4.1.2. Molekularna determinacija bakterija do nivoa vrste

Nakon preliminarnе identifikacije humanih vaginalnih izolata dalja identifikacija do nivoa vrste urađena je rep-PCR metodom uz korišćenje (GTG)₅ prajmera. Ovaj prajmer umnožava repetitivne sekvence koje se nalaze u okviru bakterijskog genoma i čiji je broj i raspored u okviru genoma karakterističan za vrstu. Dobijeni PCR fragmenti razdvojeni su na 1.5% agaroznom gelu i zatim je pomoću postupka prosečnog povezivanja klastera (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Averages - UPGMA) napravljen dendogram. Sličnosti u dendogramu su izražene pomoću Personovog koeficijenta korelacije

(Pearson product-moment coefficient). Na osnovu poređenja DNK profila traka dobijenih za 39 humanih vaginalnih izolata sa laboratorijskom bazom podataka i bazom podataka Laboratorije za Mikrobiologiju (Laboratory of Microbiology, Faculty of Sciences, Ghent University) utvrđeno je da 17 izolata pripada vrsti *Lb. rhamnosus*, 11 izolata pripada vrsti *Lb. fermentum* i 11 izolata pripada vrsti *Lb. plantarum*. Dobijeni DNK profili traka su pokazivali relativno visok stepen sličnosti u okviru svake vrste (Slika 12).



Slika 12. Analiza klastera digitalnih invertovanih (GTG)₅-PCR profila humanih vaginalnih izolata; age-godine subjekta.

4.2. ANTIMIKROBNO DEJSTVO BGHV IZOLATA

4.2.1 Antimikrobno dejstvo BGHV izolata na indikatorske sojeve

Iz literature je poznato da humani vaginalni laktobacili imaju zaštitnu ulogu koju ostvaruju zahvaljujući različitim mehanizmima kojima štite organizam od mnogobrojnih patogena. Svoje antimikrobno dejstvo mogu ispoljiti proizvodnjom mlečne kiseline koja održava nisku pH vagine, ali i sintezom različitih primarnih i sekundarnih metabolita koji imaju antimikrobno dejstvo (bakteriocina, H_2O_2) (Zárate *et al.*, 2007).

Da bi ispitali da li humani vaginalni izolati korišćeni u ovom radu sintetišu antimikrobne supstance i da bi utvrdili prirodu tih jedinjenja primenjen je difuzioni metod u bunarčićima (Harris *et al.*, 1989). Kao indikator sojevi u ovom radu korišćeni su *L. lactis* subsp. *cremoris* NS1, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16 i *Salmonella enteritidis* (Tabela 5). Svi humani vaginalni izolati su pokazivali antimikrobno dejstvo i inhibirali rast dva indikatorska soja, *L. lactis* subsp. *cremoris* NS1 i *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. S druge strane, 19 izolata je pokazivalo antimikrobnu aktivnost kada je kao indikator korišćen soj *Salmonella enteritidis*. Dodatno, test sa proteazom nije bio pozitivan ni u jednom slučaju što ukazuje da antimikrobne supstance nisu proteinske prirode. Među izolatima nije bilo razlika u veličini zona što ukazuje da je njihovo antimikrobno dejstvo verovatno uzrokovano prisustvom mlečne kiseline ili s obzirom da se radi o vaginalnim izolatima - produkcijom H_2O_2 .

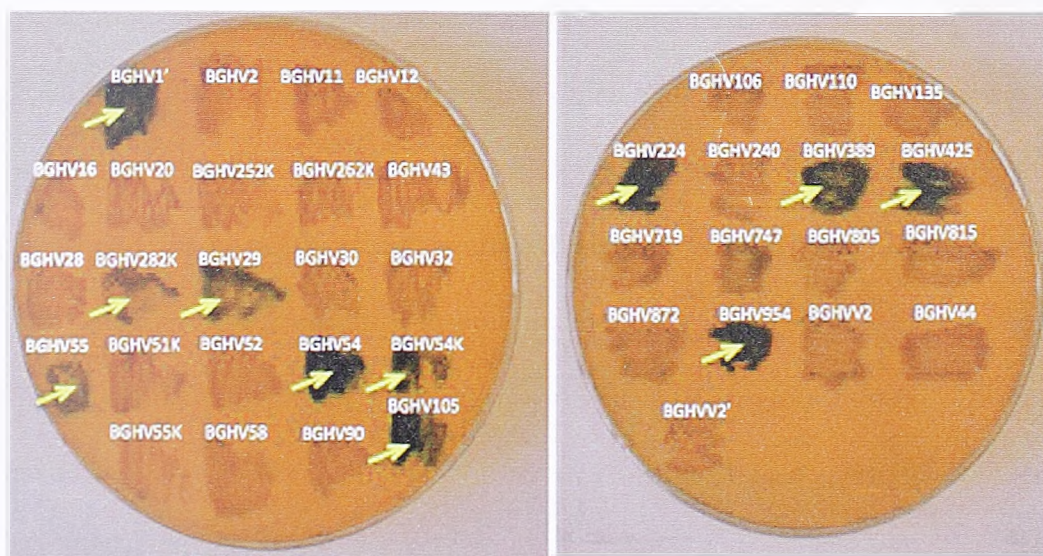
Tabela 5. Antimikrobijalna aktivnost BGHV izolata na odabrane indikatorske sojeve

izolat	indikator soj		
	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NS1	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> BGBUK2-16
BGHV1'	+	+	+
BGHV2	-	+	+
BGHV11	+	+	+
BGHV12	-	+	+
BGHV16	-	+	+
BGHV252K	+	+	+
BGHV262K	-	+	+
BGHV28	-	+	+
BGHV282K	+	+	+
BGHV29	+	+	+
BGHV30	-	+	+
BGHV32	+	+	+
BGHV43	+	+	+
BGHV44	+	+	+
BGHV51K	+	+	+
BGHV52	-	+	+
BGHV54	-	+	+
BGHV54K	+	+	+
BGHV55	-	+	+
BGHV55K	-	+	+
BGHV90	-	+	+
BGHV58	+	+	+
BGHV105	-	+	+
BGHV106	-	+	+
BGHV110	-	+	+
BGHV224	+	+	+
BGHV240	+	+	+
BGHV389	-	+	+
BGHV425	+	+	+
BGHV719	+	+	+
BGHV747	+	+	+
BGHV805	+	+	+
BGHV815	+	+	+
BGHV872	-	+	+
BGHV954	-	+	+
BGHVV2	+	+	+
BGHV135	-	+	+
BGHVV2'	-	+	+

+ = detektuje se zona inhibicije na indikatorskom soju; - = ne detektuje se zona inhibicije na indikatorskom soju

4.2.2. Proizvodnja vodonik peroksida (H_2O_2)

Da bi proverili da li BGHV izolati proizvode H_2O_2 i da li postoji korelacija između proizvodnje H_2O_2 i antimikrobnog dejstva humanih vaginalnih izolata testirana je sposobnost BGHV izolata da produkuju vodonik peroksid. Test je rađen tako što su sojevi striklovani na Petri šolje sa MRS agarom u koji je dodat hromogeni supstrat peroksidaze - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin zajedno sa peroksidazom rena. Nakon 48 sati inkubacije na $37^\circ C$ u mikroaerofilnim uslovima izrasle kolonije koje proizvode H_2O_2 boje se tamno plavo dok one koje ga ne proizvode ostaju bele boje.



Slika 13. Proizvodnja vodonik peroksida (zeleno plava boja označena žutom strelicom) u kulturama humanih vaginalnih izolata.

Kao što se može videti na slici 13, među humanim vaginalnim izolatima analiziranim u ovoj studiji ima 11 proizvođača H_2O_2 i to izolati BGHV1', BGHV252K, BGHV29, BGHV54, BGHV54K, BGHV55, BGHV105, BGHV224, BGHV389, BGHV425 i BGHV954. Iako metoda koja je u ovom radu korišćena za detekciju proizvođača H_2O_2 nije kvantitativna, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da među proizvođačima

postoje razlike u proizvodnji ovog jedinjenja s obziroma da se intenzitet plave boje kolonija razlikuje među BGHV izolatima.

4.3. MINIMALNA INHIBITORNA KONCENTRACIJA (MIK) ANTIBIOTIKA

4.3.1. Test makrodilucije

MIK predstavlja najnižu koncentraciju antibiotika pri kojoj se ne opaža rast bakterijske kulture koja se testira nakon 48 sati rasta u odgovarajućim uslovima. Ova vrednost služi da bi se određeni bakterijski izolat definisao kao rezistentan odnosno osetljiv na delovanje određenog antibiotika. Smatra se da je bakterija rezistentna na dati antibiotik ako joj je utvrđen MIK iznad preporučene granične vrednosti za dati antibiotik i za vrstu kojoj ta bakterija pripada. Za laktobacile još uvek nisu u potpunosti definisane ove vrednosti i zato se u studijama trenutno koriste preporučene granične vrednosti koje će se vremenom verovatno menjati. Da bismo utvrdili stepen osetljivosti 39 humanih vaginalnih izolata na šest antibiotika (ampicilin, tetraciklin, eritromicin, gentamicin, streptomycin i vankomicin) pristupili smo njihovom testiranju pomoću metode makrodilucije. Ova metoda podrazumeva da se bakterijski soj gaji u MRS medijumu u koji su dodavane rastuće koncentracije antibiotika (od 0,5 do 256 µg/ml).

U MRS medijumu ampicilin je imao inhibitorno dejstvo na rast kultura svih izolata već pri koncentracijama od 1 µg/ml što predstavlja vrednost ispod mikrobioloških graničnih koncentracija za ovaj antibiotik (4 µg/ml). Većina izolata humanih vaginalnih laktobacila (n=35) su bili rezistentni na eritromicin (MIK ≥ 16 µg/ml), među kojima je 17 izolata sa visokim stepenom fenotipske rezistencije na ovaj antibiotik (MIK ≥ 256 µg/ml). Samo 4 izolata laktobacila pokazivali su MIK manji od preporučene granične vrednosti za eritromicin („breakpoint value”) od ≤ 4 µg/ml. U MRS medijumu sa tetraciklinom svi *Lb. fermentum*

izolati imali su MIK ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ što je iznad granične vrednosti i označeni su kao izolati rezistentni na ovaj antibiotik. S druge strane, fenotipska rezistencija na tetraciklin nije zabeležena kod *Lb. plantarum* (granična vrednost iznosi 64 $\mu\text{g/ml}$) i *Lb. rhamnosus* izolata, tj. svi izolati pripadnici ovih vrsta su bili osetljivi već pri koncentracijama antibiotika od 2 $\mu\text{g/ml}$ (za *Lb. rhamnosus*) odnosno 16 i 32 $\mu\text{g/ml}$ (za *Lb. plantarum*). Za četiri izolata vrednosti MIK-ova za gentamicin bili su iznad granične vrednosti za rezistenciju (128 $\mu\text{g/ml}$) dok su ostali (n=35) označeni kao osetljivi na ovaj antibiotik. Na osnovu ove analize svi ispitivani izolati (n=39) su pokazivali su izuzetno visok stepen rezistencije na streptomycin (MIK ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$) kao i na vankomicin (MIK ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$) (Tabela 6).

Tabela 6. Vrednosti MIK-ova za humane vaginalne laktobacile u MRS medijumu, određene metodom makrodilucije.

Antibiotik	Vrsta	MIK ($\mu\text{g/ml}$)									n	GV*
		≤ 1	2	4	8	16	32	64	128	≥ 256		
Ampicilin	<i>Lb. rhamnosus</i>	17									17	4
	<i>Lb. plantarum</i>	11									11	4
	<i>Lb. fermentum</i>	11									11	4
Eritromicin	<i>Lb. rhamnosus</i>					2	2	1	3	9	17	4
	<i>Lb. plantarum</i>		2			3			2	4	11	4
	<i>Lb. fermentum</i>		2				1		4	4	11	4
Gentamicin	<i>Lb. rhamnosus</i>					2	3	10	1	1	17	128
	<i>Lb. plantarum</i>				2	3	1	4	1		11	128
	<i>Lb. fermentum</i>				4	1	2	2	1		11	128
Tetraciklin	<i>Lb. rhamnosus</i>	17									17	4
	<i>Lb. plantarum</i>					1	10				11	64
	<i>Lb. fermentum</i>				3	4	4				11	4
Streptomycin	<i>Lb. rhamnosus</i>									17	17	128
	<i>Lb. plantarum</i>									11	11	128
	<i>Lb. fermentum</i>									11	11	128
Vankomicin	<i>Lb. rhamnosus</i>									17	17	4
	<i>Lb. plantarum</i>									11	11	4
	<i>Lb. fermentum</i>									11	11	4

n= ukupan broj testiranih izolata

*- privremene granične vrednosti na osnovu Danielsen and Wind (2003)

4.3.2. Test mikrodilucije

U dosadašnjim radovima pokazano je da sastav medijuma za gajenje bakterija utiče na ishod rezultata testiranja antibiotske rezistencije. Na osnovu studije Klare i saradnika (2005), LSM medijum je predložen kao optimalni medijum za gajenje laktobacila kada se testira njihova antibiotska osetljivost/rezistencija. LSM medijum predstavlja mešavinu Iso-Sensitest (90%, v/v) i MRS medijuma (10% v/v). U tom cilju u ovom radu pristupili smo utvrđivanju MIK vrednosti za 39 humanih vaginalnih izolata u LSM medijumu pomoću testa mikrodilucije. Opseg koncentracija antibiotika koji su se nalazili u bunarčićima mikrotitar ploča u ovom testu bio je od 0,5 µg/ml do 64 µg/ml, osim za streptomycin i gentamicin gde je ovaj opseg bio širi tj. od 1-256 µg/ml.

Rezultati antibiotske osetljivosti za izolate koji su gajeni u LSM medijumu pokazali su da kao i u MRS medijumu, svi BGHV pokazuju osetljivost na ampicilin. Dodatno, vidi se da je svih 11 izolata *Lb. plantarum* i devet izolata *Lb. fermentum* bilo osetljivo na eritromicin (MIK ≤ 0,5 µg/ml) što je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim kada je MRS korišćen kao medijum za gajenje bakterija. S druge strane, preostalih 19 izolata uključujući sve *Lb. rhamnosus* i dva *Lb. fermentum* izolata, bili su rezistentni na eritromicin (MIK ≥ 16 µg/ml). Rezultati dobijeni nakon rasta bakterija u LSM medijumu sa tetraciklinom bili su slični rezultatima dobijenim u MRS medijumu sa tetraciklinom. Svi *Lb. fermentum* izolati bili su rezistentni na tetraciklin (MIK ≥ 8 µg/ml), dok nijedan *Lb. plantarum* kao ni *Lb. rhamnosus* nisu pokazivali rezistenciju na navedeni antibiotik. Za razliku od testova izvedenih u MRS medijumu, u LSM medijumu nijedan izolat nije pokazivao rezistenciju na gentamicin i vrednosti MIK-ova nisu prelazile 4 µg/ml što je ispod granične vrednosti koncentracije antibiotika koja označava rezistencije na dati antibiotik. U slučaju kada je korišćen LSM

medijum sa vankomicinom, za sve izolate rezultati su bili slični rezultatima dobijenim za MRS medijum sa vankomicinom (MIK ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$). Međutim, nakon rasta bakterija u LSM medijumu sa streptomycinom vrednosti MIK-ova varirale su u širem opsegu nego nakon rasta izolata u MRS medijumu sa streptomycinom (Tabela 7).

Tabela 7. Vrednosti MIK-ova za humane vaginalne laktobacile u LSM medijumu, određene metodom mikrodilucije.

Antibiotik	Vrsta	MIK ($\mu\text{g/ml}$)								n	GV*
		≤ 0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 256		
Ampicilin	<i>Lb. rhamnosus</i>		8	9						17	4
	<i>Lb. plantarum</i>	7	4							11	4
	<i>Lb. fermentum</i>	5	6							11	4
Eritromicin	<i>Lb. rhamnosus</i>						17			17	4
	<i>Lb. plantarum</i>	11								11	4
	<i>Lb. fermentum</i>	9					2			11	4
Gentamicin	<i>Lb. rhamnosus</i>	1	15	1						17	128
	<i>Lb. plantarum</i>	5	6							11	128
	<i>Lb. fermentum</i>		7	2	2					11	128
Tetraciklin	<i>Lb. rhamnosus</i>		1	16						17	4
	<i>Lb. plantarum</i>						1	10		11	64
	<i>Lb. fermentum</i>					2	9			11	4
Streptomycin	<i>Lb. rhamnosus</i>								17	17	128
	<i>Lb. plantarum</i>				2	3	6			11	128
	<i>Lb. fermentum</i>						4	1	6	11	128
Vankomicin	<i>Lb. rhamnosus</i>								17	17	4
	<i>Lb. plantarum</i>								11	11	4
	<i>Lb. fermentum</i>								11	11	4

n= ukupan broj testiranih izolata

*- privremene granične vrednosti na osnovu Danielsen and Wind (2003)

4.3.3. E test

Na osnovu rezultata dobijenih u testovima makrodilucije i mikrodilucije (Tabele 6 i 7) pet humanih vaginalnih *Lb. rhamnosus* izolata (BGHV1', BGHV20, BGHV29, BGHV389 i BGHV719) kategorizovani su kao visoko rezistentni na eritromicin (MIK ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$). Ovi izolati odabrani su za dodatno testiranje rezistencije na eritromicin pomoću E testa. Za sve

izolate potvrđen je visok stepen rezistencije na eritromicin (MIK >256 µg/ml) iako su detektovane razlike u brzini reakcije između izolata. Za izolate *Lb. rhamnosus* BGHV1', BGHV20, BGHV389 i BGHV719 rezistencija na eritromicin bila je očigledna nakon 24 sata što se videlo iz pojave jasne zone inhibicije na Petri šoljama. S druge strane, za soj BGHV29 detektovano je sporije formiranje svetle zone inhibicije koja je bila očigledna tek nakon 48 sati (Tabela 8).

Tabela 8. MIK-ovi dobijeni na osnovu E testa nakon 24 i 48 sati gajenja humanih vaginalnih izolata u LSM medijumu sa eritromicinom.

Izolat	Vrsta	MIK (µg/ml)	
		24h	48h
BGHV1'	<i>Lb. rhamnosus</i>	>256	>256
BGHV20	<i>Lb. rhamnosus</i>	>256	>256
BGHV29	<i>Lb. rhamnosus</i>	>125	>256*
BGHV389	<i>Lb. rhamnosus</i>	>256	>256
BGHV719	<i>Lb. rhamnosus</i>	>256	>256

* Izolat koji pokazuje jasnu zonu inhibicije nakon 48 sati

4.3.4. Uticaj različitih šećera na stepen rezistencije izolata *Lb. rhamnosus* BGHV719

Pokazano je da različiti konstituenti medijuma za gajenje bakterija imaju uticaj na krajnje rezultate testiranja osetljivosti bakterija na antibiotike. U ovom radu je pokazano da postoje razlike u MIK vrednostima dobijenim za BGHV izolate gajene u MRS i LSM medijumima kao i da različiti medijumi korišćeni u ovom radu utiču na površinske osobine sojeva BGHV719 i BGHV954. Da bi se proučio uticaj medijuma kao i šećera na površinske osobine soja BGHV719 koje mogu da dovedu do promena osetljivosti ovog soja na

antibiotike pristupili smo daljoj analizi. U tom cilju MRS medijum kao i modifikovani MRS medijum u koji su dodavani različiti šećeri, glukoza (obeležen kao Mglu), fruktoza (Mfru), manosa (Mman), ramnoza (Mram), laktoza (Mlac), saharoza (Msuc) i celobioza (Mcel) inokulisani su sa 0,5% prekonocne kulture (16 sati). Inkubacija bakterija je trajala 24 sata u prisustvu i odsustvu određenog antibiotika (Tabela 9) nakon čega je određivan ukupan broj bakterija (CFU/ml). Vrednosti prikazane u tabeli dobijene su poređenjem broja preživelih bakterija u medijumu sa antibiotikom u odnosu na broj živih bakterija u istom medijumu bez antibiotika.

U Tabeli 9 prikazani su rezultati uticaja sastava medijuma na preživljavanje soja *Lb. rhamnosus* BGHV719 u prisustvu tri različita antibiotika: eritromicina, gentamicina i vankomicina. Kao što se može videti u MRS medijumu sa eritromicinom 94% bakterija preživljava koncentraciju od 16 µg/ml, dok je stepen preživljavanja bakterija u modifikovanim MRS medijumima bio između 60% i 85,1% u zavisnosti od šećera koji je korišćen kao izvor ugljenika. S druge strane, u prisustvu gentamicina, najveće razlike u preživljavanju uočene su između rasta BGHV719 u MRS medijumu i modifikovanih MRS medijume u kojima je preživljavanje značajno redukovano. Maksimalno preživljavanje soja BGHV719 u modifikovanom medijumu sa gentamicinom zabeleženo je kada je glukoza korišćena kao izvor šećera (21,9%). Sastav medijuma kao i šećeri nisu imali uticaj na stepen preživljavanja ovog soja u prisustvu vankomicina - procenat preživljavanja ovog soja bio između 95,9% i 97,5% u svim ispitivanim medijumima.

Tabela 9. Preživljavanja bakterija soja *Lb. rhamnosus* BGHV719 nakon 24 sata rasta u osam različitih medijuma u prisutstvu tri antibiotika.

Medijum	antibiotik		
	eritromicin (16 µg/ml)	gentamicin (100 µg/ml)	vankomicin (200 µg/ml)
MRS	94%	92,5%	97,5%
Mglu	82,3%	21,9%	97,1%
Mfru	76,7%	7,5%	95,9%
Mman	85,1%	11,1%	96,9%
Mram	66,0%	5,5%	97,2%
Msuc	82,5%	7,8%	96,8%
Mlac	60,0%	6,0%	96,7%
Mcel	74,0%	10,2%	96,9%

Vrednosti u Tabeli 9 predstavljaju procenat preživelih bakterija.

4.4. MOLEKULARNA OSNOVA REZISTENCIJE BGHV IZOLATA

4.4.1. Detekcija gena odgovornih za rezistenciju na eritromicin i tetraciklin PCR metodom

Da bismo utvrdili da li je fenotipska rezistencija na eritromicin i tetraciklin, koja postoji u određenim BGHV izolatima, povezana sa prisustvom gena koji obezbeđuju imunost na date antibiotike korišćena je PCR metoda. Ukupna DNK izolovana iz pojedinačnog izolata služila je kao matrica u PCR reakcijama gde su korišćeni prajmeri poreklom iz gena koji obezbeđuju imunost na tetraciklin (*tetK* i *tetL*) i eritromicin (*ermA*, *ermB*, *ermC*). U ovim eksperimentima korišćeni su takođe i izrođeni prajmeri DI i DII koji služe za detekciju grupe *tet* gena koja obuhvata *tetM*, *tetO* i *tetS* gene koji kodiraju proteine za protekciju ribozoma

(RPP). Zahvaljujući monofiletskom poreklu *tet* gena testirani izolati su provereni i na prisustvo svih do sada poznatih grupa gena koji kodiraju RPP (*tetB/P*, *tetM*, *tetO*, *tetA*, *tetQ*, *tetS*, *tetT*, *tetW*) osim *OtrA*, pomoću Ribo2-FV i Ribo2-RV prajmera.

Rezultati PCR analiza pokazali su da nijedan od ispitivanih gena koji obezbeđuju rezistenciju na tetraciklin i eritromicin nisu detektovani u ispitivanim humanim vaginalnim izolatima. PCR signali dobijeni su samo za pozitivne kontrole odnosno plazmide koji sadrže gene koji obezbeđuju rezistenciju na odgovarajući antibiotik (videti Tabelu 4).

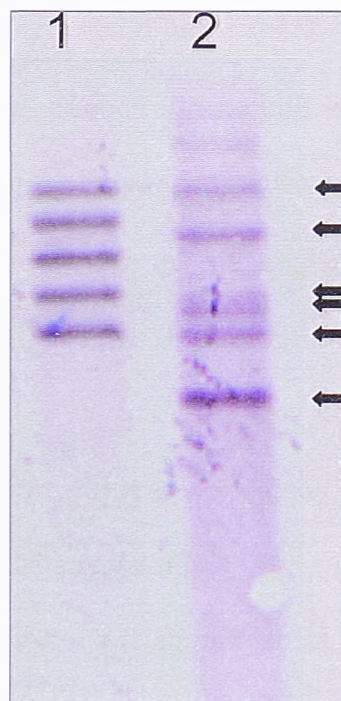
4.4.2. Određivanje broja rRNK operona u *Lb. rhamnosus* BGHV719

Dosadašnja istraživanja pokazala su da broj kopija gena za 23S rRNK varira kako među bakterijskim rodovima tako i među vrstama u okviru istog roda. Za sada, jedini izvor podataka koji se odnose na broj kopija i veličinu molekula 23S rRNK u laktobacilima, predstavljaju objavljene sekvence kopletnih genoma određenih laktobacila (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Za određivanje broja kopija gena za 23S rRNK u *Lb. rhamnosus* korišćena je metoda DNK/DNK hibridizacije. Odabran soj *Lb. rhamnosus* BGHV719, pokazivao je visok stepen rezistencije na eritromicin na osnovu testa makrodilucije (MIK ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$), mikrodilucije (MIK ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$) i E testa (MIK ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$). Ovaj soj je korišćen u daljoj analizi molekularne osnove eritromicinske rezistencije. Kako genom *Lb. rhamnosus* još uvek nije sekvenciran, kao matrica za dobijanje specifične probe za DNK/DNK hibridizaciju korišćen je soj *Lb. casei* ATCC 334. Vrsta *Lb. casei* je filogenetski najbliža vrsti *Lb. rhamnosus* i njena kompletna genomska sekvenca je objavljena. Na osnovu sekvence utvrđeno je da *Lb. casei* ATCC 334 poseduje pet kopija gena za 23S rRNK.

Totalne DNK izolovane iz sojeva *Lb. casei* ATCC 334 i *Lb. rhamnosus* BGHV719 isečene su *KpnI* restrikcionim enzimom i dobijeni fragmenti razdojeni su na 1% agaroznom gelu. Specifična proba dobijena je u PCR reakciji umnožavanjem totalne DNK izolovane iz soja *Lb. casei* ATCC334 uz pomoć prajmera 23SlcF2 i 23SlcR2 koji umnožavaju fragment veličine 429 bp u okviru 23S rDNK ovog soja. Hibridizacija i pranje rađeni su na restriktivnoj temperaturi od 65°C.

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da sa specifičnom probom hibridizuje šest fragmenata poreklom iz soja *Lb. rhamnosus* BGHV719 i pet fragmenata poreklom iz soja *Lb. casei* ATCC 334 (Slika 14). Dodatne dve trake znatno slabijeg intenziteta dobijene u oba slučaja nisu uzete u analizu.



Slika 14. DNK/DNK hibridizacija totalnih DNK poreklom iz *Lb. casei* ATCC 334 (kolona 1) i *Lb. rhamnosus* BGHV719 (kolona 2) sečenih sa *KpnI* restrikcionim enzimom. Kao proba u eksperimentu korišćen je 429 bp fragment poreklom iz 23S rRNK gena soja *Lb. casei* ATCC 334. Strelice označavaju pozitivni signal dobijen u hibridizaciji za *Lb. rhamnosus* BGHV719.

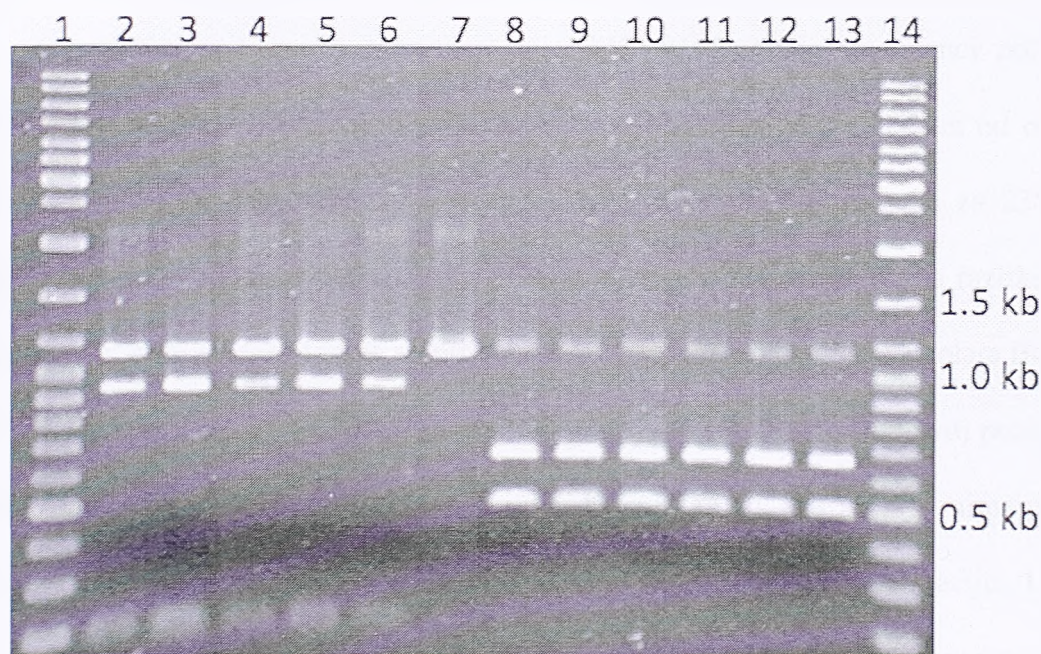
4.4.3. Tranziciona mutacija A2058→G2058

U literaturi je poznato da tranziciona mutacija A→G na poziciji 2058 (po numerisanju *E. coli*) u okviru gena za 23S rRNK kreira dodatno *BbsI* restrikciono mesto u okviru ovog gena. Pokazano je takođe da ova tranziciona mutacija obezbeđuje rezistenciju na makrolide u bakterijama. S obzirom da su PCR eksperimenti pokazali da u BGHV izolatima *ermA*, *ermB* i *ermC* geni nisu odgovorni za fenotipsku rezistenciju na eritromicin, pristupili smo analizi prisustva tranzicione mutacije u okviru A nukleotida na pozicija 2058 u okviru gena za 23S rRNK *Lb. rhamnosus*.

Odabrani *Lb. rhamnosus* izolati BGHV1', BGHV20, BGHV29, BGHV389 i BGHV719, pokazivali su visok stepen eritromicinske rezistencije na osnovu testova makrodilucije (MIK ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$) i mikrodilucije (MIK ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$). Dodatno određivanje MIK-ova za ove izolate urađeno je pomoću E-testa koji je potvrdio dobijene rezultate (MIK ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$) (Tabela 8). Kao kontrola korišćen je eritromicin senzitivni soj *Lb. rhamnosus* LMG 8153. Za navedene sojeve urađena je restrikciona analiza sa *BbsI* enzimom gde je kao matrica korišćen PCR fragment veličine 1,2 kb (R amplikon). Ovaj fragment dobijen je PCR-om gde je totalna DNK, izolovana iz navedenih sojeva, korišćena u reakciji umnožavanja sa 1104f i 2241r prajmerima (Tabela 4). Prisustvo dodatnog *BbsI* restrikcionog mesta utvrđeno je kod svih analiziranih eritromicin rezistentnih *Lb. rhamnosus* izolata, gde je na gelu detektovana dodatna traka nakon sečenja R amplikona sa *BbsI* enzimom (Slika 15). S druge strane, odsustvo dodatne trake u slučaju R amplikona poreklom od kontrolnog *Lb. rhamnosus* LMG 8153 pokazuje da kod eritromicin senzitivnog soja ne postoji promena u okviru A nukleotida na pozicija 2058. Na osnovu dobijenih rezultata se vidi da između izolata postoji razlika u intenzitetu traka nastalih sečenjem sa *BbsI* enzimom iako je količina R amplikona

stavljena u digestiju bila jednaka u svim slučajevima. Sa druge strane, intenzitet traka dobijenih u kontrolnoj digestiji sa *Hind*III enzimom bio je identičan u svim reakcijama.

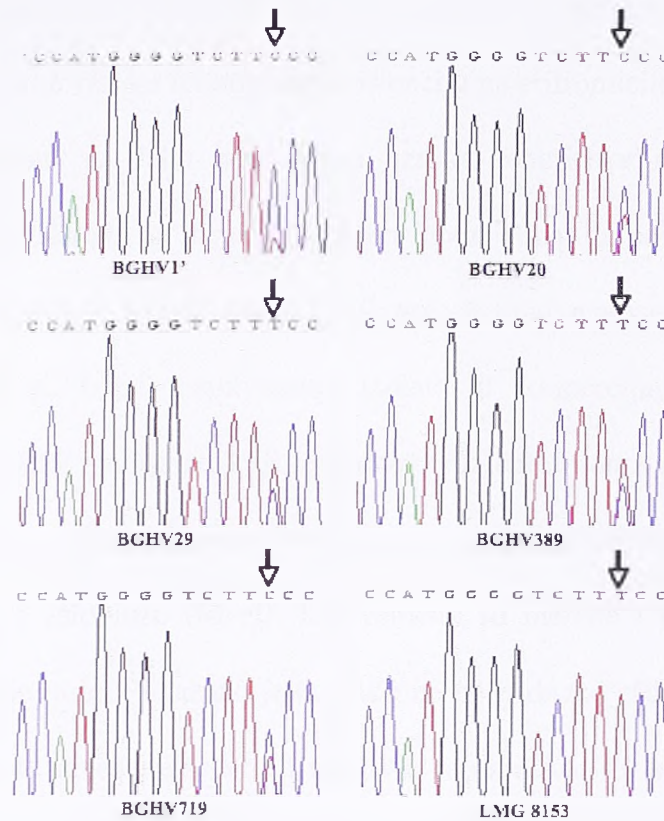
Najintenzivniji signali *Bbs*I enzimom sečenih traka dobijeni su za R amplikone poreklom iz *Lb. rhamnosus* izolata BGHV20 i BGHV389. Nešto slabije trake nastale sečenjem R amplikona sa *Bbs*I enzimom detektovane su za izolate *Lb. rhamnosus* BGHV1', BGHV29 i BGHV719.



Slika 15. Restrikcioni profili R amplikona dobijenih nakon sečenja sa *Bbs*I (kolone 2-7) i *Hind*III (kolone 8-13) enzimima poreklom iz eritromicin rezistentnih humanih vaginalnih izolata laktobacila: 2 i 8 - *Lb. rhamnosus* BGVH1', 3 i 9 - *Lb. rhamnosus* BGVH20, 4 i 10 - *Lb. rhamnosus* BGVH29, 5 i 11, - *Lb. rhamnosus* BGVH389, 6 i 12 - *Lb. rhamnosus* BGVH719, 7 i 13 - *Lb. rhamnosus* LMG 8153. Kolona 1 i 14, 100 bp molekularni standard (Fermentas GMBH, St. Leon-Rot, Germany).

4.4.4. Sekvenciranje R amplikona poreklom iz gena za 23S rRNK

Da bi potvrdili prisustvo tranzicione mutacije A→G na poziciji 2058 u okviru gena za 23S rRNK sekvencirani su R amplikoni gena za 23S rRNK testiranih *Lb. rhamnosus* izolata: BGHV1', BGHV20, BGHV29, BGHV389, BGHV719 i LMG 8153. Analiza dobijenih sekvenci potvrdila je prisustvo tačkaste mutacije u V domenu gena za 23S rRNK kod svih sekvenciranih R amplikona koji potiču od eritromicin rezistentnih izolata (Slika 16). S druge strane, za kontrolni eritromicin senzitivni soj LMG 8153, analiza sekvenci pokazala je odsustvo date mutacije na poziciji 2058. Pored toga, pokazano je da nijedan od odabranih izolata nije rezistentni homozigot tj. ne sadrži samo mutirane kopije gena za 23S rRNK. Dodatno, intenzitet heterozigotnosti sekvenci na poziciji A2058 ukazuje i na razlike u broju mutiranih gena. Analiza sekvenci R amplikona poreklom iz *Lb. rhamnosus* izolata BGHV29 i BGHV389 pokazala je postojanje mešovitog signala za A i G nukleotid na ovoj poziciji kao i da A2058 signal ima jači intenzitet. Nasuprot ovim rezultatima, u R amplikonima poreklom iz izolata BGHV20 i BGHV719 jači signal se detektuje za G2058 mutaciju. U okviru sekvence R amplikona poreklom iz *Lb. rhamnosus* BGHV1' uočava se najveća razlika između signala za A2058 (slab signal) u odnosu na G2058 (jak signal).



Slika 16. Hromatogrami sekvenci dela R amplikona u okviru 23S rDNK dobijenih u PCR-u sa totalnom DNK izolovanom iz *Lb. rhamnosus* izolata BGHV1', BGHV20, BGHV29, BGHV389 BGHV719 i LMG 8153. Strelice označavaju nukleotide u okviru gena za 23S rRNK koji odgovaraju poziciji A2058 (T2058).

4.5. UTICAJ RAZLIČITIH ŠEĆERA NA POVRŠINSKE OSOBINE IZOLATA

Lb. rhamnosus BGHV719

4.5.1. Utvrđivanje broja živih ćelija i pH vrednosti kultura humanog vaginalnog izolata *Lb. rhamnosus* BGHV719 gajenog u različitim medijumima

Rezultati testiranja antibiotske rezistencije BGHV izolata ukazali su na uticaj medijuma koji se koristi za gajenje bakterija na dobijene MIK vrednosti za neke antibiotike (gentamicin i eritromicin). S druge strane, u BGHV sojevima rezistentnim na eritromicin nije

detektovano prisustvo *ermA*, *ermB* i *ermC* gena. S obzirom da je soj *Lb. rhamnosus* BGHV719 pokazivao visoku fenotipsku rezistenciju na eritromicin, gentamicin i vankomicin, ovaj soj je odabran za dalja istraživanja uzroka fenotipske rezistencije, pre svega na eritromicin. Da bi utvrdili da li različiti šećeri imaju uticaj na površinske osobine humanog vaginalnog izolata *Lb. rhamnosus* BGHV719, prvo je urađen eksperiment u kome je utvrđena efikasnost rasta (CFU/ml) ispitivanog izolata u komercijalnom MRS medijumu i modifikovanom MRS medijumu koji je sadržao različite monosaharide, glukozu (obebežen kao Mglu), fruktozu (Mfru), manozu (Mman) i ramnozu (Mram) i disaharide, laktozu (Mlac), saharozu (Msuc) i celobiozu (Mcel). Istovremeno su merene i pH vrednosti medijuma u kojima su bakterije rasle. Pokazano je da, iako ne podjednako efikasno, ovaj soj za svoj rast može da koristi sve navedene šećere. Broj živih ćelija nakon 20 sati rasta varirao je između $8,1 \times 10^7$ i $4,3 \times 10^9$ CFU/ml u zavisnosti od šećera koji je dodavan u medijum, pri čemu je najslabiji rast zabeležen kada su bakterije rasle u prisustvu celobioze (Tabela 10). Početna pH vrednost inokulisanog medijuma iznosila je u svim slučajevima 6,8 i nakon 20 sati rasta bakterija izmerena pH vrednost se razlikovala u zavisnosti od šećera koji je bakterija koristila za rast. Izmerena pH vrednost kultura varirala je između 5,0 i 4,30 izuzev u slučaju Mcel medijuma u kome je pH vrednost neznatno promenjena što je u skladu sa uočenim slabim rastom ovog soja u prisustvu celobioze (Tabela 10).

Tabela 10. Broj živih ćelija (CFU/ml) i pH vrednosti dobijene nakon gajenja izolata *Lb. rhamnosus* BGHV719 u osam različitih medijuma.

Medijum	CFU/ml	pH vrednost
MRS	$4,3 \times 10^9$	4,36
Mglu	$2,1 \times 10^9$	4,68
Mfru	$2,4 \times 10^9$	4,75
Mman	$3,3 \times 10^8$	4,30
Mram	$5,6 \times 10^8$	5,40
Msuc	$2,0 \times 10^9$	4,80
Mlac	$8,4 \times 10^8$	4,40
Mcel	$8,1 \times 10^7$	6,32

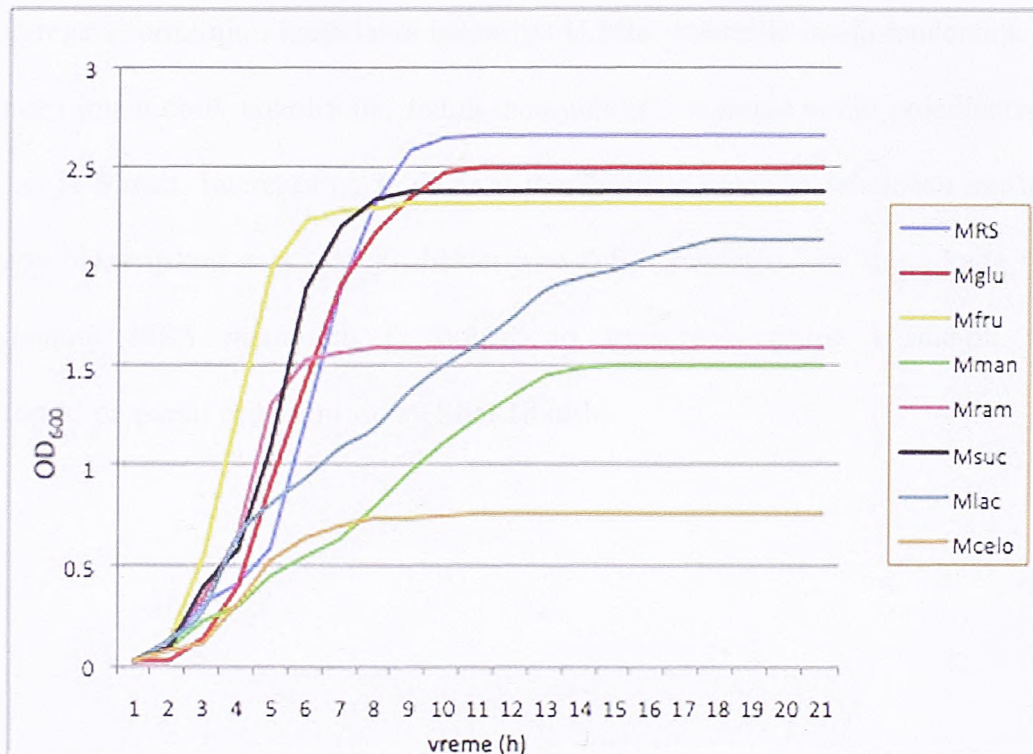
Vrednosti u tabeli predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja.

4.5.2. Kriva rasta humanog vaginalnog izolata *Lb. rhamnosus* BGHV719 u različitim medijumima za rast

Da bismo precizno utvrdili brzinu rasta soja BGHV719 u različitim medijumima, 0.1% inokulum prekonoćne kulture bakterija zasejavan je u svež komercijalni MRS medijum kao i u modifikovane MRS medijume. Nakon zasejavanja, bakterije su gajene aerobno na temperaturi od 37°C. Rast bakterija je praćen tokom narednih 20 sati, merenjem promene optičke gustine bakterijske kulture na talsnoj dužini od 600 nm (OD_{600}) na svakih sat vremena (Slika 17).

Tokom rasta u MRS medijumu i modifikovanom MRS medijumu sa dodatkom različitih šećera, bakterijske kulture su dostizale stacionarnu fazu između 8 i 17 sati. U različitim medijumima su takođe zapažene značajne razlike u trajanju lag faze rasta bakterijskih kultura. Lag faza je najkraće trajala u slučaju kada su bakterije gajene u MRS-u, Mglu, Mfru, Msuc, Mram i Mcel iako su se vrednosti OD_{600} u momentu ulaska u stacionarnu

fazu značajno razlikovale između ovih bakterijskih kultura. Za bakterijske kulture gajene u Mlac i Mman lag faza je značajno produžena. Najmanja vrednost OD₆₀₀ zabeležena je kada je bakterija rasla u Mcel što je u skladu sa prethodno dobijenim rezultatima određivanja broja živih ćelija u kulturi nakon 20 sati rasta.



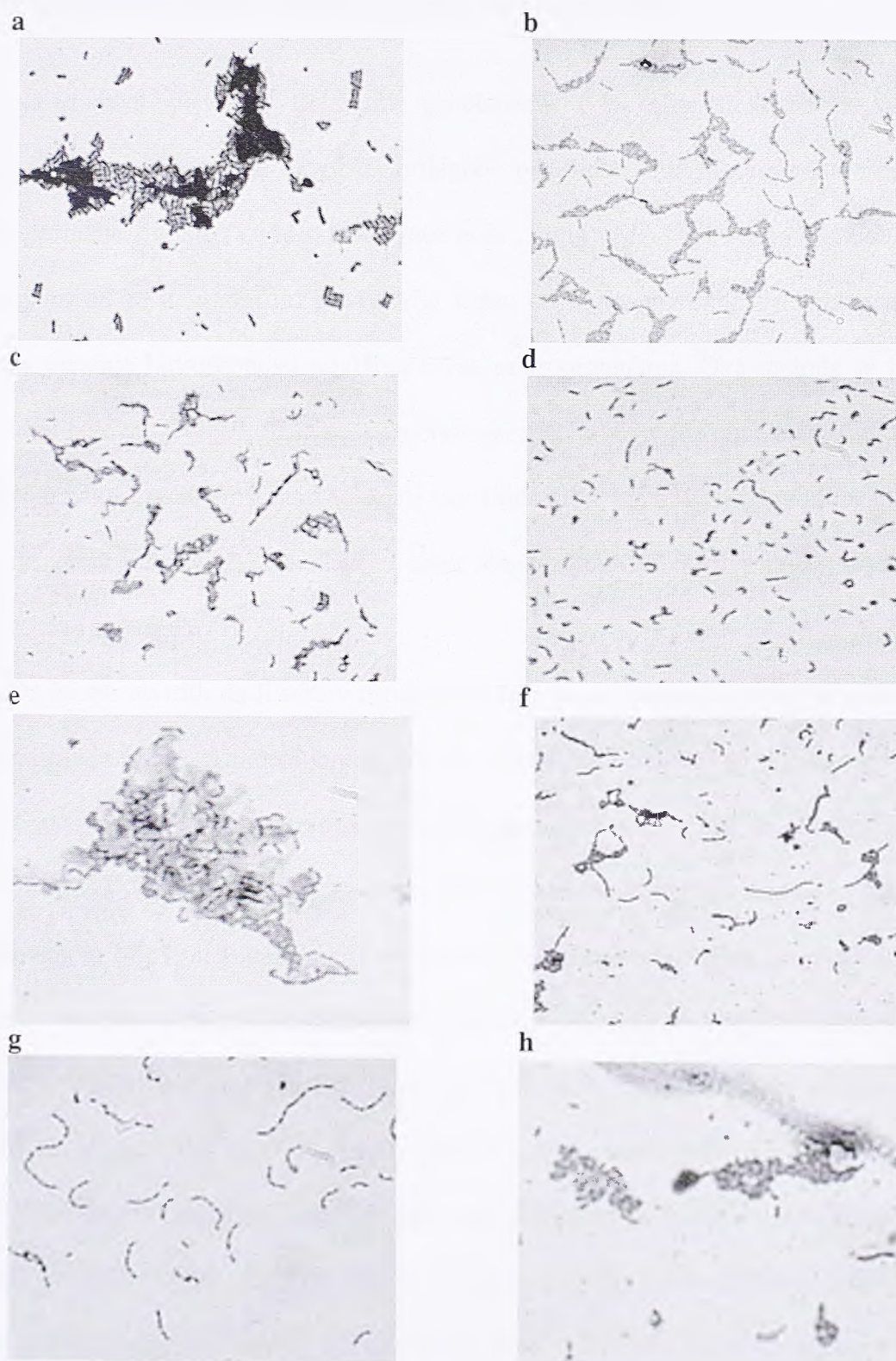
Slika 17. Kriva rasta *Lb. rhamnosus* soja BGHV719 u MRS-u i modifikovanim MRS medijumima sa dodatkom različitih šećera (OD₆₀₀).

4.5.3. Morfologija bakterijskih ćelija soja *Lb. rhamnosus* BGHV719

Pokazano je da promene u dostupnosti određenih nutrijenata iz okruženja dovode do izmena u morfologiji, veličini ćelija kao i sastava ćelijskog zida bakterija.

Da bi utvrdili da li sastav medijuma kao i različiti šećeri koji se koriste za rast bakterija imaju uticaj na promenu oblika ćelija i na formiranje agregata, bakterije su nakon gajenja u odgovarajućem medijumu posmatrane pod mikroskopom. Ako se uporede ćelije

gajene u MRS medijumu gde se mogu videti grupe i agregati laktobacila, kada se gaje u modifikovanom Mglu medijumu može se videti da ovaj soj ima tendenciju da formira znatno veće agregate koji su međusobno povezani. Najveći agregati (vidljivi i golim okom u epruveti) se formiraju kada se kao izvor šećera koristi ramnoza. U Mfru i Msuc se pored manjih agregata formiraju i kraći lanci bakterija. U Mlac bakterije imaju tendenciju da prave duge lance i imaju oblik kokobacila. Jedini medijum gde se mogu uočiti pojedinačni bacili i kraći lanci je Mman. Interesantno je da se u medijumu u kome je zabeležen najslabiji rast ispitivanog bakterijskog soja - Mcel, bakterijske ćelije ponašaju isto kao i kada se gaje u komercijalnom MRS medijumu tj. dolazi do formiranja grupa i manjih agregata. Mikroskopski preparati prikazani su na Slici 18 (a-h).



Slika 18. Mikroskopski preparati bakterijskih ćelija *Lb. rhamnosus* BGHV719 koji su rasli u osam različitih medijuma. a-MRS; b-Mglu; c-Mfru; d-Mman; e-Mram; f-Msuc; g-Mlac; h-Mcel.

4.5.4. Hidrofobnost površine ćelija *Lb. rhamnosus* BGHV719

Na osnovu podataka dobijenih proučavanjem površinskih osobina laktobacila pokazano je da ove bakterije mogu da prilagode površinsku hidrofobnost kao odgovor na različite promene sredine (Vadillo-Rodríguez *et al.*, 2004). MATH metoda (metoda adhezije mikroorganizma za heksadekan) predstavlja jednu od najrasprostranjenijih metoda koja se koristi za merenje hidrofobnosti površine ćelije mikroorganizma. Ova metoda se bazira na određivanju procenta ćelija koji se veže za organski rastvarač (hidrofobne bakterije) u odnosu na procenat bakterija koje ostaju u vodenoj fazi (hidrofilne bakterije). U ovom eksperimentu je kao rastvarač korišćen heksadekan, a mere stepena hidrofobnosti soja definisane su od strane Ocaña i saradnika (1999).

Da bismo utvrdili da li sastav medijuma kao i različiti šećeri u modifikovanom MRS medijumu imaju uticaj na hidrofobnost soja *Lb. rhamnosus* BGHV719 izmerene su MATH vrednosti nakon 16 sati rasta u ispitivanim medijumima, gde su sve kulture ušle u stacionarnu fazu rasta (Slika 17 i Tabela 11). Promena MATH vrednosti dobijena kada je soj gajen u modifikovanom MRS medijumu u odnosu na MATH vrednost dobijenu za soj gajen u MRS medijumu predstavlja stepen smanjenja hidrofobnosti soja (% redukcije). Iz tabele se može videti da se u MRS medijumu relativno mali procenat (34%) bakterija vezuje za ovaj nepolarni rastvarač, ukazujući na nizak stepen hidrofobnosti soja. Na osnovu rezultata MATH testa, stepen smanjenja hidrofobnosti u različitim modifikovanim medijumima bio je u opsegu od 18% (Mglu) do 50% (Mlac). Najveće smanjenje hidrofobnosti zabeleženo je kada su bakterije gajene u Mman, Mram i Mlac. Iako je u MRS i Mglu medijumu kao izvor šećera prisutna glukoza, dobijene MATH vrednosti se razlikuju što ukazuje da i neke druge komponente samog medijuma imaju uticaj na stepen hidrofobnosti soja. U Tabeli 11

predstavljene su promene MATH vrednosti (stepen hidrofobnosti) za soj *Lb. rhamnosus* BGHV719 gajenog u različitim medijumima za rast u odnosu na izmerenu hidrofobnost soja gajenog u MRS medijumu.

Tabela 11. Promene MATH vrednosti soja *Lb. rhamnosus* BGHV719 gajenog u osam različitih medijuma.

medijum	MATH vrednost	hidrofobnost	redukcija hidrofobnosti (%)
MRS	34	L	0
Mglu	28	L	18
Mfru	23	L	32
Mman	20	L	41
Mram	19	L	44
Msuc	25	L	26
Mlac	17	L	50
Mcel	24	L	29

L – označava nizak stepen hidrofobnosti.

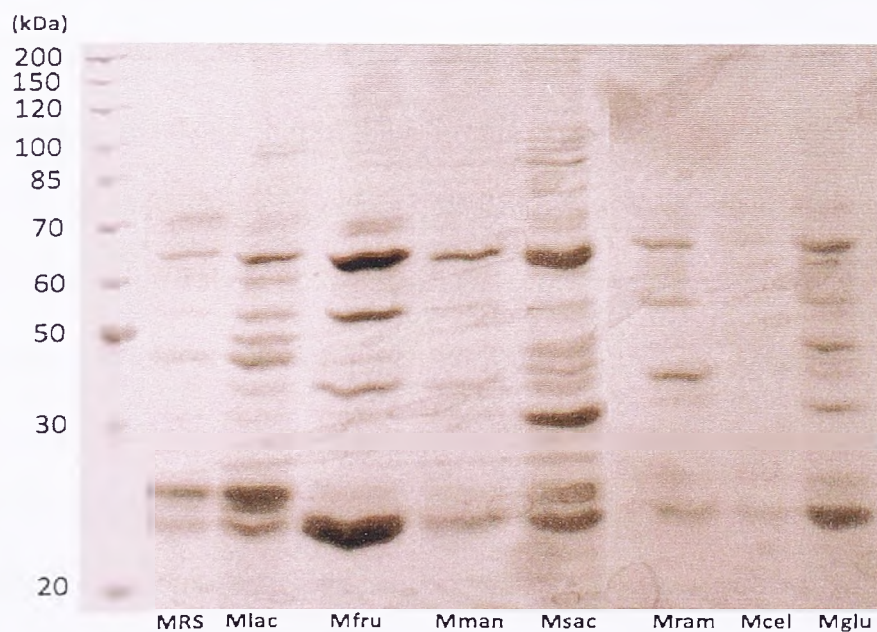
Vrednosti prikazane u Tabeli 11 predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja.

4.5.5. Proteini ćelijskog zida *Lb. rhamnosus* BGHV719

Pokazano je da kod nekih bakterija transkripcija velikog broja gena zavisi od šećera koji je prisutan u medijumu (Nguyen *et al.*, 2004). Da bi ispitali da li različiti šećeri koji se dodaju u modifikovani MRS medijum utiču na sintezu ili eksport proteina zida, uključujući proteine P-sloja, urađena je SDS-PAGE analize proteina ćelijskog zida izolata *Lb. rhamnosus* BGHV719. Proteini zida su izolovani pomoću LiCl. Molekulska masa proteina P-sloja varira među bakterijama i uglavnom iznosi između 40 i 55 kDa.

Na osnovu dobijenih rezultata vidi se da se proteinski profili soja BGHV719 značajno razlikuju u zavisnosti od sastava MRS medijuma kao i od šećera koji se koriste u modifikovanom MRS medijumu. Na osnovu poređenja proteinski profili se mogu podeliti u

četiri grupe. U prvu grupu spadaju proteinski profili dobijeni nakon gajenja soja *Lb. rhamnosus* BGHV719 u MRS i Mlac medijumu koji međusobno pokazuju sličan raspored proteinskih traka. Drugu grupu sačinjavaju proteinski profili zida izolovani iz bakterijskih kultura gajenih u Mfru, Mram i Mman medijumima, koji su takođe međusobno slični, iako se intenzitet traka među njima značajno razlikuje. U treću grupu spadaju proteinski profili dobijeni nakon gajenja bakterija u Msuc i Mglu medijumima. Rezultati ukazuju na to da u slučaju kada se ovaj soj gaji u Msuc i Mlac medijumima bakterija sintetiše veći broj proteina ćelijskog zida u odnosu na ostale modifikovane MRS medijume. U četvrtoj grupi se nalazi proteinski profil BGHV719 koji je gajen u Mcel gde se zapaža značajna redukcija količine i broja izolovanih proteina ćelijskog zida (Slika 19).



Slika 19. SDS-PAGE analiza supernatata proteinskih ekstrakta ćelijskog zida *Lb. rhamnosus* BGHV719 gajenog u osam različitih medijuma.

4.5.6. Mukoidnost kolonija i njen uticaj na različite ćelijske osobine soja *Lb. rhamnosus* BGHV954

Pokazano je da količina sintetisanog egzopolisaharida (EPS) kao i njegov sastav zavise od izvora ugljenika (šećera) u medijumu. Mukoidnost kolonija predstavlja preliminarni test za utvrđivanje proizvodnje EPS-a u bakterijama.

Na osnovu ovog testa, utvrđeno je da pet humanih vaginalnih izolata (BGHV44, BGHV55, BGHV805, BGHV954 i BGHV2) od ukupno 39 analiziranih, tokom rasta formira mukoidne kolonije. Da bi utvrdili da li u prisustvu različitih šećera dolazi do promena u stepenu mukoidnosti nekog soja, ovim testom je analiziran soj *Lb. rhamnosus* BGHV954. Pored testiranja stepena mukoidnosti, mereni su takođe parametri kao i u eksperimentima koji su rađeni za soj *Lb. rhamnosus* BGHV719: broj živih ćelija (CFU/ml), pH vrednost, MATH vrednost, procenat redukcije hidrofobnosti soja kao i preživljavanje u prisustvu tri antibiotika nakon gajenja u komercijalnom i modifikovanim MRS medijumima.

Kao što se vidi u Tabeli 12, ovaj soj za svoj rast može da koristi sve navedene šećere iako je u prisustvu celobioze zabeležen najslabiji rast. U zavisnosti od medijuma u kome je soj rastao, nakon 20 sati rasta broj živih ćelija varirao je između $7,8 \times 10^7$ i $4,5 \times 10^9$ CFU/ml. Početna pH vrednost inokulisanog medijuma iznosila je u svim slučajevima 6,8, a nakon 20 sati rasta bakterija izmerene pH vrednosti su u zavisnosti od medijuma u kome je soj rastao iznosile od 4,22 do 6,45. Rezultati su pokazali da prisustvo različitih šećera u modifikovanom MRS medijumu ima uticaj na stepen mukoidnosti kolonija analiziranog soja. Na Mfru i Mman agaru dolazi do vidljivog smanjenja mukoidnosti kolonija dok na Mlac i Mram agaru dolazi do kompletnog gubitka mukoidnosti kolonija. Na ostalim čvrstim MRS modifikovanim medijumima zabeležen je približno isti stepen mukoidnosti kao i na

komercijalnom MRS agaru. U slučaju mukoidnosti kolonija komponente medijuma nisu imale uticaj jer je isti stepen mukoidnosti zabeležen za komercijalni MRS kao i za Mglu medijum iako im se osnovni sastav razlikovao (osnovni sastojci bil su od različitih proizvođača). Promene u mukoidnosti soja gajenog na različitim medijumima pratile su i promene hidrofobnosti. U komercijalnom MRS medijumu ovaj soj pokazuje srednji stepen hidrofobnosti i razlikuje se od soja BGHV719 koji ne proizvodi EPS, a predstavlja soj sa niskim stepenom hidrofobnosti. Međutim, kada soj BGHV954 raste u modifikovanim MRS medijumima dolazi do redukcije hidrofobnosti ali dobijene vrednosti su više nego one koje su izmerene za BGHV719 u istim uslovima. Smanjenje ili redukciju mukoidnosti pratila je i značajna redukcija hidrofobnosti (od 44-56%).

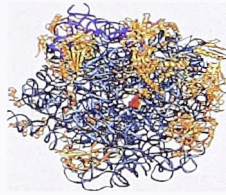
Da bi se videlo kakav uticaj prisustvo EPS-a ima na preživljavanje ovog soja u prisustvu eritromicina, gentamicina i vankomicina, za soj BGHV954 kao i za BGHV719 su izmereni ovi parametri u osam različitih medijuma. U MRS medijumu sa eritromicinom 98,2% bakterija preživljava, dok je u modifikovanim MRS medijumima stepen preživljavanja bakterija bio između 79,6% i 97,6% u zavisnosti od šećera koji je korišćen kao izvor ugljenika. Međutim, u prisustvu gentamicina u modifikovanim MRS medijumima preživljavanje soja BGHV954 je značajno redukovano u odnosu na komercijalni MRS medijum sa gentamicinom. Maksimalno preživljavanje ovog soja u modifikovanom medijumu sa gentamicinom izmereno je kada je soj gajen u Mglu (35,6%). Sastav medijuma i šećeri nisu uticali na visok stepen preživljavanja ovog soja u prisustvu vankomicina koji je u ispitivanim medijumima varirao između 94,1% i 98,2%.

Tabela 12. Promena mukoidnosti i hidrofobnosti kolonija kod *Lb. rhamnosus* izolata BGHV954 gajenog u osam različitih medijuma.

medijum	mukoidnost kolonija	CFU/ml	pH	hidrofobnost	redukcija hidrofobnosti	antibiotska rezistencija ^b		
						eritromicin (16 µg/ml)	gentamicin (100 µg/ml)	vankomicin (200 µg/ml)
MRS	++	4,5 x 10 ⁹	4,52	45 (M)	0%	98,2%	97,7%	98,2%
Mglu	++	2,6 x 10 ⁹	4,58	38 (M)	26%	97,6%	35,6%	96,3%
Mfru	+	2,3 x 10 ⁹	4,80	25 (L)	44%	80,1%	6,3%	97,6%
Mman	+	1,1 x 10 ⁹	4,22	23 (L)	49%	88,7%	7,9%	98,1%
Mram	-	5,9 x 10 ⁸	5,56	20 (L)	56%	83,8%	6,8%	96,7%
Msuc	++	2,2 x 10 ⁹	4,72	27 (L)	40%	81,2%	3,6%	94,1%
Mlac	-	8,9 x 10 ⁸	4,56	21 (L)	53%	88,4%	10,1%	95,6%
Mcel	++	7,8 x 10 ⁷	6,45	28 (L)	38%	79,6%	7,7%	95,0%

++ označava intenzivnu mukoidnost, + označava redukovanu mukoidnost i - označava potpuni gubitak mukoidnosti ; L – nizak stepen hidrofobnosti; M - srednji stepen hidrofobnosti.

Vrednosti prikazane u Tabeli 12 predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja.



V DISKUSIJA

Veoma je važno razumeti strukturu normalne vaginalne mikroflore pre svega jer poremećaj mikrobiološkog balansa između laktobacila kao dominantne flore i drugih pre svega Gram-negativnih bakterija ima uticaj na zdravstveno stanje žene (Vásquez *et al.*, 2002). Smatra se da laktobacili imaju ključnu ulogu u održavanju zdravog statusa vaginalnog ekosistema zahvaljujući različitim mehanizmima odbrane od patogena. Laktobacili proizvodnjom mlečne kiseline, vodonik peroksida (H_2O_2), bakteriocina i drugih antimikrobnih supstanci ali i mehanizmima koagregacije i kompetitivne adhezije za vaginalne epitelijalne ćelije sprečavaju rast i kolonizaciju vagine od strane patogenih mikroorganizama (Hillier, 1998; Ocaña *et al.*, 1999). Na ovaj način humani vaginalni laktobacili smanjuju rizik nastanka različitih obolenja kao što su bakterijske vaginoze, gljivične infekcije i seksualno prenosive bolesti (Zhou *et al.*, 2004).

Broj vrsta u okviru roda *Lactobacillus* neprekidno se povećava, kako usled opisivanja novih vrsta, tako i zbog reklasifikacije postojećih vrsta. Identifikacija *Lactobacillus* sp. do nivoa vrste klasičnim metodama identifikacije često nije moguća (Felten *et al.*, 1999). Usled velike heterogenosti u okviru ovog roda, fenotipska karakterizacija kao i identifikacija bazirana na fermentaciji šećera često daje dvosmislene rezultate (Vankerhoven *et al.*, 2008). Zbog njihove uloge, pre svega u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, identifikacija laktobacila do nivoa vrste pa čak i do nivoa soja je od velike važnosti. Razvoj novih molekularnih metoda kao što je rep-PCR omogućio je brzu i precizniju identifikaciju laktobacila (Versalovic *et al.*, 1994). Iz rezultata ove studije vidi se da postoje značajne

razlike između preliminarne identifikacije laktobacila na osnovu fermentacije šećera i rep-PCR metode. Iako je na osnovu preliminarne identifikacij pomoću API 50CH sistema među 39 humanih vaginalnih izolata korišćenih u ovoj studiji identifikovano šest vrsta laktobacila, na osnovu rezultata rep-PCR-identifikovane su tri vrste. Rezultati API testa ukazuju na to da među izolatima postoje razlike na metaboličkom nivou, iako je analiza rezultata rep-PCR-a pokazala da je genetička varijabilnost u okviru vrste mala. Ovi rezultati potvrđuju mišljenje da biohemijske metode identifikacije treba koristiti pre svega kao smernice ili dopune u procesu identifikacije ovih vrsta.

Pojedine vrste laktobacila kao što su *Lactobacillus jensenii*, *Lb. crispatus* i *Lb. gasseri* predstavljaju dominantnu vaginalnu floru zdravih žena (Antonio *et al.*, 1999) iako diverzitet vaginalnih laktobacila često varira u zavisnosti od studija. U ovom radu identifikovani su vaginalni laktobacili koji predstavljaju deo normalne vaginalne flore žena iz Srbije i dobijeni rezultati su upoređeni sa literaturnim podacima o diverzitetu humanih vaginalnih laktobacila. Pored ove analize, jedan od ciljeva ove studije bila je takođe i analiza antimikrobne osetljivosti/rezistencije odabranih humanih vaginalnih izolata.

Tri vrste laktobacila identifikovane u ovom radu, *Lb. rhamnosus*, *Lb. fermentum* i *Lb. plantarum* su nađene takođe kao deo normalne vaginalne flore žena (Redondo-Lopez *et al.*, 1990). Razlike u sastavu vaginalne flore između studija mogu se makar delimično, pripisati varijacijama u uzimanju samog uzorka, vaginalnom statusu žena kao i činjenici da je preliminarne identifikacije laktobacila često bila bazirana na fenotipskim kriterijumima (Vasquez *et al.*, 2002). Na osnovu rezultata analize profila DNK fragmenata 39 humanih vaginalnih izolata dobijenih rep-PCR-om sa (GTG)₅ prajmerom može se zaključiti da je raspored dobijenih fragmenata među izolatima u okviru svake vrste laktobacila veoma sličan. Jedan od mogućih uzroka ograničenog diverziteta BGHV sojeva je činjenica da je samo jedan izolat po subjektu odabran za analizu. S druge strane, interesantno je da na osnovu (GTG)₅-

PCR analize izolati koji pripadaju istoj vrsti, iako izolovani iz različitih subjekata, deluju genotipski izuzetno blisko. Ovo se posebno uočava u slučaju *Lb. rhamnosus* grupe u kojoj većina izolata daje identičan raspored fragmenata DNK. Na osnovu AFLP analize, Vancanneyt i saradnici (2006) su definisali sedam stabilnih intraspecifičnih grupa *Lb. rhamnosus*. Moguće je da BGHV izolati koji su analizirani u ovom radu pripadaju jednoj od navedenih grupa ili predstavljaju dodatnu intraspecifičnu grupu. S obzirom da se na osnovu analize rezultata rep-PCR-a ne može govoriti o stepenu diverziteta u okviru samih vrsta laktobacila analiziranih u ovoj studiji, jasno je da su za upotpunjavanje dobijenih rezultata neophodne dodatne metode. U tom cilju, za utvrđivanje diverziteta unutar jedne vrste treba uključiti kombinacije drugih molekularno genetičkih metoda kao što su AFLP i/ili PFGE (Tynkkynen *et al.*, 1999).

Rezultati testiranja antimikrobnog dejstva humanih vaginalnih izolata u ovoj studiji pokazali su da svih 39 sojeva ispoljava ovo svojstvo na indikatorske sojeve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NS1 i *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16, dok 19 sojeva inhibira rast *Salmonella enteritidis*. S obzirom da antimikrobnu aktivnost ni u jednom slučaju nije bilo moguće neutralisati dejstvom proteaze, pretpostavlja se da neko drugo jedinjenje neproteinske prirode dovodi do redukcije rasta indikator sojeva. Proizvodnja H_2O_2 predstavlja jedan od faktora koji je odgovoran za dominaciju laktobacila u vaginalnom ekosistemu žena i značajan mehanizam odbrane od različitih patogena izazivača urogenitalnih infekcija kod žena (Ocaña *et al.*, 1999). Od ukupno 39 humanih vaginalnih izolata, za 11 sojeva (BGHV1', BGHV252K, BGHV29, BGHV54, BGHV54K, BGHV55, BGHV105, BGHV224, BGHV389, BGHV425 i BGHV954) je pokazano da sintetišu H_2O_2 . Međutim, na osnovu dobijenih rezultata nije moguće napraviti korelaciju između redukcije rasta *Salmonella enteritidis* i proizvodnje H_2O_2 u humanim vaginalnim izolatima testiranim u ovoj studiji.

Ubrzan razvoj antibiotskih rezistencija kod mikroorganizama predstavlja jedan od značajnih mehanizama koji pokreće i održava procese otkrivanja novih antibiotika (Wright, 2007). Prisustvo bakterija višestruko rezistentnih na antibiotike danas predstavlja veliki izazov za modernu medicinu. Iako je jasno da antibiotici kao mahnizam selektivnog pritiska dovode do nastanka antibiotske rezistencije u bakterijama, horizontalni transfer gena koji omogućavaju rezistenciju takođe u značajnoj meri doprinosi širenju ovog problema (Levy, 2002).

Laktobacili su raznovrsna i široko rasprostranjena grupa bakterija koja uključuje i komensalne bakterije koje naseljavaju ljudski organizam (Felten *et al.*, 1999). Pored duge istorije upotrebe u ljudskoj ishrani, laktobacili su takođe našli primenu kao probiotici, bilo kao dodaci prehrambenim proizvodima ili u farmaceutskim preparatima. Međutim, veliki broj objavljenih radova o širokoj rasprostranjenosti laktobacila rezistentnih na različite antibiotike, kako u prehrambenim proizvodima tako i među humanim probioticima, baca sasvim drugačije svetlo na upotrebu laktobacila u humanoj ishrani (Danielsen and Wind, 2003, Gevers *et al.*, 2003a; Huys *et al.*, 2006). Dodatno, u porastu je i broj radova u kojima se dokumentuju slučajevi gde se laktobacili ponašaju kao oportunistički patogeni koji dovode do različitih infekcija i obolenja kod ljudi (Cannon *et al.*, 2005).

Do sada je objavljen mali broj studija u kojima su istraživani profili osetljivosti humanih vaginalnih laktobacila na antibiotike (Choi *et al.*, 2003; Catalouk and Gogebakan, 2004). S obzirom na postojanje podataka da bakterijska osetljivost na antibiotike može varirati u zavisnosti od sastava medijuma za rast (Klare *et al.*, 2005), u ovoj studiji korišćena su dva različita medijuma, MRS i LSM (90% IsoSensi Test medijum i 10% MRS) medijumi. LSM medijum predstavlja trenutno najoptimalniji medijum za testiranje antibiotske rezistencije laktobacila koji najbolje odslikava stepen osetljivosti ovih bakterija na antibiotike (Klare *et al.*, 2005). Moguće greške u definisanju nekog izolata kao osetljivog/rezistantnog na

eritromicin i gentamicin mogu nastati kao posledica upotrebe različitih medijuma kao što su na primer ISA (Iso-Sensitest Agar) i MRS medijum (Huys *et al.*, 2002).

U radu koji je objavio Andrews (2000), predloženo je da se usled nastalih razlika u MIK vrednostima dobijenim za *Pseudomonas aeruginosa* u ISA medijumima različitih godina proizvodnje, granične vrednosti MIK za gentamicin se promene sa 1 na 2 mg/ml. Dodatno, zone inhibicije koje se uzimaju za definisanje da li je soj osetljiv, intermedijer ili rezistentan na gentamicin su promenjene. Cilj ovog predloga je bio da se spreči nepotrebno izbegavanje upotrebe gentamicina u terapijske svrhe, makar dok se ne utvrde razlozi za nastale razlike u proizvodnji ISA medijuma. Pokazano je da ISA medijum koji potiče od istog proizvođača tokom vremena može da se menja kao posledica promene u samom procesu proizvodnje kao i porekla osnovnih sastojaka, što zajedno utiče na krajnje rezultate determinacije MIK-ova.

U ovom radu rezultati determinacije MIK-ova za 39 humanih vaginalnih izolata gde je korišćeno šest antibiotika (ampicilin, eritromicin, tetraciklin, gentamicin, streptomycin i vankomicin) pokazali su zavisnost rezultata testiranja od medijuma koji se koristio za rast bakterija. Nasuprot rezultatima dobijenim testiranjem osetljivosti humanih vaginalnih izolata na ampicilin, tetraciklin i vankomicin, MIK vrednosti za eritromicin, streptomycin i gentamicin značajno su se razlikovali u zavisnosti od medijuma koji je korišćen za rast bakterija.

Visok stepen rezistencije bakterija gajenih u MRS medijumu sa dodatkom gentamicina i streptomicina takođe su zabeležili Choi i saradnici (2003) koji su utvrdili vrednosti MIK-a od 100 µg/ml za gentamicin i 200 µg/ml za streptomycin u analizi 108 vaginalnih izolata laktobacila izolovanih iz žena poreklom iz Koreje. Na osnovu dobijenih rezultata može se samo pretpostaviti da neki konstituent MRS medijuma ili dovodi do potpune (u slučaju streptomicina), odnosno delimične (u slučaju gentamicina) inhibicije ili do

smanjenog unosa ovih antibiotika usled promena u strukturi ćelijskog zida. Postoje takođe pretpostavke da pH vrednost MRS medijuma (pH 5,7) može da bude eventualni uzrok smanjene aktivnosti aminoglikozida (Klare *et al.*, 2005). Uzevši u obzir da je početna pH vrednost MRS medijuma sa gentamicinom i streptomycinom u ovoj studiji iznosila 6,8, a LSM medijuma sa istim antibioticima 6,7, verovatno razlike u stepenu rezistentnosti nisu povezane sa kiselošću medijuma. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je u LSM medijumu sa gentamicinom i streptomycinom omogućena bolja diskriminaciju između rezistentnih i senzitivnih izolata. Ovo je u skladu sa rezultatima objavljenim od strane Klare i saradnika (2005) na osnovu kojih je LSM medijum predlažen kao optimalni medijum za testiranje antibiotske rezistencije ne-enterokokalnih BMK. Iako postoje razlike u stepenu rezistentnosti bakterija gajenih u MRS-u i LSM medijumu sa dodatkom eritromicina, ne može se doneti konačan zaključak o kvalitetu diskriminacije jer u LSM medijumu nisu rađeni MIK-ovi iznad 16 $\mu\text{g/ml}$. Interesantno je da su se u slučaju tetraciklina oba medijuma pokazala podjednako diskriminativna u ovom slučaju otkrivajući rezistenciju na ovaj antibiotik kod svih izolata pripadnika vrste *Lb. fermentum*. Stepenu rezistentnosti na vankomicin u oba medijuma, za sve ispitivane sojeve, bio je isti (MIK $\geq 256 \mu\text{g/ml}$). S obzirom da vankomicinska rezistencija predstavlja unutrašnju osobinu većine laktobacila, dobijene visoke vrednosti MIK-ova za humane vaginalne izolate bile su očekivane (Holliman and Bone 1988). Čak je predloženo da se testiranje vankomicinske rezistencije uvrsti u kriterijume za identifikaciju određenih vrsta laktobacila, na primer za razlikovanje vrsta *Lb. acidophilus* (osetljiv) i *Lb. rhamnosus* (rezistentan) (Hamilton-Miller and Shah, 1998). Tek su nedavno Deghorian i saradnici (2007) pokazali da *Lb. plantarum* poseduje gen koji pripada familiji *vanX* gena i pokazuje oko 30% sličnosti na nukleotidnom nivou sa *vanX* genima nađenim u enterokokama. Kod enterokoka ovaj gen predstavlja deo klastera sastavljenog od pet gena koji učestvuju u proizvodnji izmenjenog prekursora peptidoglikana -

D-alanil-D-laktat (Lesard and Walsh, 1999). Međutim, iako je bilo pokušaja, osim u navedenom radu, molekularna osnova rezistencije laktobacila na vankomicin još uvek nije rasvetljena (Tynkkynen *et al.*, 1998).

Analizirajući profile antibiotske rezistencije pojedinačnih humanih vaginalnih izolata dobijene u LSM medijumu, ustanovljeno je da su izolati rezistentni na eritromicin, uključujući svih 17 izolata *Lb. rhamnosus* i dva izolata *Lb. fermentum* (BGHV282K i BGHV30), bili ujedno rezistentni i na streptomycin i vankomicin. Ovi rezultati ukazuju na postojanje višestruko rezistentnih humanih izolata koji predstavljaju deo humane vaginalne flore žena u Srbiji. Bez obzira na prirodu rezistencije, usled snažnog selektivnog pritiska neumernim korišćenjem antibiotika, u okviru organizma čoveka postoji potencijalno veliki broj determinantni rezistencije koji se dalje mogu preneti u druge bakterije uključujući i patogene. Prisustvo rezistentnih bakterija može otežati buduće lečenje pacijenata kod kojih one u retkim slučajevima mogu izazvati različite infekcije (Cannon *et al.*, 2005).

U studiji antimikrobne osetljivosti vaginalnih laktobacila izolovanih iz žena poreklom iz Turske u vrstama *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum* i *Lb. rhamnosus* detektovan je *tetM* gen RPP tipa (protein za protekciju robozoma) u kombinaciji sa *ermB* genom (Cataloluk and Gogebakan, 2004). Interesantno je da nijedan od tetraciklin rezistentnih BGHV izolata klasifikovanih u ovom radu kao *Lb. fermentum*, u okviru svog genoma nije posedovao gene koji obezbeđuju rezistenciju na ovaj antibiotik kao što su geni za RPP, *tetK* ili *tetL*. PCR metodom u BGHV izolatima nisu detektovani geni za rRNK metilaze, *ermA*, *ermB* i *ermC*. Dobijeni rezultati su ukazivali na prisustvo drugih mehanizama koji su odgovorni za detektovanu rezistenciju. Pokušaji kloniranja genetičkih determinanti odgovornih za rezistenciju na tetraciklin i eritromicin nisu dali pozitivne rezultate.

Glavni uzrok rezistencije na makrolide u *Helicobacter pylori* je nemogućnost antibiotika da se veže za komponente ribozoma bakterija tj. peptidil transferazni region u

okviru V domena 23S rRNK (Weisblum, 1995). Hromozomalna tranziciona mutacija identifikovana kao A→G na poziciji A2058 menja mesto za vezivanje eritromicina u okviru ribozoma i obezbeđuje rezistenciju na ovaj antibiotik što je pokazano za mnoge kliničke izolate (Versalovic *et al.*, 1996). Nedavno je pokazano da ova mutacija obezbeđuje rezistenciju na eritromicin u *Lb. rhamnosus* E41 koji je izolovan iz gastrointestinalnog trakta čoveka (Flórez *et al.*, 2007).

U ovom radu pokazano je da je eritromicinska rezistencija, detektovana u pet *Lb. rhamnosus* izolata (BGHV1', BGHV20, BGHV29, BGHV389 i BGHV719), uzrokovana A→G tranzicionom mutacijom u okviru gena za 23S rRNK na poziciji A2058 (*E. coli* numerisanje). Na osnovu analiziranih sekvenci R amplikona koji obuhvataju A2058 nukleotid vidi se da je broj mutiranih gena za 23S rRNK različit među izolatima što ukazuje na mogućnost različitih puteva nastanka rezistencije u ovim izolatima. Na osnovu rezultata dobijenih nakon sekvenciranja R amplikona zaključeno je da je kod otprilike polovine ribozomalnih gena došlo do A→G tranzicione mutacije što je prema Sigmund i saradnicima (1988) procenat koji je potreban za obezbeđivanje visoke rezistencije bakterija na makrolde. Rezistencija koja se bazira na mutacionom događaju koji mora da se odigra u makar polovini kopija prisutnih gena verovatnije će se desiti u mikroorganizmima koji poseduju manji broj (jednu ili dve kopije) gena za 23S rRNK po genomu (Nash and Inderlied, 1995). Iz rezultata dobijenih u hibridizacionim eksperimentima može se spekulirati da genom izolata *Lb. rhamnosus* BGHV719 poseduje najmanje šest kopija ovog gena. Statistički, pojava eritromicinske rezistencije putem mehanizma mutacije u okviru gena za 23S rRNK trebalo bi ređe da se odigra u vrstama koje poseduju veći broj rRNK operona. S druge strane, duga upotreba odnosno zloupotreba antibiotika ubrzala je nastanak antibiotske rezistencije među bakterijama (Levy, 2002). Ako se uzme u obzir rezultat dobijen nakon sekvenciranja R amplikona poreklom iz BGHV1' (konstatovan manji broj mutiranih u odnosu na nemutirane

gene za 23S rRNK) može se zaključiti da za dobijanje rezistentnog fenotipa ili nije neophodno da polovina od ukupnog broja gena bude mutirana, ili da prisustvo neke dodatne mutacije doprinosi nastanku ovakvog fenotipa. Na primer, mutacija u ribozomalnom proteinu L22 dovodi do destabilizacije „džepa” za vezivanje eritromicina tako da se eritromicin delimično vezuje za tunel u okviru velike ribozomalne subjedinice što je nedovoljno da spreči rast polipeptidnog lanca (Davydova *et al.*, 2002). Mutacija G2058 obezbeđuje visoku eritromicinsku rezistenciju usled velike redukcije u afinitetu vezivanja antibiotika za V region 23S rRNK (Douthwaite and Aagard, 1993). Rezultati dobijeni u ovoj studiji se slažu sa literaturnim podacima pošto su MIK-ovi utvrđeni za pet analiziranih humanih vaginalnih izolata (BGHV1, BGHV20, BGHV29, BGHV389 i BGHV719) bili izuzetno visoki (MIK > 256 µg/ml). Ovaj rad predstavlja prvi slučaj u kome je opisana eritromicinska rezistencija uzrokovana mutacijom u 23S rRNK kod *Lactobacillus* sp. u humanim vaginalnim izolatima.

Ako se analiziraju genomi do sada sekvenciranih laktobacila vidi se da je broj kopija gena za 23S rRNK različit i varira od četiri kopije (*Lb. helveticus* DPC 4571) do devet kopija (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842). Šest kopija gena za 23S rRNK koliko je zaključeno u ovom radu da postoji u *Lb. rhamnosus* BGHV719, u okviru svog genoma imaju još *Lb. gasseri* ATCC 33323, *Lb. johnsonii* NCC 533 i *Lb. reuteri* F275.

Kako sekvenca kompletnog genoma *Lb. rhamnosus* do sada još nije objavljena, pozicija nukleotidnih analoga A2058, A2059 i A2060 (kod *E. coli*) za ovu vrstu nije utvrđena. Na osnovu objavljene genomske sekvence 23S rDNK *Lb. casei* ATCC 334 (Makarova *et al.*, 2006) pozicije odgovarajućih nukleotida su A1673, A1674 i A 1675 u odnosu na gore navedene pozicije u *E. coli*.

Rezultati dobijeni u ovoj studiji ukazuju na prisustvo različitog broja mutiranih gena za 23S rRNK u okviru genoma bakterija koje su izolovane iz pet različitih subjekata što ukazuje na nezavisan nastanak eritromicinske rezistencije među testiranim izolatima. Ovakvi

rezultati zahtevaju detaljnije proučavanje mikroevolucije antibiotske rezistencije među nepatogenim bakterijama i razvoj strategija koje će, u najmanju ruku, makar usporiti stopu kojom se širi antibiotska rezistencija među bakterijama (Bonhoeffer *et al.*, 1997).

Ponašanje BMK često zavisi od promene površinskih osobina koje bakterijama omogućavaju da se prilagode promenama spoljašnje sredine (Schär-Zammareti *et al.*, 2005). Još uvek se malo zna o vezi između uslova gajenja bakterija, promena površinskih osobina i efekata koje ove promene imaju na ponašanje bakterije. Čelijski zid predstavlja strukturnu komponentu bakterije i svaka promena u spoljašnjem omotaču bakterije reflektuje adaptaciju bakterije na specifične uslove sredine (Beveridge *et al.*, 1991). Iako nije do kraja rasvetljena uloga konstituenta čelijskog omotača koji dovode do ispoljavanja različitih površinskih osobina bakterije, postoje indicije da proteini P-sloja i egzopolisaharidi (EPS) igraju važnu ulogu u ovim procesima (Cerning *et al.*, 1994; Boonaert and Rouxhet, 2000; Schär-Zammareti *et al.*, 2005). Kako navedeni makromolekuli predstavljaju glavnu barijeru između bakterije i njenog okruženja, medijuma za gajenje bakterije verovatno ima uticaj na njene površinske osobine. Iz literature je poznato da ispoljavanje različitih površinskih osobina mikroorganizama zavisi od uslova gajenja i sastava medijuma u kojima bakterija raste. Pokazano je da promene u sastavu MRS medijuma utiču na površinske osobine laktobacila uključujući i hidrofobnost, što za posledicu ima promenu u njihovim adhezivnim sposobnostima. Takođe, postoje podaci da promene u sastavu medijuma mogu imati za posledicu promenu u vrednostima MIK-ova bakterija na određeni antibiotik. Različiti mono i disaharidi u značajnoj meri utiču na sintezu EPS-a u laktobacilima. Sa druge strane, ovaj makromolekul ulazi u sastav čelijskog zida i očigledno je da promene u sintezi EPS-a imaju uticaj na površinske osobine bakterija. Ipak, još uvek se malo zna o samoj prirodi uticaja koji za posledicu imaju različita ponašanja bakterija kao što je promena u sposobnosti adhezije za epitelijalne ćelije (Pelletier *et al.*, 1997). Površinske osobine laktobacila predstavljaju važan

kriterijum za njihovu primenu u prehrambenoj tehnologiji (Boonaert and Rouxhet, 2000), ali takođe posreduju u adheziji laktobacila za vaginalni epitel (Ocaña *et al.*, 1999). Zahvaljujući sposobnosti da sintetišu različita antimikrobna jedinjenja kao i posedovanju mehanizama adhezije i agregacije, laktobacili mogu pružiti čoveku zaštitu od enteropatogenih bakterija (Hawthorn and Reid, 1990). Pokazano je za *Lb. acidophilus* da i najmanje promene u sastavu komercijalnog MRS medijuma dovode do promene hidrofobnosti, karakteristika bakterija koja predstavlja jednu od mera površinskih osobina (Millsap *et al.*, 1996). U ovom radu analizirani su različiti aspekti uticaja promene sastava medijuma u kome se bakterije gaje na njihove površinske osobine.

Analizom brzine rasta i određivanjem broja živih bakterija nakon 20 sati inkubacije u različitim medijumima, može se zaključiti da izolati *Lb. rhamnosus* BGHV719 i *Lb. rhamnosus* BGHV954 mogu da koriste različite šećere uključujući monosaharide i disaharide. Međutim, varijacije u izvoru ugljenih hidrata u modifikovanom MRS medijumu imale su značajan uticaj na broj živih ćelija u kulturi kao i na samu dinamiku rasta. Nakon 20 sati pH vrednosti medijuma u kome su bakterije rasle postale su niže, iako su uočene razlike između ovih vrednosti. Relativno mala promena pH vrednosti nakon 20 sati rasta u Mcel medijumu može se pripisati značajno slabijem rastu oba soja u ovom medijumu (CFU/ml nakon 20 sati inkubacije bio je $8,1 \times 10^7$ za BHGV719 i $7,8 \times 10^7$ za BHGV954).

Iako je objavljeno nekoliko studija o površinskim osobinama laktobacila (Pelletier *et al.*, 1997), ovaj fizičko-hemijski aspekt bakterijskih ćelija nije dovoljno proučen. Na osnovu rezultata MATH testova u kojima je merena sposobnost bakterijske ćelije da se veže za nepolaran rastvarač heksadekan, pokazano je da je soj *Lb. rhamnosus* BGHV719 hidrofilan soj, rezultat koji je u skladu sa prethodno objavljenim studijama (Reid *et al.*, 1992; Pelletier *et al.*, 1997). S druge strane, za soj *Lb. rhamnosus* BGHV954 koji proizvodi EPS pokazano je da ima viši stepen hidrofobnosti od BGHV719. S obzirom na hidrofilnu prirodu

egzopolisaharida (Pelletier *et al.*, 1997) razlike u stepenu hidrofobnosti između ova dva soja ne mogu se pripisati proizvodnji EPS-a od strane BGHV954. Možda neki drugi konstituenti ćelijskog omotača bakterije kao što su hidrofobni polipeptidi, doprinose povećanju hidrofobnosti ovog soja. Iako je za konačan zaključak potrebno ispitati veći broj laktobacila pripadnika iste vrst dobijeni rezultati ukazuje na mogućnost da hidrofobnost predstavlja osobinu specifičnu za soj. Redukcija hidrofobnosti, odnosno povećavanje hidrofilitnosti u modifikovanim MRS medijumima koja je izmerena za oba soja verovatno odražava značajne promene kroz koje bakterije prolaze, a koje su rezultat izmena u sintezi konstituenata ćelijskog zida.

Pokazano je da rast u minimalnom medijumu kod nekih Gram-negativnih bakterija dovodi do promene njihove hidrofobnosti (Kjellberg and Hermansson, 1984). Takođe, nedostatak ugljenika pospešuje adheziju ovih bakterija za različite površine (staklo) kao i bolju interakciju sa nutrijentima lokalizovanim na tim površinama (Kefford *et al.*, 1982; Kjellberg and Hermansson, 1984). Tako novonastale promene predstavljaju adaptaciju bakterija na stres koji prevazilaze intenzivnijom adhezijom za površine koje im mogu omogućiti bolje snabdevanje nutrijentima koji im nedostaju. S obzirom da je do sada objavljen mali broj radova u kojima se sagledavaju različiti aspekti površinskih osobina bakterija, pre svega BMK, još uvek se ne može izvesti zaključak vezan za posledice koje za bakteriju ima promena hidrofobnosti/hidrofilitnosti same površine mikroorganizma.

Pod različitim uticajuma sredine, bakterije menjaju membransku fluidnost, te je pokazano da limitacija u nutrijentima prati i promenu u konstituentima ćelijskog omotača kao što su masne kiseline (Wandstrom *et al.*, 1987). Kao posledica ovih promena, može doći do promena osetljivosti bakterija na antimikrobne supstance. U analizi stepena hidrofobnosti kliničkih izolata laktobacila pokazano je da su hidrofilitni izolati rezistentniji na antibiotike i druga jedinjenja (vankomicin, nonoksinol-9) (Tomeczek *et al.*, 1992). U radu je predloženo

da je fizička barijera koja sprečava prodiranje antibiotika slabija u slučaju hidrofobnih ćelija. Nasuprot navedenim rezultatima u ovom radu je pokazano da, iako se hidrofobnost sojeva BGHV954 i BHHV719 u modifikovanim MRS medijumima smanjuje u odnosu na komercijalni MRS medijum, bakterije postaju osetljivije na eritromicin i u velikoj meri osetljivije na gentamicin. Pojačano prodiranje antibiotika u slučaju kada su korišćeni modifikovani MRS medijumi može da objasni smanjenu stopu rasta soja BGHV719 i BGHV954 u prisustvu eritromicina i gentamicina kada se uporede sa maksimalnim preživljavanjem u komercijalnom MRS-u. U odnosu na BGHV719, nešto veće vrednosti stepena preživljavanja u prisustvu eritromicina u svim korišćenim medijumima koje su dobijene za soj BGHV954, mogu se možda pripisati prisustvu EPS-a koji donekle sprečava prodiranje ovog antibiotika u ćeliju. Moguće je i da neka od komponenti komercijalnog MRS medijuma kao i neki šećeri u modifikovanom medijumu (indirektno) inaktiviraju ovaj antibiotik. U slučaju gentamicina najverovatnije neka od komponenti komercijalnog MRS-a utiče na redukciju aktivnosti ovog antibiotika. Kako se vankomicin vezuje za terminalni D-alanil-D-alanin, koji se nalazi na spoljašnjoj strani citoplazmatske membrane bakterije (Nagarajan, 1991) i kao takav deluje van ćelije, na njega promena hidrofobnosti površine bakterija nije imala nikakav uticaj. Takođe ni sastav MRS medijuma nije imao nikakav efekat na delovanje ovog antibiotika.

Ukupna proizvodnja EPS-a koje BMK sintetišu umnogome zavisi kako od sastava medijuma tako i od uslova u kojima bakterije rastu (Cerning *et al.*, 1994). Rezultati testiranja uticaja različitih šećera u modifikovanom MRS medijumu pokazali su da EPS proizvodnja u soju *Lb. rhamnosus* BHGV954 (EPS proizvođač), zavisi od vrste šećera prisutnog u medijumu. Rezultati dobijeni nakon rasta ovog soja u Mglu i Mlac medijumima, gde je mukoidnost kolonija bila značajno manja nego kada je soj gajen u Mlac, bili su u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima (Cerning *et al.*, 1994). Analizom prinosa proizvodnje EPS-a

u *Lb. casei* CG11 ovi autori su pokazali značajno veću količinu izolovanog EPS-a (160 mg/L) kada je soj gajen u prisustvu glukoze, u odnosu na proizvodnju koja je detektovana kada je bakterija rasla u prisustvu laktoze (45 mg/L). Dalje, iz rezultata dobijenih merenjem mukoidnosti soja BGHV956 u Msuc medijumu vidi se da saharoza stimuliše sintezu EPS-a kao što je ranije pokazano za *Lb. casei* CG11 gde je količina izolovanog EPS-a iznosila 195 mg/L (Cerning *et al.*, 1992). Studija o regulaciji EPS proizvodnje u *L. lactis* subsp. *cermoris* NIZO B40 pokazala je da ovaj soj proizvodi značajno više EPS-a u prisustvu glukoze u medijumu u odnosu na fruktozu što je pokazano i za soj BGHV954 (Petronella *et al.*, 1999). Dodatno, u soju BGHV954 smanjena sinteza EPS-a je konstatovana u Mram i Mman medijumima. Rezultati naše studije pokazali su da soj *Lb. rhamnosus* BHGV954 iako značajno slabije raste u Mcel medijumu, zadržava nivo sinteze EPS-a kao i u MRS medijumu. Međutim, ovo može da se objasni time da ćelije koje sporije rastu takođe i sporije sintetišu polimere koji ulaze u sastav ćelijskog zida, i time stvaraju više izoprenoidnih fosfata koji su dostupni za sintezu EPS-a (Sutherland, 1972). Na osnovu dobijenih rezultata može se samo spekulirati da u zavisnosti od izvora ugljenika laktobacili ili menjaju količinu proizvedenog EPS-a ili kako je ranije predloženo (Cerning *et al.*, 1994) mogu da sintetišu više od jednog polimera.

Površinski proteini pokrivaju bakteriju i smatra se da daju važan doprinos površinskim osobinama laktobacila (Schär-Zammareti *et al.*, 2005). Pokazano je da količina izolovanih proteina zida soja *Lb. acidophilus* NCC2628 zavisi od sastava spoljašnjeg medijumu i da u odsustvu peptona, dolazi do pojačane sinteze proteina P-sloja (Schär-Zammareti *et al.*, 2005). To znači da se proteini zida uključujući i proteine P-sloja preferencijalno sintetišu pod uslovima koji nisu optimalni za rast bakterija. Ovo je u skladu sa nalazima da se različiti proteini sintetišu kao odgovor bakterije na stres koji dolazi iz spoljašnje sredine (Beveridge and Graham 1991; Boot *et al.*, 1993). Sastav medijuma

predstavlja glavni faktor u formiranju površinskih osobina laktobacila (Schär-Zammareti *et al.*, 2005).

Možda najinteresantniji aspekt uticaja različitih šećera korišćenih u ovom radu na ponašanje *Lb. rhamnsus* BGHV719 jeste uticaj na proteinski sastav ćelijskog zida uključujući površinske proteine. SDS-PAGE analiza ukupnih proteina zida izolovanih iz soja BGHV719 i analizirani pomoću SDS elektroforeze pokazala je da, u zavisnosti od izvora šećera u medijumu u kome soj raste, dolazi do promene proteinskog sastava zida. Možda promena izvora šećera reflektuje odgovarajuću promenu sredine koja dovodi do odgovora bakterije u vidu promene genske ekspresije. DNK „microarray” analiza celog genoma *Thermotoga maritima* gajenog u medijumu sa dodatkom različitih šećera pokazala je značajne promene u ekspresiji gena ovog mikroorganizma kao odgovor na promenu nutrijenata u okruženju. Za bakterije koje su rasle u prisustvu laktoze pokazano je da je došlo do izmene u ekspresiji koja je obuhvatila 106 gena a u prisustvu manoze 24 gena, uključujući gene koji učestvuju u metabolizmu gvožđa i sumpora, ABC transportere kao i transkripcione regulatore (Chhabra *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2004). Moguće je takođe da se eksport nekih proteina menja usled promena u ćelijskom zidu a što je dalje povezano sa produkcijom EPS-a i promenama površinskih osobina ćelija. Smatra se da prisustvo površinskih proteina daje bakteriji određenu selektivnu prednost s obzirom da ovi makromolekuli sačinjavaju 10% ukupnih proteina bakterije što je za ćeliju izuzetno energetski opterećujuće (Boot *et al.*, 1993).

Pokazano da površinski proteini kod arhebakterija učestvuju u formiranju oblika samih ćelija (Boot *et al.*, 1993). Kjelleberg i Hermansson (1984) su pokazali da usled nedostatka ugljenika u medijumu za rast, bakterije pokazuju velike razlike u samoj spoljašnjoj strukturi na kojoj se javljaju različite neravnine na površini bakterijske ćelije. Analizom morfoloških osobina soja BGHV719 dobijenih mikroskopiranjem vidi se da sastav medijuma (MRS vs. modifikovani MRS) i prisustvo šećera u modifikovanom MRS

medijumu utiču na oblik ćelija i njihovo ponašanje u smislu formiranja agregata različite veličine. Ovi rezultati se mogu objasniti time da promena proteinskog sastava zida, površinskih osobina samog izolata, možda i ekspresija nekih gena, dovode do kompleksnog odgovora same bakterije na promenjene uslove sredine. Ove promene predstavljaju adaptaciju bakterije i omogućavaju ovoj vrsti da naseljava različite sredine uključujući i ljudski organizam.

Prisustvo antibiotske rezistencije u humanim komensalnim bakterijama zahteva dalju detaljnu analizu. Iako je vezu između konzumiranja antibiotika i nastanka rezistencije teško dokazati (Austin *et al.*, 1997), selektivni pritisak koji nameće nekontrolisana upotreba antibiotika verovatno predstavlja glavni faktor koji dovodi do nastanka antibiotske rezistencije među bakterijama koje sačinjavaju humanu mikrofloru. U urogenitalnom traktu koji karakteriše gusta i raznovrsna mikrobiološka populacija postoji veliki potencijal za odigravanja razmene genetskog materijala među autohtonim vrstama putem konjugacije, transpozicije ili transformacije (Levy, 2002). Iako štite organizam, komensalne bakterije mogu da služe kao rezervoari antibiotske rezistencije koja se dalje može preneti na druge vrste uključujući i patogene koji se mogu naći u urogenitalnom traktu (Salayers *et al.*, 2004). Sveukupno, treba naglasiti dva važna aspekta antibiotske rezistencije u nepatogenim bakterijama. Prvi aspekt se odnosi na mogućnost horizontalnog transfera determinantni rezistencije (Levy, 2002) posebno u patogenim mikroorganizmima. Ovaj mehanizam je već demonstriran u *in vitro* uslovima između komensalne *E. coli* i *Salmonella* sp., ukazujući na rizik od kontaminacije hrane sa višestruko rezistentnim bakterijama (Blake *et al.*, 2003). Mater i saradnici (2008) su pokazali takođe da i u *in vivo* uslovima tokom boravka u digestivnom traktu miša probiotski *Lb. acidophilus* može da primi *vanA* gen koji obezbeđuje vankomicinsku rezistenciju, a koja vodi poreklo od intestinalnih enterokoka. Drugi aspekt se odnosi na laktobacile kao potencijalne patogene i terpautski problem brze i efikasne

antibiotske terapije koji se posebno odnosi na pacijente sa oslabljenim imunitetom kao i starije osobe ugrožene sopstvenim komensalnim bakterijama (Cannon *et.al.*, 2005). Frekvenca različitih infekcija uzrokovanih oportunističkim bakterijskim patogenima je u stalnom porastu (Wright, 2007). Smanjena efikasnost antibiotika uzrokovana različitim mehanizmima rezistencije može ugroziti ishod lečenja različitih bakterijskih infekcija pacijenata gde je pravovremena terapija sa antibioticima od primarne važnosti.

Nasuprot postojanju negativnih strana antibiotske rezistencije komensalnih bakterija, postojanje dokazane unutrašnje-netransferabilne rezistencije na određeni antibiotik može određenom probiotiku da donese prednost ako se unosi u organizam koji se tretira antibiotikom na koji ta bakterija nije osetljiva. Naravno ovo zahteva detaljnu analizu molekularne osnove rezistencije i nedvosmislenu demonstraciju da se determinanta odgovorna za rezistenciju ne može preneti horizontalnim transferom.



V ZAKLJUČCI

Na osnovu cilja rada i izloženih rezultata doneti su sledeći zaključci:

1. Pokazano je da u vaginalnoj mikroflori 39 žena poreklom iz Srbije preovlađuju vrste *Lactobacillus rhamnosus*, *Lb. fermentum* i *Lb. plantarum*;
2. Svih 39 humanih vaginalnih izolata pokazuje antimikrobnu aktivnost na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NS1 i *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16, i 19 izolata inhibira rast *Salmonella enteritidis*.
3. Među 39 analiziranih humanih vaginalnih izolata detektovano je 11 proizvođača vodonik peroksida i to: *Lb. rhamnosus* izolati BGHV1', BGHV29, BGHV54K, BGHV55, BGHV224, BGHV389 BGHV425, BGHV954, *Lb. fermentum* izolati BGHV252K, BGHV105 i *Lb. plantarum* izolat BGHV54. Nije pokazana korelacija između proizvodnje vodonik peroksida u humanim vaginalnim izolatima i inhibicije rasta *S. enteridas*.
4. U svih 39 ispitivanih humanih vaginalnih laktobacila pokazano je prisustvo rezistencije na najmanje jedan od šest testiranih antibiotika. Za 19 izolata (svih 17 *Lb. rhamnosus* i dva *Lb. fermentum* izolata BGHV282K i BGHV30) pokazano je prisustvo rezistencije na tri antibiotika (eritromicin, streptomycin i vankomicin) od šest testiranih.
5. Nivo antibiotske rezistencije zavisi od sastava i prirode medijuma u kojima bakterija raste i pokazano je da je LSM medijum trenutno najoptimalniji medijum za testiranje antibiotske rezistencije laktobacila.

6. Promena sastava MRS medijuma uključujući i dodavanje različitih šećera u modifikovani MRS medijum ima značajan uticaj na ishod rezultata testiranja rezistencije na eritromicin i gentamicin u soju BGHV719.
7. U okviru genoma *Lb. rhamnosus* BGHV719 nalazi se najmanje šest kopija gena za 23S rRNK.
8. Tranziciona mutacija A→G na poziciji 2058 u oviru R amplikona koji obuhvata deo V domena 23S rRNK *Lb. rhamnosus* sojeva BGHV1', BGHV20, BGHV29, BGHV389 i BGHV719 najverovatnije je uzrok visoke rezistencije ovih sojeva na eritromicin.
9. Promenom sastava MRS medijuma uključujući i dodavanje različitih šećera u modifikovani MRS medijum, uočavaju se promene u obliku ćelija kao i u formiranju agregata ćelija soja *Lb. rhamnosus* BGHV719, a takođe dolazi i do redukcije stepena hidrofobnosti površine ovog soja u odnosu na komercijalni MRS medijum.
10. Dodavanje različitih šećera u modifikovani MRS medijum dovodi do promene proteinskog sastava ćelijskog zida *Lb. rhamnosus* BGHV719, kao i do promene mukoidnosti soja *Lb. rhamnosus* BGHV954.



VI LITERATURA

1. Adams MR. 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *J Biotechnol* **68**: 171–178.
2. Ahn C, Collins-Thompson D, Ducan C and Stiles ME. 1992. Mobilization and location of the genetic determinant of chloramphenicol resistance from *Lactobacillus plantarum* CATC2R. *Plasmid* **27**: 169-176.
3. Ambrose KD, Nisbet R and Stephens DS. 2005. Macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae* is mediated by a dual efflux pump (mel and mef) and is erythromycin inducible. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 4203-4209.
4. Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N and Mackie RI. 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ Microbiol* **67**: 22-32.
5. Andrews JM for the BSAC Working Party on Sensitivity Testing. 2000. Effect of medium composition on the MIC breakpoint for gentamicin. *J Antimicrob Chemother* **46**: 851-852.
6. Antonio MAD, Hawes SE and Hiller SL. 1999. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis* **180**: 1950-1956.
7. Arévalo MA, Tejedor F, Polo F and Ballesta JP. 1988. Protein components of the erythromycin binding site in bacterial ribosomes. *J Biol Chem* **263**: 58-63.

8. Arthur M, Reynolds P and Courvalin P. 1996. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol* **4**: 401-407.
9. Asahara T, Takahashi M, Nomoto K, Takayama H, Onoue M, Morotomi, Tanaka MR, Yokokura T and Yamashita N. 2003. Assessment of safety of *Lactobacillus* strains based on resistance to host innate defense mechanisms. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**: 169–173.
10. Austin DJ, Kakehashi M and Anderson RM. 1997. The transmission dynamics of antibiotic-resistant bacteria: the relationship between resistance in commensal organisms and antibiotic consumption. *Proc R Soc Lond B* **264**: 1629-1638.
11. Axelsson L. 1998. Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. Lactic acid bacteria- Microbiology and functional aspects (S. Salminen, A. von Wright, eds) New York. Marcel Dekker. pp 1-72.
12. Beveridge TJ and Graham LL. 1991. Surface layers of bacteria. *Microbiol Rev* **55**: 684-705.
13. Blake DP, Hillman K, Fenton DR and Low JC. 2003. Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the *Enterobacteriaceae* under ileal conditions. *J Appl Microbiol* **95**: 428-436.
14. Bolam DN, Roberts S, Proctor MR, Turkenburg JP, Dodson EJ, Martinez-Fleites C, Yang M, Davis BG, Davies GJ and Gilbert HJ. 2007. The crystal structure of two macrolide glycosyltransferases provides a blueprint for host cell antibiotic immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 5336-5341.

15. Bonhoeffer S, Lipstich M and Levin BR. 1997. Evaluating treatment protocols to prevent antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 12106-12111.
16. Boonaert CJ and Rouxhet PG. 2000. Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2548-2550.
17. Boot HJ, Kolen CPAM, van Noort JM and PH Pouwels. 1993. S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356: purification, expression in *Escherichia coli*, and nucleotide sequence of the corresponding gene. *J Bacteriol* **175**: 6089-6096.
18. Boris S, Suarez JE, Vazquez F and Barbes C. 1998. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect Immunity* **66**: 1985-1989.
19. Bouton Y, Guyot P, Beuvier E, Talliez P and Grappin R. 2002. Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative lactobacilli during Comte cheese ripening. *Int J Food Microbiol* **76**: 27-38.
20. Boyd MA, Antonio MA and Hillier SL. 2005. Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species. *J Clin Microbiol* **43**: 5309-5311.
21. Byin R, Nadkarni MA, Chhour KL, Martin FE, Jacques NA and Hunter N. 2004. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol* **42**: 3128-3136.
22. Canchaya C, Claesson MJ, van Sinderen GD and O'Toole PW. 2006. Diversity of the genus *Lactobacillus* comparative genomics of five species. *Microbiology* **152**: 3185-3196.

23. Cannon JP, Lee TA, Bolanos JT and Danziger LH. 2005. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**: 31-40.
24. Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgen-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. 2002. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**: 340-348.
25. Cataloluk O and Gogebakan B. 2004. Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey. *FEMS Microbiol Lett* **236**: 7-12.
26. Cerning J, Bouillanne C, Landon M and Desmazeaud M. 1992. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* **75**: 692-699.
27. Cerning J, Renard CMGC, Thibault JF, Bouillanne C, Landon M, Desmazeaud M and Topisirovic L. 1994. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3914-3919.
28. Champney WS and Tober CL. 1999. Superiority of 11,12 carbonate macrolide antibiotics as inhibitors of translation and 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells. *Curr Microbiol* **38**: 342-348.
29. Charteris, WP, Kelly PM, Morelli L and Collins JK. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot* **61**: 1636-1643.
30. Chhabra SR, Shockley KR, Connors SB, Scott K, Wolfinger RD and Kelly RM. 2002. Carbohydrate-induced differential gene expression patterns in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J Biol Chem* **278**: 7540-7552.

31. Choi SY, Chang CE and So JS. 2003. Antimicrobial susceptibility and strain prevalence of Korean vaginal *Lactobacillus* spp. *Anaerobe* **9**: 277-280.
32. Chopra I and Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 232-260.
33. Claesson MJ, van Sinderen D and O'Toole PW. 2007. The genus *Lactobacillus* – a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters* **269**: 22-28.
34. Clermont D, Chesneau O, DeCespedes G and Horaud T. 1997. New tetracycline resistance determinants coding for ribosomal protection in streptococci and nucleotide sequence of *tet*(T) isolated from *Streptococcus pyogenes* A498. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 112-116.
35. Cohen SP, McMurry LM and Levy SB. 1988. *marA* locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 5416-22.
36. Danielsen M. and Wind A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol* **82**: 1-11.
37. Danielsen M, Andersen HS and Wind A. 2004. Use of folic acid casei medium reveals trimethoprim susceptibility of *Lactobacillus* species. *Lett Appl Microbiol* **38**: 206-210.
38. Davydova N, Streltsov V, Wilce M, Liljas A and Garber M. 2002. L22 ribosomal protein and effect of its mutation on ribosome resistance to erythromycin. *J Mol Biol* **322**: 635-644.

39. Deghorian M, Goffin P, Fontaine L, Mainardi JL, Daniel R, Errington J, Hallet B, Hols P, Lesard IA and Walsh CT. 2007. VanX, a bacterial D-alanyl-D-alanine dipeptidase: resistance, immunity, or survival function? *J Bacteriol* **96**: 11028-11032.
40. Delcour J, Ferain T, Deghorian M, Palumbo E and Hols P. 1999. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**: 159-184.
41. DeMan JC, Rogosa M and Sharpe ME. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* **23**: 130-135.
42. Douthwaite S and Aagard C. 1993. Erythromycin binding is reduced in ribosomes with conformational alternations in the 23S rRNA peptidyl transferase loop. *J Mol Biol* **3**: 725-731.
43. Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM and Holmes KK. 1989. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* **27**: 251-256.
44. Egervärn M, Danielsen M, Roos S, Lindmark H and Lindgreen S. 2006. Antibiotic susceptibility testing profiles of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*. *J Food Prot* **70**: 412-418.
45. Engelhardt H and Peters J. 1998. Structural research on surface layers: a focus on stability, surface layer homology domains, and surface layer-cell wall interactions. *J Struct Biol* **124**: 276-302.
46. Falagas ME, Betsi GI and Athanasov S. 2006. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother* **58**: 266-272.

47. Farrell DJ, Douthwaite S, Morrissey I, Bakker S, Poehlsgaard J, Jakobsen L, and Felmingham D. 2003. Macrolide resistance by ribosomal mutation in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT 1999-2000 study. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1777-1783.
48. Felten A, Barreau C, Bizet C, Lagrange PH and Philippon A. 1999. *Lactobacillus* species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. *J Clin Microbiol* **37**: 729–733.
49. Fitzsimons NA, Cogan TM, Condon S and Beresford T. 1999. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3418–3426.
50. Flórez AB, Ladero V, Alvarez-Martin P, Ammor MS, Alvarez MA and Mayo B. 2007. Acquired macrolide resistance in the human intestinal strain *Lactobacillus rhamnosus* E41 associated with a transition mutation in 23S rRNA genes. *Int J Antimicrob Agents* **30**: 341-344.
51. Gasser, F. 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull Inst Pasteur* **92**: 45-67.
52. Gasson MJ. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO712 and other *lactis* streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol* **154**:1-9.
53. Gevers D, Huys G and Swings J. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett* **205**: 31-36.
54. Gevers D, Danielsen M., Huys G and Swings J. 2003a. Molecular Characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different Types of fermented dry sausage. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1270–1275.

55. Gevers D, Huys G and Swings J. 2003b. *In vitro* conjugal transfer of tetracyclin resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **225**: 125-130.
56. Gonzales LS and Spencer JP. 1998. Aminoglycosides: a practical review. *Am Fam Physician*. **58**: 1811-1820.
57. Gram HC. 1884. Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schmitt und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Mendizin*. **2**: 185-189.
58. Gupta K, Stapleton AE and Hooton TM. 1988. Inverse association of H₂O₂ producing lactobacilli and vaginal *E. coli* colonization in women with recurrent urinary tract infections. *J Infect Dis* **178**: 446-450.
59. Gutell RR, Gray MW and Schnare MN. 1993. A compilation of large subunit (23S and 23 S-like) ribosomal RNA structures. *Nucleic Acid Res* **21**: 3055-3074.
60. Hamilton-Miller JM and Shah S. 1998. Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Lett Appl Microbiol* **26**: 153-154.
61. Hammes W, Weiss N and Holzapfel W. 1995. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Balows A, Truper H, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, eds. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Applications*. Vol II. 2nd ed. New York, NY: Springer. pp. 1536-1594.
62. Harms J, Schluenzen F, Zarivach R, Bashan A, Gat S, Agmon I, Bartels H, Franceschi F and Yonath A. 2001. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**: 679-688.

63. Harris LJ, Daeschel MA, Stiles ME and Klaenhammer TR. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **52**: 384-387.
64. Havenaar R and Huis in't Veld JH. 1992. Probiotics: a general view. in: Lactic acid bacteria in health and disease (Wood B, ed). Elsevier Applied Science, London, UK. pp. 209-224.
65. Hawes SE, Hillier SL, Benedetti J, Stevens CE, Kousty LA, Wolner-Hanssen P and Holmes KK. 1996. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *J Infect Dis* **174**: 1058-1063.
66. Hawkey PM. 1998. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *British Med J* **317**: 657-660.
67. Hawthorn LA and Reid G. 1990. Exclusion of uropathogen adhesion to polymer surfaces by *Lactobacillus acidophilus*. *J Biomed Mater Res* **24**: 39-46.
68. Hillen W and Berens C. 2002. Tetracyclin-gesteuerte Genregulation: Vom bakteriellen Ursprung zum eukaryotischen Werkzeug (engl.: Tetracycline-controlled gene regulation: from bacterial origin to eukaryotic tool). *Biospektrum* **4**: 355-258.
69. Hillier SL. 1998. Normal vaginal flora. In Sexually transmitted diseases, edited by K. K. Holmes, PF sparling PaMardh, SM Lemon, WE Stamm, P Piot and JM Wasserheit. New York McGraw-Hill. pp. 191-203.
70. Holliman RE and Bone GP. 1988. Vancomycin resistance of clinical isolates of lactobacilli. *J Infect* **16**: 279-283.

71. Hopwood DA, Bibb JM, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydate JD, Smith CP, Ward JM and Schrempf H. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual. Norwich, UK, The John Innes Foundation.
72. Hunt DE, Klepac-Ceraj V, Acinas SG, Gautier C, Bertilsson S, and Polz MF. 2006. Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2221-2225.
73. Huys G, Haene KD and Swings J. 2002. Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with agar overlay disc diffusion method. *Lett Appl Microbiol* **34**: 402-406.
74. Huys G, Haene KD and Swings J. 2006. Genetic basis of tetracycline and minocycline resistance in the potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* strain CCUG 43738. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1550-1551.
75. Jacobsen L, Wilcks A, Hammer K, Huys G, Gevers D and Andersen SR. 2006. 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. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: 158-166.
76. Jensen LB, Frimodt-Moller N and Arestrup FM. 1999. Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiol Lett* **170**: 151-158.
77. Kefford B, Kjelleberg S and Marshall KC. 1982. Bacterial scavenging: utilization of fatty acids localized at a solid-liquid interface. *Arch Microbiol* **133**: 257-260.
78. Kjellberg S and M Hermasson. 1984. Starvation induced effects on bacterial surface characteristics. *Appl Environ Microbiol* **48**: 497-503.

79. Klappenbach JA, Dunbar JM and Schmidt TM. 2000. rRNA Operon Copy Number Reflects Ecological Strategies of Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1328-1333.
80. Klare I, Constabel C, Muller-Bertling S, Reissbrodt R, Huys G, Vancanneyt M, Swings J, Goossens H and Witte W. 2005. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of lactobacilli, pediococci, lactococci, and bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8982-8986.
81. Klare I, Constabel C, Werner G, Huys G, Vankerckhoven V, Kahlmeter H, Hildebrandt B, Müller-Bertling S, Witte W and Goossens H. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J Antimicrob Chemother* **59**: 900-912.
82. Knox JR and Pratt RF. 1990. Different Modes of vancomycin and D-Alanyl-D-Alanine peptidase binding to cell wall peptide and a possible role for the vancomycin resistance protein. *Antimicrob Agents Chemother* **34**: 1342-1347.
83. Kojic M, Svircevic J, Banina A and Topisirovic L. 1991. A bacteriocin-producing strain *Lactococcus lactis* subsps. *diacetylactis* S 50. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1835-1837.
84. Lachlak N, Ageron E, Zampatti O, Michel G and Grimont PAD. 1996. Composition of the *Lactobacillus acidophilus* complex isolated from vaginal flora. *Microbiologica* **19**: 123-132.
85. Larsen N. 1992. Higher order interactions in 23 S rRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5044-5048.
86. Lesard IA and Walsh CT. 1999. VanX, a bacterial D-alanyl-D-alanine dipeptidase: resistance, immunity, or survival function? *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 11028-11032.

-
87. Levy, S.B. 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 695-703.
88. Levy SB. 2002. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* **49**: 25-30.
89. Li XZ, Nikaido LH and Poole K. 1995. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1948-1953.
90. Lortal S, van Heijnoort J, Gruber K and Sleytr B. 1992. S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC12046: isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithium chloride. *J Gen Microbiol* **138**: 611-618.
91. Lozo J, Vukasinovic M, Strahinic I and Topisirovic L. 2004. Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. *J Food Prot* **67**: 2727-2734.
92. Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, Diaz-Muniz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt, F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B and Mills D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 15611-15616.
93. Martin H, Richardson BA, Nyange PM, Lavreys L, Hiller SL, Chohan B, Mandaliya K, Ndunya-Achola JO, Bwao J and Kreiss J. 1999. Vaginal lactobacilli microbial flora and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* **180**: 1863-1868.

-
94. Mascareti OA. 2003. Bacteria versus antibacterial agents, an integrated approach. ASM Press, Washington, D. C. pp 87.
95. Mater DD, Langella P, Corthier G and Flores MJ. 2008. A probiotic *Lactobacillus* strain can acquire vancomycin resistance during digestive transit in mice. *J Mol Microbiol Biotechnol* **14**: 123-127.
96. Mättö J, Suihkoand ML and Saarela M. 2006. Comparison of three test media for antimicrobial susceptibility testing of bifidobacteria using Etest method. *Int J Antimicrob Agents* **28**: 42-48.
97. Mayeux JV, Sandine WWE and Elliker PR. 1962. A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed isolate starter cultures. *J Dairy Sci* **45**: 655-656.
98. Menninger JR. 1995. Mechanism of inhibition of protein synthesis by macrolide and lincosamide antibiotics. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* **B**: 229-250.
99. Millsap KW, van der Mei HC and Busscher HJ. 1996. Physico-chemical and adhesive cell surface properties of *Lactobacillus* strains grown in old formula and new, standardized MRS medium. *J Microbiol Methods* **27**: 239-242.
100. Moazed D and Noller HF. 1987. Chloramphenicol, erythromycin, carbomycin and vernamycin B protect overlapping sites in the peptidyl transferase region of 23S ribosomal RNA. *Biochimie* **69**: 879-884.
101. Morelli L, Sarra PG and Bottazzi V. 1988. *In vivo* transfer of pAM beta 1 from *Lactobacillus reuteri* to *Enterococcus faecalis*. *J Appl Bacteriol* **65**: 371-375.
102. Morelli L, Zonenenschain D, Del Piano M and Cognein P. 2004. Utilization of the intestinal tract as a delivery system for urogenital probiotics. *J Clin Gastroenterol* **38**: 107-110.

103. Morse SA, Johnson SR, Biddle JW and Roberts MC. 1986. High level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* acquisition of streptococcal tetM determinant. *Antimicrob Agents Chemother* **30**: 664-670.
104. Mundt JO and Hammer JL. 1968. Lactobacilli on plants. *Appl Microbiol* **16**: 1326-1330.
105. Nagarajan R. 1991. Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 605-609.
106. Nash KA and Inderlied CB. 1995. Genetic basis of macrolide resistance in *Mycobacterium avium* isolated from patients with disseminated disease. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2625-2630.
107. Nguyen TN, Ejaz AD, Brancieri MA, Mikula AM, Nelson KE, Gil SR and Noll KM. 2004. Whole-genome expression profiling of *Thermotoga maritima* in response to growth on sugars in a chemostat. *J Bacteriol* **186**: 4824-4828.
108. Nikaido H. 1996. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **178**: 5853-5859.
109. Ocaña VS, Bru E, de Ruiz Holgado AA and Nader-Macías ME. 1999. Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. *J Gen Appl Microbiol* **45**: 203-212.
110. Oram M and Fisher LM. 1991. 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 387-389.

111. Organizing Committee of the Lactic acid Bacteria industrial Platform Workshop. 1994. On the safety of lactic acid bacteria. report on the workshop Safety of lactic acid bacteria, p 2-8. Unilever Research Laboratorium, Vlaardingen, The Netherlands.
112. Ouwehand AC, Salminen S and Isolauri E. 2002. Probiotics: An overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**: 279–289.
113. Pardo D and Rosset R. 1977. Properties of ribosomes from erythromycin resistant mutants of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **156**: 267-271.
114. Paulsen IT, Littlejohn TG, Radstrom P, Sundstrom L, Skold O, Swedberg G and Skurray RA. 1993. The 39 conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:761–768.
115. Pelletier C, Bouley C, Cayalea C, Bouttier S, Bourlioux P and Bellon-Fontaine MN. 1997. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol* **63**:1725-1731.
116. Petronella JL, Boels IC, Kleebezem M and Hugenholtz J. 1999. Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5003-5008.
117. Pigeon RM, Cuesta EP and Gilliland SEG. 2002. Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria. *J Dairy Sci* **85**: 2705-2710.
118. Rao GG, Short A and Carmichael D. 1990. CAPD peritonitis caused by vancomycin resistant lactobacilli. *Nephrol Dial Transplant* **5**: 235-236.

119. Redondo-Lopez V, Cook RL and Sobel JD. 1990. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis* **12**: 856-872.
120. Reid G, Cuperus PL, Bruce AW, Van der Mei HC, Tomczek L, Khoury AH and Busscher HJ. 1992. Comparison of contact angles and adhesion to hexadecane of urogenital, dairy and poultry lactobacilli: effect of serial culture passages. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1549-1553.
121. Reid G and Bruce AW. 2003. Urogenital infections in women: can probiotics help? *Postgrad Med J* **79**: 428-432.
122. Reid G, Beuerman D, Heinemann C and Bruce AW. 2001. Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immuno Med Microbiol* **32**: 37-41.
123. Reid G, Jass J, Sebulsky MT and McCormick JK. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Reviews* **16**: 658-672.
124. Rönqvist D, Forsgren-Brusk U, Husmark U and Håkansson EG. 2007. *Lactobacillus fermentum* Ess-1 unique growth inhibition of vulvo-vaginal candidiasis pathogens. *J Med Microbiol* **56**: 1500-1504.
125. Salton M and Shockman GD. 1981. β -lactam Antibiotics: Mode of Action, New Developments, and Future Prospects. Academic Press, Inc., New York, N. Y.
126. Sara M. and Sleytr BU. 1996. Crystalline bacterial cell surface layers (S-layers): from cell structure to biomimetics. *Prog Biophys Mol Biol* **65**: 83-111.
127. Salyers AA, Gupta A and Wang YP. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.* **12**: 412-416.

128. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
129. Schär-Zammaretti P and Ubbnik, J. 2003. The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophysical J* **85**: 4076-4092.
130. Schär-Zammaretti P, Dillmann ML, D'Amico N, Affolter M and Ubbnik J. 2005. Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8165-8173.
131. Schleifer CR, Benz RL, McAlack J, Poupard J and Calmon J. 1989. *Lactobacillus acidophilus* peritonitis in CAPD. *Perit Dial Int* **9**: 222-223.
132. Schlützen, F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Franceschi F and Yonath A. 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* **102**: 615-623.
133. Schlützen F, R Zarivach R, Harms J, Bashan A, Tocilj A, Abrecht R, Yonath A and Franceschi F. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **413**: 814-821.
134. Sevin E, Lamarque D, Delchier JC, Soussy CJ and Tankovic J. 1998. Co-detection of *Helicobacter pylori* and of its resistance to clarithromycin by PCR. *FEMS Microbiol Lett* **165**: 369-372.
135. Shulze H and Nierhaus KH. 1982. Minimal set of ribosomal components for reconstitution of the peptidyltransferase activity *EMBO J* **1**: 609-613.
136. Sigmund CD, Ettayebi M, Borden A and Morgan EA. 1988. Antibiotic resistance mutations in ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Meth Enzym* **164**: 673-690.

-
137. Skinener R and E. Cundliffe. 1982. Dimethylation of adenine and the resistance of *Streptomyces erythraea* to erythromycin. *J Gen Microbiol* **128**: 2411-2416.
138. Sleytr UB and Beveridge TJ. 1999. Bacterial S-layers. *Trends Microbiol* **B**: 253-260.
139. Smit E, Oling F, Demel R, Martinez B and Pouwels PH. 2001. The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: identification and characterisation of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding. *J Mol Biol* **305**: 245-257.
140. Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
141. Speer BS, Shoemaker NB and Salyers AA. 2001. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev.* **5**:387-399.
142. Steiner G, Kuechler E and Barta A. 1988. Photo-affinity labelling at the peptidyl transferase centre reveals two different positions for the A- and P-sites in domain V of 23S rRNA. *EMBO J* **7**: 3949-3955.
143. Stiles ME. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**: 331-345.
144. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G and W Witte. 2003. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **41**: 4089-4094.
145. Sutherland IW. 1972. Bacterial exopolysaccharides. *Adv Microb Physiol* **8**: 143-212.

146. Swenson JM, Facklam RR and Thornsberry C. 1990. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Lactobacillus* species. *Antimicrob Agents Chemother* **34**: 543–549.
147. Tannock GW 1987. Conjugal transfer of plasmid pAM beta 1 in *Lactobacillus reuteri* and between lactobacilli and *Enterococcus faecalis*. *Appl Environ Microbiol* **53**: 2693-2695.
148. Tenorio C, Zarazaga M, Martinez C and Torres C. 2001. Bifunctional enzyme 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase-2"-O-aminoglycoside phosphotransferase in *Lactobacillus* and *Pediococcus* isolates of animal origin. *J Clin Microbiol* **39**: 824-825.
149. Tenover FC. 2006. Mechanisms of bacterial resistance in bacteria. *Am J Med* **119**: S3-S10.
150. Tomeczek L, Reid G, Cuperus PL, McGroarty JA, van der Mei HC, Bruce AW, Khourt AE and Busscher HJ. 1992. Correlation between hydrophobicity and resistance to nonoxynol-9 and vancomycin for urogenital isolates of lactobacilli. *FEMS Microbiol Lett* **73**: 101-104.
151. Tynkkynen S, Singh KV and Varmanen P. 1998. Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (*van*) genes. *Int J Food Microbiol* **41**: 195-204.
152. Tynkkynen S, Satokari R, Saarela M, Mattila-Sandholm T and Saxeli M. 1999. Comparison of Ribotyping, Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* Strains. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3908–3914.

-
153. Vadillo-Rodríguez V, Busscher HJ, Norde W, de Vries J and van der Mei HC. 2004. Dynamic Cell Surface Hydrophobicity of *Lactobacillus* Strains with and without Surface Layer Proteins. *J Bacteriol* **186**: 6647-6650.
154. Vancanneyt M, Huys G, Lefebvre K, Vankerckhoven V, Goossens H and Swings S. 2006. Intraspecific genotypic characterization of *Lactobacillus rhamnosus* strains intended for probiotic use and isolates of human origin. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5376-5383.
155. Vankerckhoven V, Huys G, Vancanneyt M, Vael C, Klare I, Romond MB, Entenza JM, Morellion P, Wind RD, Knol J, Wiertz E, Pot B, Vaughan EE, Kahlmeter G and Goossens H. 2008. Biosafety assesment of probiotics used for human consumption: Recommendations from EU-PROSAFE project. *Trends Food Sci Technol* **19**: 102-114.
156. Van Veen HW, Margolles A, Putman M, Sakamoto K and Konings WN. 1999. Structure-function analysis of multidrug transporters in *Lactococcus lactis*. *Biochim Biophys Acta* **1461**: 201-206.
157. Vasquez A. 1975. *Inhibitors of protein synthesis*. Springer, Berlin.
158. Vasquez A, Jakobsson T, Ahrne S, Forsum U and Molin G. 2002. Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women. *J Clin Microbiol* **40**: 2746-2749.
159. Velraeds MCM, van der Mei HC, Reid G and Busscher HJ. 1996. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1958-1963.
160. Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ and Lupski JR. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Meth Cell Mol Biol* **5**: 25-40.

161. Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, Griffy MV, Beyer J, Flamm RK, Tanaka SK, Graham DY and Go MF. 1996. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 477-480.
162. Wadström T, Andersson K, Sydow M, Axelsson L, Lindgren S and Gullmar B. 1987. Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J Appl Bacteriol* **62**: 513-520.
163. Weisblum B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 577-585.
164. Wright GD. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature* **5**: 175-186.
165. Yonath A. 2005. Ribosomal crystallography: peptide bond formation, chaperone assistance and antibiotics inactivation. *Mol Cells* **20**: 1-16.
166. Yoshizawa S, Fourmy D and Puglisi JD. 1998. Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J* **17**: 6437-48.
167. Zárata G, Santos V and Nader-Macias ME. 2007. Protective effect of vaginal *Lactobacillus paracasei* CRL 1289 against urogenital infection produced by *Staphylococcus aureus* in mouse animal model. *Infect Dis Obstetrics Gynecol* doi:10.1155/2007/48358.
168. Zhou X, Bents SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR and Forney LJ. 2004. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology* **150**: 2565-2573.



169. Zilhao R, Papadopoulou B and Courvalin P. 1988. Occurrence of the *Campylobacter* resistance gene *tet(O)* in *Enterococcus* and *Streptococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* **32**: 1793-1796.



РД 20153



300154079

СОBISS •



1511 20153