

# Sastav bakterijske mikrobiote darovanog humanog mlijeka

---

**Novoselac, Jurjana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2025**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:282851>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Jurjana Novoselac**

**Sastav bakterijske mikrobiote  
darovanog humanog mlijeka**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2025.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Jurjana Novoselac**

**Sastav bakterijske mikrobiote  
darovanog humanog mlijeka**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2025.**

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelji rada: Branka Golubić Čepulić, Zrinka Bošnjak

Zahvaljujem mentoricama jer su prepoznale i podržale moju ljubav prema humanom mlijeku.

Hvala svim darivateljicama koje su dale najbolje od sebe da pomognu najugroženijoj novorođenčadi.

Hvala svim djelatnicima Kliničkog zavoda za transfuziju Kliničkog bolničkog centra Zagreb na podršci i lijepim riječima, posebno djelatnicama Banke humanog mlijeka.

Hvala mojoj obitelji za svu pomoć u studiranju i istraživanju.

Hvala dragom Bogu što me stavio tu gdje jesam.

Posvećujem ovaj rad svojim kćerima Đurđici, Zori i Rajni te suprugu Lovri. Bez vas četvero ne bih znala koliko je moguće voljeti.

## SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD I SVRHA RADA.....</b>	<b>1</b>
1.1.	Majčino mlijeko.....	1
1.2.	Bakterije u majčinom mlijeku.....	1
1.2.1.	Porijeklo bakterija u majčinom mlijeku.....	4
1.2.2.	Bakterijska mikrobiota majčinog mlijeka.....	5
1.2.3.	Utjecaj na sastav bakterijske mikrobiote majčinog mlijeka..	7
1.2.4.	Probiotičke bakterije u majčinom mlijeku.....	8
1.3.	Izolacija i identifikacija bakterija u majčinom mlijeku.....	9
1.3.1.	Mikrobiološka kultivacija.....	10
1.3.2.	MALDI-TOF identifikacija.....	11
1.3.3.	Molekularne metode – sekvenciranje nove generacije.....	12
1.4.	Banka humanog mlijeka.....	15
1.4.1.	Darivateljice humanog mlijeka.....	16
1.4.2.	Obrada i testiranje darovanog humanog mlijeka.....	18
1.4.3.	Mikrobiota darovanog humanog mlijeka.....	20
<b>2.</b>	<b>HIPOTEZA.....</b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>22</b>
3.1.	Opći cilj.....	22
3.2.	Specifični ciljevi.....	22
<b>4.</b>	<b>MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>23</b>
4.1.	Ispitanice i uzorci.....	23
4.2.	Ispitivana obilježja.....	23
4.3.	Određivanje prehrambene vrijednosti darovanog humanog mlijeka.....	24
4.4.	Metode kultivacije darovanog humanog mlijeka.....	25
4.5.	Izolacija bakterijske DNA iz uzoraka darovanog humanog mlijeka....	26
4.6.	Sekvenciranje nove generacije.....	27
4.7.	Statistička analiza.....	29
<b>5.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>31</b>
5.1.	Deskriptivna statistička analiza ispitanica i uzoraka.....	31
5.2.	Rezultati kultivacije uzoraka darovanog humanog mlijeka.....	35

5.3.	Rezultati sekvenciranja nove generacije izolirane bakterijske DNA iz uzoraka darovanog humanog mlijeka.....	39
5.4.	Povezanost sastava bakterijske mikrobiote darovanog humanog mlijeka s obilježjima darivateljica.....	46
5.5.	Povezanost sastava bakterijske mikrobiote darovanog humanog mlijeka s obilježjima djece darivateljica.....	56
5.6.	Povezanost sastava bakterijske mikrobiote s obilježjima mlijeka.....	62
5.7.	Povezanost $\alpha$ i $\beta$ mjera raznolikosti napredne analize sekvenciranja nove generacije s ispitivanim obilježjima.....	78
5.8.	Probiotičke bakterije u darovanom humanom mlijeku.....	85
6.	RASPRAVA.....	91
7.	ZAKLJUČAK.....	102
8.	SAŽETAK.....	103
9.	SUMMARY.....	104
10.	POPIS LITERATURE.....	105
11.	ŽIVOTOPIS.....	117

## POPIS OZNAKA I KRATICA

AMP – adenzin monofosfat (engl. Adenosine Monophosphate)

BHM – banka humanog mlijeka

bTEFAP – pirosekvenciranje bakterija oznakom kodiranog FLX amplicona (engl. Bacterial Tag-Encoded FLX Amplicon Pyrosequencing)

BLAST – osnovni alat za pretraživanje lokalnih svrstavanja (engl. Basic Local Alignment Search Tool)

BMK – bakterije mliječne kiseline

BP – parovi baza (engl. Base Pairs)

CFU – jedinice koje formiraju kolonije (engl. Colony Forming Units)

CI – interval pouzdanosti (engl. Confidence Interval)

CS – carski rez (engl. Cesarean Section)

DHM – darovano humano mlijeko

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. Deoxyribonucleic Acid)

GD – gestacijska dob djeteta u tjednima

HIV – virus humane imunodeficijencije

HMM – mikrobiota humanog mlijeka (engl. Human Milk Microbiota)

ITM – indeks tjelesne mase

ISO – međunarodna organizacija za standardizaciju (engl. International Organization for Standardization)

JIL – jedinica intenzivnog liječenja

KA – krvni agar

KBC – klinički bolnički centar

MALDI-TOF – matriksom posredovana laserska desorpcija/ionizacija vrijeme preleta (engl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight)

MM – majčino mlijeko

MR – Molecular Research, naziv laboratorija

MRS – De Man, Rogosa i Sharpe

NCBI – nacionalni centar za biotehnoške informacije Sjedinjenih Američkih država (engl. National Center for Biotechnology Information)

NEK – nekrotizirajući enterokolitis

NGS – sekvenciranje nove generacije (engl. Next Generation Sequencing)

OR – omjer vjerojatnosti (engl. Odds Ratio)

OTU – operativna taksonomska jedinica (engl. Operational Taxonomic Unit)

PCoA – analiza glavnih koordinata (engl. Principal Coordinates Analysis)

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. Polymerase Chain Reaction)

PD – filogenetska raznolikost (engl. Phylogenetic Diversity)

QIIME – kvantitativni uvid u mikrobiološku ekologiju (engl. Quantitative Insights Into Microbial Ecology)

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina (engl. Ribosomal Ribonucleic Acid)

SAD – Sjedinjene Američke Države

SSU – manja podjedinica (engl. Small Subunit)

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TOS – transgalaktozilirani oligosaharidi (engl. Transgalactosylated Oligosaccharides)

UH – ugljikohidrati

WGS – sekvenciranje cijeloga genoma (engl. Whole Genome Sequencing)

zOTU – operativne taksonomske jedinice nultog radijusa (engl. zero radius Operational Taxonomic Units)



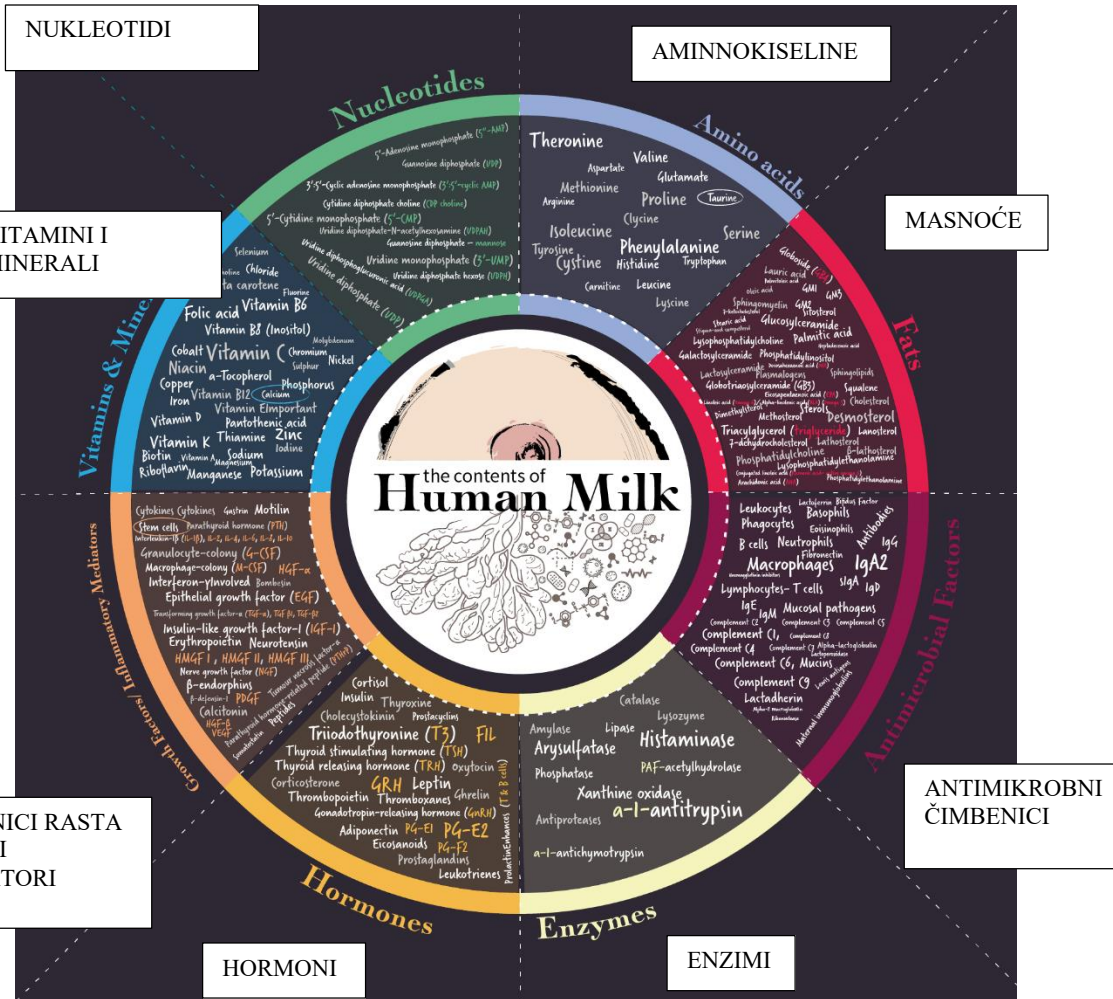
# **1. UVOD I SVRHA RADA**

## **1.1. Majčino mlijeko**

Majčino mlijeko (MM) je zlatni standard za prehranu novorođenčadi i dojenčadi. MM je prilagođeno potrebama djeteta, optimalno je probavljivo, štiti majku i dijete od niza bolesti, potiče njihovu emocionalnu povezanost te je i ekonomski najpovoljnije za obitelji i društvo (1). Sastav mlijeka je promjenjiv te se tijekom razdoblja laktacije prilagođava potrebama djeteta. U njemu se nalazi mnogo sastavnica važnih za zdravi rast i razvoj djece (Slika 1.). Optimalno trajanje isključivog dojenja odnosno hranjenja MM-om je 6 mjeseci, a nakon toga se preporučuje nastaviti s dojenjem do dvije godine i duže uz dohranu krutom hranom (2-4). Djeca hranjena MM-om imaju smanjeni rizik pojave brojnih bolesti i stanja, ovisno o trajanju dojenja odnosno isključivosti prehrane MM-om (Tablica 1.). Za majke koje doje također postoje brojne dobrobiti i zaštitni čimbenici dojenja, od kojih su najvažnije manji rizik oboljenja od karcinoma dojke, jajnika, šećerne bolesti, hipertenzije i moždanog udara (5).

## **1.2. Bakterije u majčinom mlijeku**

Do početka 21. stoljeća MM smatrano je sterilnim (6). Mikroorganizmi su se, kao važne bioaktivne sastavnice mlijeka, počeli istraživati u drugoj polovici 20. stoljeća kada je dokazano da se dojenjem može prenijeti infekcija. Kasnija istraživanja su pokazala da se i u zdravom ljudskom mlijeku nalaze bakterije, što je dovelo do sve većeg zanimanja za istraživanje ovog područja.



Slika 1. Sastavnice humanog mlijeka

Izvor: <https://humanmilkfoundation.org/wpcontent/uploads/2022/05/SNVQcN3w.png>  
 Preuzeto 20.01.2024.

Metodama koje se temelje na kultivaciji mlijeka utvrđeno je da se dnevnom prehranom s 800 mL MM-a unese  $10^4$  do  $10^6$  bakterija, dok ih se, prema molekularnim metodama, unese i do 100 puta više –  $10^7$  do  $10^8$  (7, 8). MM sa svojom raznolikom mikrobiotom i prilagođenim prehrambenim sastavom doprinosi razvoju crijevne mikrobiote i time direktno utječe na razvoj imunološkog sustava djeteta (9, 11). Bakterije iz MM-a utječu na metabolizam hranjivih tvari te služe kao probiotici (6). Probiotičke bakterije izolirane iz mlijeka pokazale su se vrlo učinkovitim u liječenju upale dojke – mastitisa (12). Mastitis, prema brojnim istraživanjima, ima u podlozi disbiozu, odnosno promijenjenu ravnotežu mikrobiote dojke koja dovodi do lokalne upale i kliničke bolesti (9, 11).

Tablica 1. Dobrobiti prehrane majčinim mlijekom i smanjenje rizika od pojave bolesti ili stanja u odnosu na trajanje prehrane MM-om

STANJE	% SMANJENJA RIZIKA <sup>a</sup>	TRAJANJE DOJENJA	NAPOMENA
Upala srednjeg uha	23	Bilo koje	/
Upala srednjeg uha	50	≥ 3 ili 6 mj	Isključivo dojenje
Rekurentna upala srednjeg uha	77	Isključivo dojenje ≥ 6mj <sup>b</sup>	Usporedba s dojenjem 4-6 mj
Infekcija gornjih dišnih puteva	63	> 6 mj	Isključivo dojenje
Infekcija donjih dišnih puteva	72	≥ 4 mj	Isključivo dojenje
Infekcija donjih dišnih puteva	77	Isključivo dojenje ≥ 6 mj <sup>b</sup>	Usporedba s dojenjem 4-6 mj
Astma	40	≥ 3 mj	Obiteljska anamneza atopije
Astma	26	≥ 3 mj	Bez obiteljske anamneze atopije
RSV bronhiolitis	74	> 4 mj	/
Nekrotizirajući enterokolitis	77	Boravak u jedinici intenzivnog liječenja	Prijeterminska dojenčad; isključivo humano mlijeko
Atopijski dermatitis	27	> 3 mj	Isključivo dojenje, negativna obiteljska anamneza
Atopijski dermatitis	42	> 3 mj	Isključivo dojenje, pozitivna obiteljska anamneza
Gastroenteritis	64	Bilo koje	/
Upalna bolest crijeva	31	Bilo koje	/
Pretilost	24	Bilo koje	/
Celijakija	52	> 2 mj	Izloženost glutenu uz dojenje
Tip 1 šećerne bolesti	30	> 3 mj	Isključivo dojenje
Tip 2 šećerne bolesti	40	Bilo koje	/
Akutna limfatična leukemija	20	> 6 mj	/
Akutna mijeloična leukemija	15	> 6 mj	/
SIDS	36	Bilo koje > 1 mj	/

a- Niži rizik se odnosi na usporedbu dojenih prema djeci hranjenoj dojenačkim mliječnim pripravkom ili referentnoj skupini; b-Referentna skupina jesu isključivo dojeni ≥6 mjeseci; RSV - respiratorni sincicijski virus; SIDS - sindrom iznenadne dojenačke smrti

Izvor: <https://www.aap.org/en/patient-care/newborn-and-infant-nutrition/newborn-and-infant-breastfeeding/>

Pristupljeno 23.01.2024.

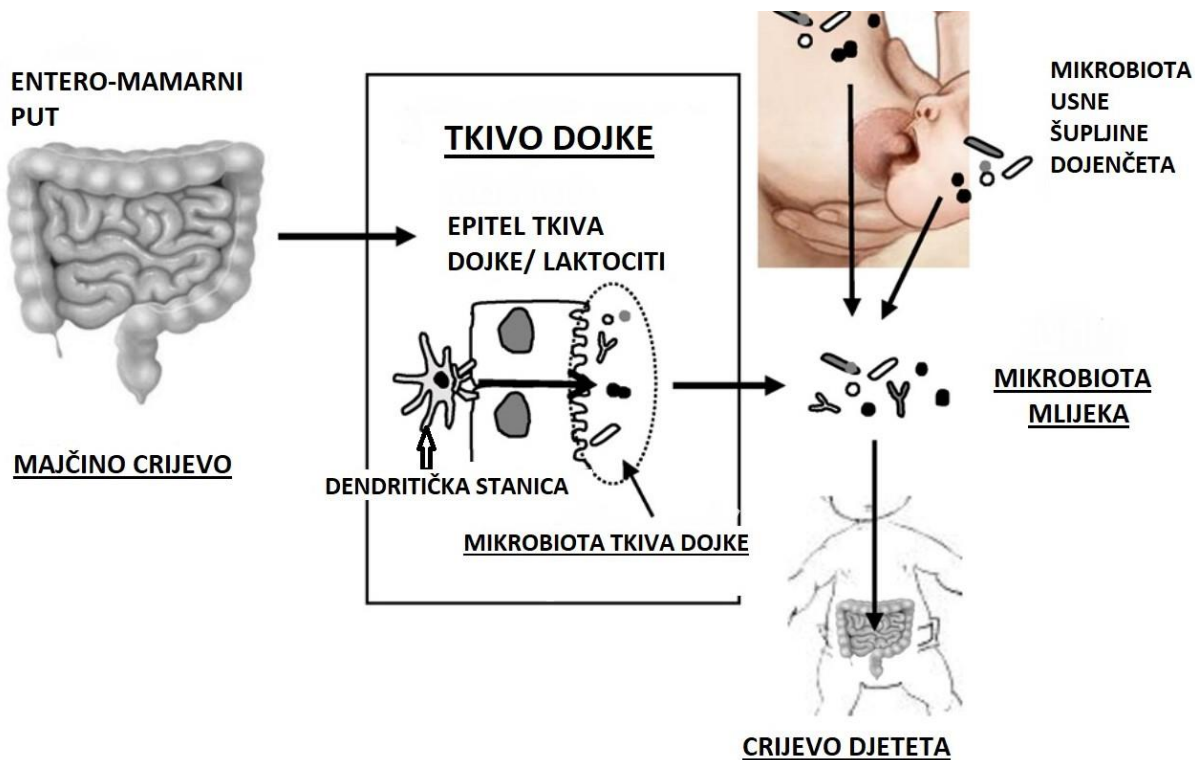
### **1.2.1. Porijeklo bakterija u majčinom mlijeku**

Nekoć se smatralo da su bakterije nađene u mlijeku kontaminacija s kože dojke ili usne šupljine dojenčeta (13). Razlog tome je bio čest izostanak njihove izolacije iz dojki žena s kliničkom slikom mastitisa, kao i korištenje klasične tehnike mikrobiološke kulture kojom su se detektirale samo pojedine bakterije (4). Istraživanje na uzorcima mlijeka prikupljenog u aseptičnim uvjetima krajem trudnoće, prije izlaganja usnoj šupljini odnosno koži, pokazalo je prisutnost bakterija koje se smatraju dijelom mikrobiote zrelog mlijeka (14).

Kako je prikazano na Slici 2., dio bakterija u mlijeko dopijeva s kože dojke i iz usne šupljine dojenčeta retrogradnim utokom (15). Druga dva izvora su tkivo dojke i crijevo majke iz kojeg bakterije u dojku dopijaju enteromamarnim putem preko dendritičkih stanica odnosno limfnog sustava (9, 16). Smatra se da mikrobiota tkiva dojke u eubiozi doprinosi zdravlju dojki, a disbioza pojavi mastitisa, pa čak dugoročno i pojavnosti raka dojke, jer se mikrobiota normalnog tkiva dojke razlikuje u odnosu na onu tkiva uzetog tijekom operacija dobroćudnih i zloćudnih promjena (4). Prema Rodriguezu, utjecaj na bakterijsku mikrobiotu mlijeka može imati i koža dojenčeta, okoliš majke, njezin partner te mikrobiota izdajalice (16).

Žljezdano tkivo dojke svoju punu zrelost i funkciju dobiva tijekom laktacije, za što se priprema tijekom puberteta i trudnoće. Pod utjecajem hormona tijekom trudnoće, u žljezdanom se tkivu umnožavaju kanalići i alveole, spremaju se za stvaranje te mogu i izlučivati manje količine mlijeka. Povećana opskrba limfom i krvlju može doprinijeti prisustvu endogenih bakterija, što stvara uvjete za nastajanje bakterijskog biofilma na bradavici i u kanalićima dojke (9).

Isključivi anaerobi, kao što su bifidobakterije, u mlijeko dopijevaju iz probavnog sustava majke, procesom koji se naziva translokacija, a koji može biti i fiziološki i patološki (17). U prilog translokaciji govori i to da su i metodama kultivacije i molekularnim, odnosno metodama otkrivanja deoksiribonukleinske kiseline (engl. Deoxyribonucleic Acid, DNA) nađene iste bakterije u uzorcima stolice majke, MM-a i stolice dojenčeta (18).



Slika 2. Porijeklo bakterija u majčinom mlijeku

Izvor: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S104366181200165X?via%3Dihub>  
Preuzeto: 04.02.2024.

### 1.2.2. Bakterijska mikrobiota majčinog mlijeka

Istraživanja humanog mikrobioma pokazala su da je svaki čovjek koloniziran jedinstvenom mikrobiotom, odnosno da posjeduje jedinstveni mikrobiom u kojem se 99 % gena odnosi na one iz bakterija (19, 20).

Mikrobiota je zajednica svih mikroorganizama koji se nalaze u pojedinom dijelu ljudskog tijela, odnosno tjelesnih tekućina. Raznolikost mikrobnih zajednica je karakteristična za svaku mikrobnu nišu ljudskog tijela. Nije moguće naći dva čovjeka identična po sastavu mikrobiote, ali postoje sličnosti među rasama, srođnicima i etničkim skupinama, a na varijabilnost mogu utjecati razlike u zemljopisnim podnebljima te stil života (21). Zbog varijabilnosti je teško odrediti što je zdrava mikrobiota. Pretpostavlja se da se danas infektivne bakterijske bolesti razvijaju češće zbog disbioze – narušene ravnoteže mikrobiote, nego zbog patogenosti pojedine bakterije (22).

Zanimanje istraživača za bakterije u MM-u razvijalo se usporedno s otkrivenom ulogom ljudskog mikrobioma u zdravlju i bolestima te s napretkom metoda dostupnih za

proučavanje. Uspoređujući broj somatskih stanica i bakterija u uzorcima MM-a, nije nađena korelacija, što govori u prilog izostanka imunološkog odgovora na prisutnost bakterija u mlijeku (8). Prema istom istraživanju, određeni sastav mikrobiote mlijeka, a ne količina bakterija, dovodi do imunološkog odgovora, odnosno upale u tkivu dojke (8).

Mikrobiota humanog mlijeka (engl. Human Milk Microbiota, HMM) je jedinstvena i specifična, u njoj je identificirano više od 800 vrsta bakterija od kojih je 300 nađeno isključivo u mlijeku, ne i drugim mikrobnim nišama ljudskog tijela (11). Većina bakterijskih vrsta u mlijeku su fakultativni anaerobi ili isključivi aerobi, ali dokazani su i isključivi anaerobi koji se povezuju s crijevom kao izvorom (11).

Devet bakterijskih rodova smatra se dijelom srži mikrobiote mlijeka – *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Sphingomonas* i *Bradyrhizobiaceae* (23). Drugi pregledni radovi tu navode i bakterije iz rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Rothia*, *Cutibacterium*, *Veillonella* i *Bacteroides*, odnosno i *Acidovorax*, *Clostridium*, *Escherichia/Shigella* i *Gemella* (24, 25). Izostanak suglasja oko srži mikrobiote mlijeka pripisuje se načinu uzorkovanja i pohrane mlijeka, kao i protokolu izolacije bakterijske DNA, regije koja se sekvencira i populacije iz koje se uzimaju uzorci (25-27). Prema Hunt i suradnicima, svaka žena ima jedinstvenu HMM, kao otisak prsta, koja je stabilna tijekom laktacije (23). Druga istraživanja pokazuju da se tijekom razdoblja laktacije HMM mijenja (25, 28). U uzorcima MM-a mikrobiota je raznolikija nego u uzorcima stolice majki i njihove dojenčadi (24, 28, 29). Kochovim postulatima usprkos, bakterije *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*, često izolirane u čistoj kulturi mlijeka, među najčešćim su bakterijskim vrstama i u upali dojke i u zdravih kontrola (11). Prema velikoj međunarodnoj studiji koja je obuhvatila 8 zemalja sa 4 kontinenta, na gotovo 400 uzoraka majčinog mlijeka i parova uzoraka fecesa njihove djece, rodovi *Staphylococcus* i *Streptococcus* identificirani su kao srž mikrobiote mlijeka, zastupljeni u 98,7 i 97,7 % uzoraka (30). Prema sistematskom preglednom radu iz 2017., ta dva roda bakterija smatraju se univerzalno prisutnima u mlijeku, neovisno o zemljopisnom porijeklu i načinu analize uzoraka (31).

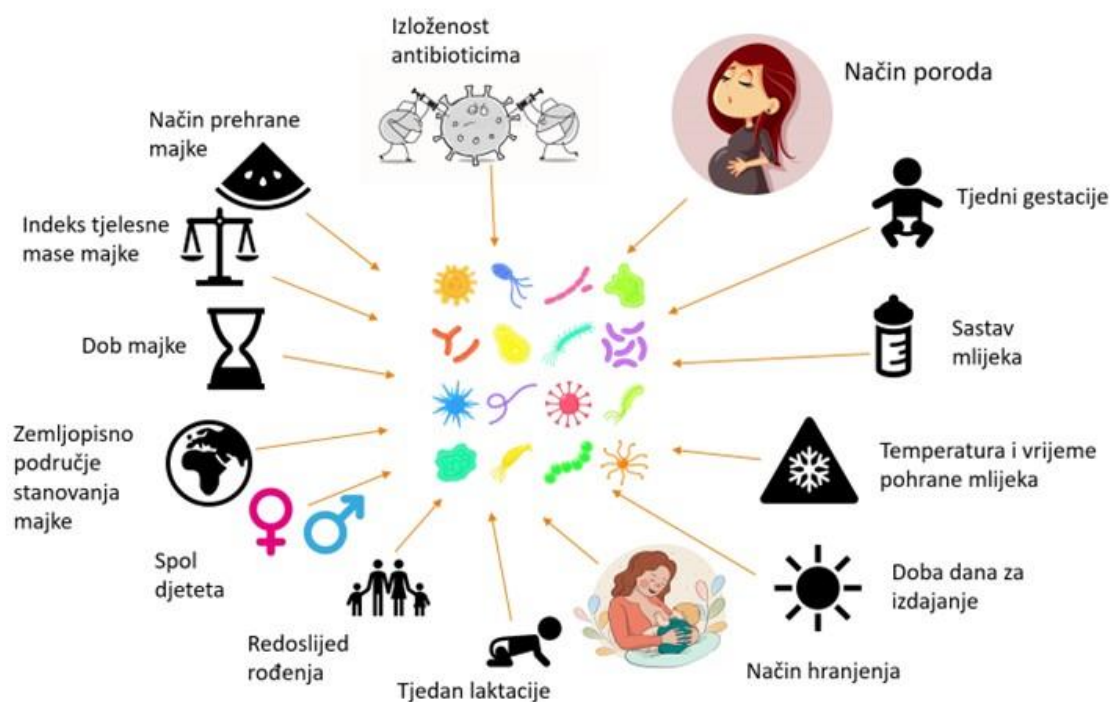
Uzorci mlijeka niske su biomase, čime su u potencijanom riziku lažno pozitivnih nalaza sekvenciranja koji su posljedica kontaminacije reagensa tijekom rada u laboratoriju (32, 33). Istraživači su bili skeptični prema pojedinim bakterijskim rodovima i vrstama nađenim u

mlijeku, kao što su *Acinetobacter* i *Pseudomonas*, ali oba su roda dokazano dio HMM-a (33, 34).

### 1.2.3. Utjecaj na sastav bakterijske mikrobiote majčinog mlijeka

Dosadašnjim istraživanjima dokazana je povezanost bakterijske zastupljenosti i raznolikosti s različitim čimbenicima majke, djeteta i samog mlijeka. Najčešće istraživana obilježja koja mogu utjecati na sastav mikrobiote mlijeka su gestacijska dob na porodu, način poroda, spol, redosljed rođenja, antibiotici tijekom poroda i laktacije, stadij odnosno tjedni laktacije, prehrana, indeks tjelesne mase (ITM) majke, nutritivni sastav MM-a, infekcija virusom humane imunodeficijencije (HIV), pušenje, podneblje u kojem živi majka, način prikupljanja mlijeka i način hranjenja djeteta (24). Na Slici 3. nisu navedeni HIV infekcija ni pušenje majke jer su kontraindikacija za darivanje mlijeka.

Većina istraživanja provedena je na malom broju uzoraka mlijeka, neusporedivih načina prikupljanja i analize te nedosljednih zaključaka (24). Prema dvije studije, zastupljenost bakterija iz roda *Bifidobacterium* je veća u majki koje su rodile u terminu, dok prema Urbaniaku i suradnicima gestacijska dob na porodu ne utječe na sastav mikrobiote MM-a (35-37). Prema istraživanju Li i suradnika, u mlijeku majki koje su rodile carskim rezom (engl. Cesarean Section, CS) nađeno je više bakterije roda *Lactobacillus* (38). Prema drugim istraživanjima, vaginalni je porod povezan s više bakterija iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* (36, 39, 40). Damaceno i suradnici našli su *Lactobacillus gasseri* samo u žena koje su rodile vaginalno (41). Tri istraživanja nisu našla poveznicu između načina poroda i sastava HMM-a (36, 42, 43). U mlijeku majki koje su primale antibiotike tijekom poroda nađen je niži ukupan broj bakterija, ali i veća  $\alpha$ -raznolikost i bogatstvo mikrobiote (44, 45). U mlijeku majki koje su primale antibiotike tijekom poroda nisu nađene bakterije iz roda *Bifidobacterium* mjesec dana nakon poroda (45). Prema Soto i suradnicima, u mlijeku majki koje su primale antibiotike tijekom trudnoće i laktacije nađeno je značajno manje vrsta iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* (46).



Slika 3. Povezanost mikrobiote mlijeka s čimbenicima majke, djeteta i mlijeka

Prilagođeno prema – Zimmermann P, Curtis N. Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *J Infect.* 2020;81:17-47.

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.01.023>

Preuzeto: 07.02.2024.

#### 1.2.4. Probiotičke bakterije u majčinom mlijeku

Mikroorganizam, da bi ga proglasili probiotičkim, ne smije biti uzročnik u neoportunističkim infekcijama niti nositi virulenciju ili rezistenciju koja se može prenijeti na drugi organizam (47, 48). Neki od osnovnih kriterija za ljudske probiotike su ljudsko porijeklo, povijest sigurnoga produženog korištenja od strane posebno osjetljive populacije (novorođenčad, dojenčad) i prilagodba na sluznice i mliječne podloge (49).

Od probiotičkih bakterija prisutnih u mlijeku potrebno je svakako izdvojiti one iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* koji su prema analizi prediktivne vrijednosti za infekciju vrijednosti 0, odnosno nikada nisu nađeni u uzorcima iz tkiva dojke ili MM-a uz pojavnost infekcije (11). Iz mlijeka su izolirana tri potencijalno probiotičke vrste – *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius* i *Lactobacillus fermentum* koji povećavanjem koncentracije imunoglobulina A u stolici induciraju stvaranje interleukina-10 (IL-10) (50). U liječenju mastitisa primjenjivani su *L. salivarius* CECT5713 i *L. gasseri* CECT5714 koji su se pokazali kao učinkovita alternativa antibiotskoj terapiji (12). Koevolucija ljudi i specifičnih



bifidobakterijskih vrsta proteže se milijunima godina unatrag (25). Brojne bakterije iz roda *Bifidobacterium* su nađene samo u HMM-u, ne i u drugim tjelesnim tekućinama ljudskog organizma (11). One su jedinstveno genetski prilagođene da koriste glikane iz MM-a kao izvor energije (10, 51). Smatra se da bifidobakterije potiču i druge potencijalno zdrave bakterije na rast u crijevima novorođenčeta, a njihov nedostatak u djetinjstvu se kasnije povezuje s atopijom i pretilošću u djece (50, 52). Ovaj rod čini mali postotak HMM-a, ali prevladava mikrobiotom gastrointestinalnog sustava dojene djece (53-55).

Po tri soja *Bifidobacterium breve* i *longum* pokazala su mogućnost prijanjanja uz sluznicu crijeva (44, 56). Neka istraživanja upućuju na to da moderne prakse hranjenja dojenčadi mogu uzrokovati izumiranje roda *Bifidobacterium* (57, 58). Pretpostavlja se da smanjeno trajanje dojenja i upotreba dojenačkog mliječnog pripravka koji nema glikane humanog mlijeka doprinose gubitku ovog ključnog roda bakterija, narušavajući drevnu simbiozu (25, 59).

Među novije izoliranim rodovima potencijalno probiotičkih bakterija iz MM-a istaknuo se rod *Enterococcus*, s nekoliko sojeva *E. faecium*, učinke kojih je potrebno potvrditi i u *in vivo* istraživanjima (35). Smatra se da su bakterije iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* te druge probiotičke bakterije učinkovite u prevenciji nekrotizirajućeg enterokolitisa (NEK) (60).

### **1.3. Izolacija i identifikacija bakterija u majčinom mlijeku**

Razumijevanje HMM-a i njezinih mogućih uloga bilo je ograničeno nemogućnošću uzgoja mnogih vrsta bakterija, što je dovelo do pristranosti prema bakterijama koje se lako uzgajaju i koje su zauzele središte većine istraživanja. Godinama je interes mikrobiologa bio usmjeren na interakciju patogena i ljudskog organizma što je, uz ograničenja metoda kultivacije, doprinijelo zanemarivanju utjecaja kolonizirajućih i nepatogenih uzročnika (61, 62). Razvoj mikrobioloških metoda koje se temelje na kultivaciji i neovisnih o kultivaciji, doprinijeo je boljem razumijevanju interakcije nepatogenih mikroorganizama i različitih dijelova ljudskog organizma (22).

### 1.3.1. Mikrobiološka kultivacija

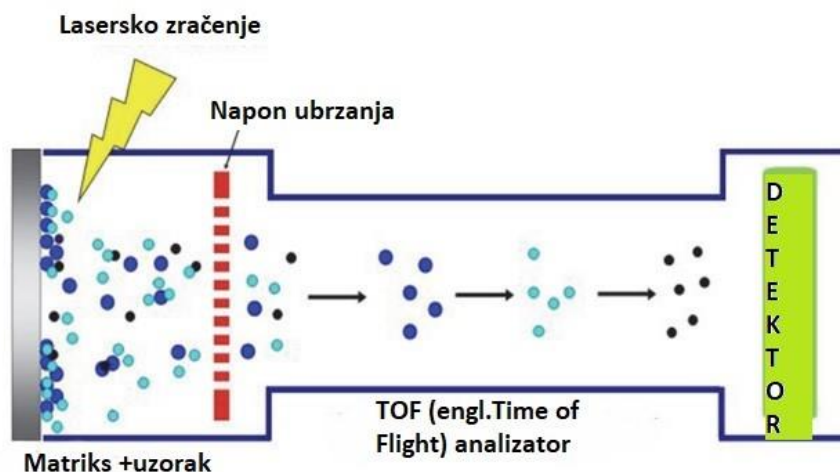
Prva razvijena i dostupna metoda za proučavanje ljudske mikrobiote bila je uzgoj bakterija u kulturi koja je koristila medij koji omogućava rast i izolaciju bakterija (63). Prvi koji je uzgajao bakteriju na način da se može umnožavati bio je Louis Pasteur 1860. godine, zahvaljujući razvoju prvog tzv. umjetnog medija kulture (64). Mikrobiologija se kao grana medicine u 19. i 20. stoljeću uvelike razvila zbog otkrića i razvoja kultivacijskih medija koji oponašaju prirodno okruženje dodavanjem različitih elemenata za uzgoj bakterija koje prije nisu bile kultivirane (65). Robert Koch je krajem 1881. dokazao optimalan rast bakterija u bujonu od svježe govedine. Nakon toga je pokušavao dobiti medij koji će biti što solidnijeg agregatnog stanja, u čemu mu je pomogla supruga suradnika Hessea, koristeći agar prilikom izrade pekmeza (65, 66). Krvni agari (KA) se i danas rutinski koriste u mikrobiologiji zbog nutritivnih sastojaka krvi, brojnih čimbenika rasta, kao i zaštitnog učinka za bakterije (67).

De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar je primarno razvijen za kultivaciju laktobacila iz različitih izvora, odnosno za čitavu skupinu bakterija mliječne kiseline (BMK) (68). Prema Međunarodnoj organizaciji za standardizaciju (engl. International Organization for Standardization, ISO), standard za selektivni uzgoj i kvantifikaciju bifidobakterija iz mliječnih proizvoda koristi tehniku izvedenu na 37 °C pod anaerobnim uvjetima na transgalaktoziliranom oligosaharidnom (engl. Transgalactosylated Oligosaccharides, TOS) propionat agaru, s dodatkom mupirocina (69). Istraživanjima koja su koristila tehnike kultivacije pronađeno je da humano mlijeko sadrži relativno nizak srednji broj vijabilnih bakterija, uglavnom  $< 10^3$  jedinica koje formiraju kolonije (engl. Colony Forming Units, CFU) po mililitru (7, 70). Iako su još uvijek važan alat za procjenu vijabilnosti specifičnih bakterijskih sojeva, analize ovisne o kultivaciji ograničene su na otkrivanje bakterija koje mogu preživjeti postupke uzorkovanja i rast u laboratorijskim uvjetima (71). Poteškoće s kulturom mogu biti posljedica nedostatka specifičnih hranjivih tvari potrebnih u mediju kulture, toksičnosti medija kulture, inhibicije od strane drugih bakterija ili ovisnosti o povezanosti s drugim vrstama (72).

Tehnike temeljene na kultivaciji važne su za proučavanje klinički ili funkcionalno važnih specifičnih bakterija, ali kada se koriste za procjenu zajednice mikrobioma mogu biti jako pristrane i drastično podcijeniti raznolikost (73-75).

### 1.3.2. MALDI-TOF identifikacija

Brzu identifikaciju iz kolonija bakterija koje su porasle na agaru, od 2010. godine u kliničkoj mikrobiologiji moguće je učiniti metodom masene spektrometrije MALDI-TOF (prema engl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight) (76). Princip se temelji na analizi uzorka koji se prvo, primjenom matriksa i lasera, kristalizira i ionizira, pri čemu nastaju pojedinačni ioni koji se zatim analiziraju nakon ubrzavanja i razdvajanja na osnovu njihovog odnosa mase i naboja (Slika 4.). Za svaki se uzorak dobiva karakterističan profil mase peptida koji se uspoređuje s profilima u dostupnoj bazi podataka na temelju koje se izolat identificira (77). U usporedbi s ostalim automatiziranim metodama za otkrivanje uzročnika u pozitivnim kulturama, analiza uzorka ima prednost u odnosu na cijenu, mogućnost istovremene obrade većeg broja uzoraka te neograničeni broj mikroorganizama koje može identificirati (76-78). Prema istraživanju Garnera i suradnika, MALDI-TOF MS-om je ispravno identificirano 92,5 % anaerobnih bakterija na razini koljena te 91,2 % na razini vrste (79). Anaerobne vrste bakterija posebno su značajne kada istražujemo probiotičke bakterije u humanom mlijeku.



Slika 4. Osnovni principi MALDI-TOF masene spektrometrije

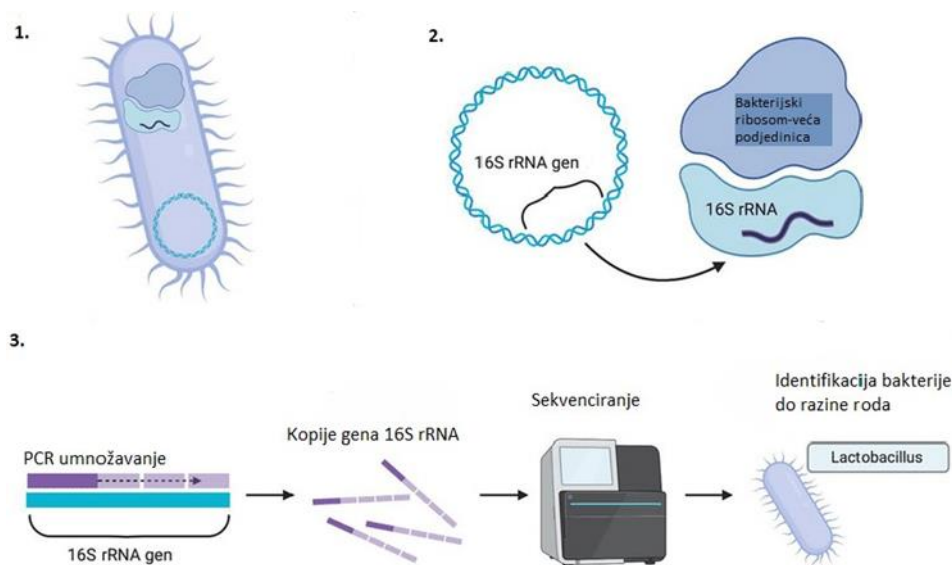
Prilagođeno prema Jang KS, Kim YH. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. *J Microbiol.* 2018;56:209-216., <https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-018-7457-0> Pristupljeno 03.03.2024.

### **1.3.3. Molekularne metode – sekvenciranje nove generacije**

Sekvenciranje nove generacije (engl. Next Generation Sequencing, NGS) je visoko protočna metoda analize mikrobioma koja je omogućila detaljan uvid u složen i raznolik mikrobni ekosustav MM-a (35).

Sekvenciranje DNA označava postupak kojim se određuje redoslijed nukleotida u molekuli DNA, pojedinim genima, većim genetskim područjima, cijelim kromosomima ili genomu organizma (80).

Prokarioti, kao bakterije i arhaeje, sadrže cirkularnu DNA i ribosom koji se sastoji od dvije podjedinice. Manja podjedinica (engl. small subunit, SSU) sadrži 16S (Svedberg, jedinica za koeficijent sedimentacije) ribosomsku ribonukleinsku kiselinu (engl. Ribosomal ribonucleic Acid, rRNA). Unutar bakterijske DNA je gen koji kodira za RNA koja se koristi u ribosomima. Zbog svoje nužnosti za sintezu bakterijskih proteina, gen je izuzetno dobro očuvan tijekom evolucije i specifičan je za bakterijske vrste te se nalazi u svakoj stanici (81, 82). Princip NGS-a je umnažanje 16S rRNA gena koji kodira za SSU prokariotskog ribosoma lančanom reakcijom polimeraze, PCR (engl. Polymerase Chain Reaction), potom sekvenciranje kako bi se odredile vrste bakterija prisutnih u mikrobiomu uzorka (Slika 5.).

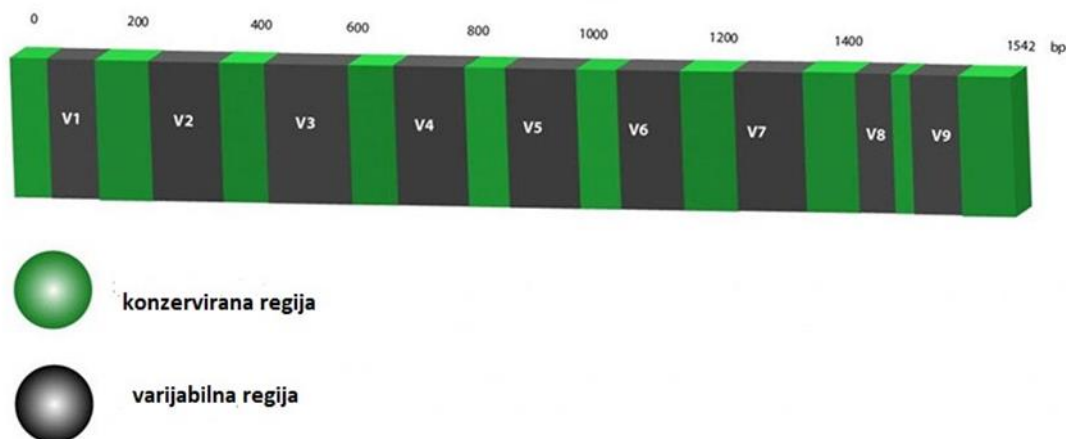


1. bakterijska stanica s cirkularnom DNA i ribosomima s dvije podjedinice
2. unutar bakterijske DNA je 16S rRNA gen, dobro očuvan kroz evoluciju
3. pojednostavljeni prikaz NGS metode

Slika 5. 16S rRNA sekvenciranje

Prilagođeno prema – Patel SR, Ingram C, Scovell JM, Link RE, Mayer WA. The Microbiome and Urolithiasis: Current Advancements and Future Challenges. *Curr Urol Rep.* 2022 Mar;23(3):47-56. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11934-022-01088-8>  
 Pristupljeno 07.03.2024.

Gen 16S rRNA sadrži visoko konzervirane i hipervarijabilne regije (Slika 6.). Prisutnost visoko konzerviranih regija omogućava istraživačima da naprave početnice koje će precizno i pouzdano umnažati 16S hipervarijabilnu istraživanu regiju, a prisutnost hipervarijabilnih regija omogućava razlikovanje između blisko povezanih rodova ili vrsta detektiranih u uzorcima. Veličina 16S rRNA gena je 1500 parova baza, BP (engl. Base Pairs) te je sekvenciranje cijelog gena ograničeno mogućnostima NGS platformi. Najčešće se sekvenciraju jedna ili nekoliko hipervarijabilnih regija (75, 81). Sekvenciranje produkta PCR-a, odnosno amplikona, je relativno jednostavna metoda za procjenu HMM-a, omogućuje detekciju malobrojnih mikroorganizama za čije otkrivanje tehnike ovisne o kultivaciji nisu dovoljno osjetljive (25). Ograničenja metode su nemogućnost razlikovanja živih od mrtvih mikroorganizama ili DNA koja je bez stanica te pristranost zbog izbora početnica za PCR (25). Studije temeljene na amplikonima su u ovom području gotovo isključivo koristile sekvenciranje gena bakterijske 16S rRNA kratkih amplikona, što je povezano s ograničenjima točnih taksonomskih informacija ispod razine roda (83).



bp – parovi baza, engl. Base Pairs

Slika 6. Gen 16S rRNA, prilagođeno prema <https://www.mrdnlab.com/what-is-16s-rRNA.html>  
Pristupljeno 07.03.2024.

HMM je istraživana i pomoću pristupa sekvenciranja cijelog genoma (engl. Whole Genome Sequencing, WGS) (84, 85). WGS metagenomika omogućuje istovremeno otkrivanje svih dijelova mikrobioma humanog mlijeka (bakterijskih, virusnih, arhealnih i gljivičnih gena), može dati bolju rezoluciju u odnosu na studije temeljene na kratkim amplikonima i može implicirati funkcije mikroorganizama (86, 87). S obzirom na to da se radi o metodi koja se temelji na DNA, ona ne može dokazati transkripcijsku sposobnost ni vijabilnost stanica (25). U mlijeku se nalazi dosta ljudske DNA (71–94 % svih sekvenci), što može ograničiti dubinu sekvenciranja mikrobne DNA (84, 85). Istraživanja su pokazala da niti jedan poznati par početnica nije univerzalan za amplifikaciju genskih regija 16S rRNA za sve poznate i dobro okarakterizirane bakterijske vrste, iako mnogi parovi pokrivaju preko 90 % poznatih bakterija (75, 88). S obzirom na to da je uočena odsutnost ili prisutnost određenih bakterija određena odabirom para početnica i širokim rasponom početnica koje se koriste u istraživanju mikrobioma humanog mlijeka, ne iznenađuje da je srž (engl. core) rodova ili vrsta HMM-a nedosljedna u sustavnim pregledima literature (31, 89).

Po određivanju taksonomske pripadnosti, moguće je učiniti i analizu raznolikosti uzoraka. U mikrobnjoj ekologiji istražuju se dvije primarne vrste raznolikosti,  $\alpha$  (alfa) i  $\beta$  (beta)-raznolikost. Mjere  $\alpha$ -raznolikosti govore o raznolikosti unutar uzoraka, ne samo brojem različitih organizama (bogatstvo), već i brojnošću odnosno ravnomjernošću u raspodjeli (90). Primjer mjere koja daje informacije o bogatstvu organizama je 'Observed OTUs' (od

engl. Operative Taxonomic Unit, operativne taksonomske jedinice), odnosno 'Observed features'. Neke mjere  $\alpha$ -raznolikosti uključuju i filogenetsku komponentu, jer se smatra da uzorak koji se sastoji od nekog broja visoko srodnih organizama nije toliko raznolik kao uzorak koji se sastoji od organizama s većim filogenetskim udaljenostima. Primjer je Faith PD (od engl. Phylogenetic Diversity, Faithova filogenetska raznolikost) (90). Mjere  $\alpha$ -raznolikosti kojima se broje i vrste i ravnomjernost istih su Simpsonova dominacija, Shannonov i drugi indeksi. Na pitanje raznolikosti među uzorcima odgovaraju mjere  $\beta$ -raznolikosti, primjeri su težinska i netežinska UniFrac (od engl. Unique Fraction, jedinstvena frakcija) mjera, Jaccard i Bray-Curtis različitost (87). UniFrac mjerom se određuje udaljenost sekvenci na filogenetskom stablu, netežinska se temelji isključivo na udaljenostima sekvenci, a težinska mjera uključuje i informacije o količini sekvenci (91).

UniFrac mjerom generira se kvadratni matriks u kojem je izračunata udaljenost, odnosno različitost svakog uzorka, što se vizualizira pomoću PCoA (engl. Principal Coordinates Analysis, analize glavnih koordinata) (28).

#### **1.4. Banka humanog mlijeka**

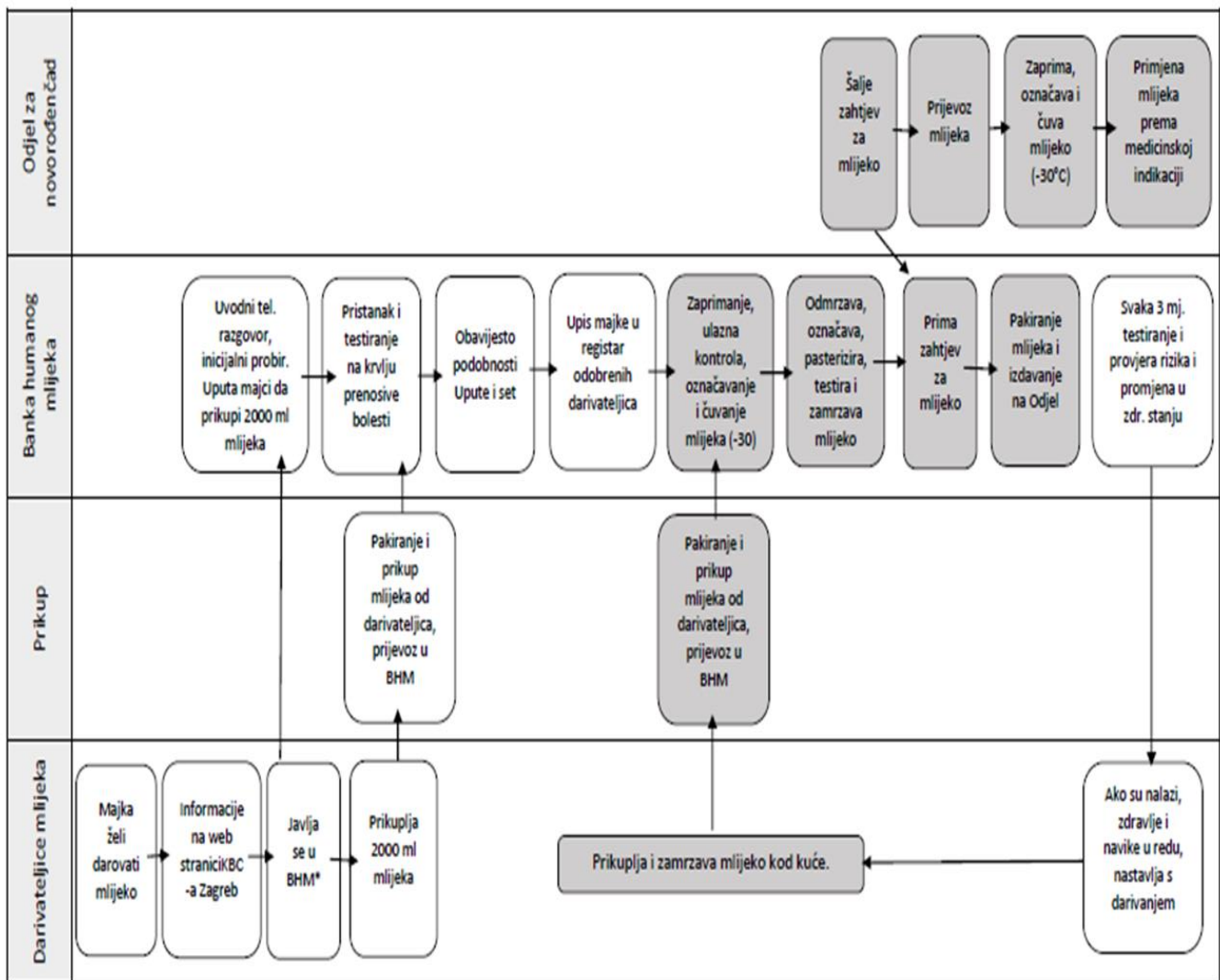
U slučajevima kada majke nemaju (dovoljno) vlastitog mlijeka, sljedeći najbolji izbor je darovano humano mlijeko (DHM) iz banke mlijeka. Banka humanog mlijeka (BHM) je ustanova osnovana sa svrhom odabira, prikupljanja, obrade, pohrane i raspodjele mlijeka koje su darovale majke koje nisu biološki povezane s primateljima (92). DHM se propisuje od strane liječnika koji skrbi o primatelju kako bi se zadovoljile njegove specifične potrebe. Primarna i daleko najveća skupina primatelja DHM-a su prijevremeno rođena djeca (92). Prva banka humanog mlijeka u svijetu osnovana je 1909. godine u Beču, inicijativom profesora Theodora Eschericha, Ernsta Mayerhoferera i Ernsta Pribrama (93). Profesor Mayerhofer bio je Hrvat austrijskih korijena koji je 1923. godine u Zagrebu osnovao prvu kliniku i katedru za pedijatriju u Hrvatskoj (5). Praksa prikupljanja mlijeka od majki darivateljica nastavila se do 80-ih godina 20. stoljeća, kada su brojne banke zatvorene zbog bojazni prijenosa HIV-a (94). S obzirom na značajan utjecaj koji BHM može imati na zdravstvene ishode dojenčadi, SZO je zatražio od zemalja članica da promiču sigurno korištenje DHM-a iz banaka mlijeka kod osjetljive skupine dojenčadi (95). U Europi su trenutno aktivne 282, u Južnoj Americi preko 300, od čega samo u Brazilu 233, a u Sjevernoj

Americi 33 banke humanog mlijeka (96-98). U različim zemljama je humano mlijeko različito regulirano, kao hrana, lijek ili proizvod tkiva dojke (92). U Republici Hrvatskoj (RH) je prva Banka humanog mlijeka osnovana u studenom 2019. godine kao dio Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju i Hrvatske banke tkiva i stanica Kliničkog bolničkog centra (KBC) Zagreb (99). Rad Banke u skladu je sa Zakonom o primjeni ljudskih tkiva i stanica (100). Djeluje kao nacionalna banka te isporučuje darovano mlijeko u sve jedinice intenzivnog liječenja (JIL) novorođenčadi u RH.

#### **1.4.1. Darivateljice humanog mlijeka**

Darivanje mlijeka je dobrovoljno, anonimno i besplatno. Majke koje su punoljetne i imaju viška mlijeka javljaju se u BHM te prolaze postupak probira i informiranja o darivanju mlijeka. Zdrave majke, bez kontraindikacija (određene bolesti, pušenje, prekomjerna konzumacija alkohola, kofeina, uzimanje pojedinih lijekova, itd.), usmeno i pismeno dobivaju upute za darivanje i set za prikupljanje mlijeka. Prije početka darivanja darivateljica potpisuje suglasnost koja, između ostalog, obuhvaća mikrobiološko testiranje te etički odobrena istraživanja. Darivateljice pohranjuju mlijeko u svom domu u jednokratne spremnike dobivene od BHM-a (sterilne bočice zapremnine 130 ml). Zainteresirane majke, koje u trenutku javljanja već imaju prikupljen višak mlijeka, daruju ga u jednokratnim vrećicama namijenjenima za pohranu mlijeka. Vrećice se mogu prihvatiti kao zadovoljavajući spremnik, ako je u njih mlijeko pohranjivano i označavano sukladno uputama za darivanje. U uputama za darivanje posebno su važne upute o izdajanju, higijeni ruku, dojki i izdajalice, označavanju spremnika s mlijekom, rukovanju mlijekom i pohrani u domu darivateljice te rukovanju osjetnikom za kontinuirano bilježenje temperature u kućnom zamrzivaču. Darivateljice izdajaju i pohranjuju mlijeko u vlastitom zamrzivaču do termina dogovorenog prikupa i prijevoza zamrznutog mlijeka u BHM. Po prikupljanju najmanje 2 L viška mlijeka, testiraju se i za darivanje prihvaćaju samo darivateljice negativne na biljege krvlju prenosivih bolesti (92, 100). Mlijeko se može darivati do navršenih godinu dana djeteta, odnosno djece ako se radi o blizanačkoj trudnoći. Na Slici 7. prikazan je postupak darivanja, prikupljanja i izdavanja darovanog mlijeka.





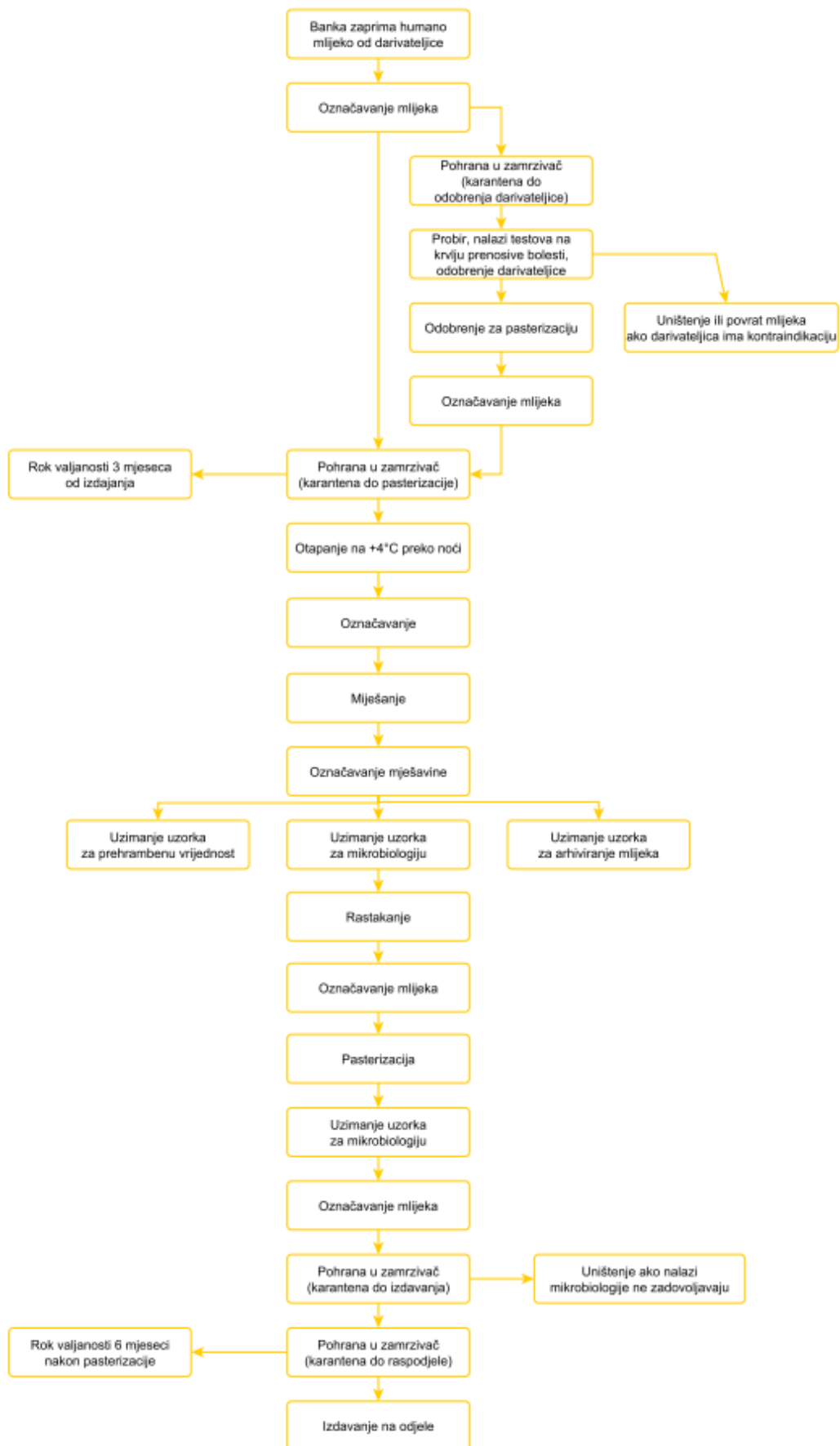
\* BHM = Banka humanog mlijeka

Slika 7. Postupak darivanja, prikupljanja i izdavanja humanog mlijeka

#### 1.4.2. Obrada i testiranje darovanog humanog mlijeka

Mlijeko zaprimljeno u banku prolazi ulaznu provjeru te se, ako su propisani zahtjevi ispunjeni, odobrava za pasterizaciju. Rok za pasterizaciju je tri mjeseca od početka izdavanja mlijeka (92, 99, 101). Mlijeko se obrađuje u u mikrobiološkom sigurnosnom kabinetu klase A u prostoriji s kvalitetom pozadinskog zraka klase D (92, 100). Priprema se mješavina mlijeka jedne darivateljice volumena do 2,2 L, iz dajanog kroz nekoliko dana, koje se rastače u spremnike zapremnine 50 mL. Spremnici se zavaruju indukcijiskim zavarivačem i označavaju za pasterizaciju. Pasterizira se metodom Holder pasterizacije, zagrijavanjem do 62,5 °C u trajanju 30 minuta te se potom naglo hladi na 4 °C. Iz uzorka svake mješavine prije pasterizacije radi se mikrobiološko testiranje i određuje se prehrambena vrijednost. Na mikrobiološku kontrolu se šalje i jedan spremnik iz svake mješavine nakon pasterizacije.

Za kliničku primjenu izdaje se mlijeko koje prije pasterizacije ima ukupan broj vijabilnih aerobnih i fakultativnih bakterija  $\leq 10^5$  CFU/mL, odnosno *Enterobacteriaceae* ili *S. aureus*  $\leq 10^4$  CFU/mL, a nakon pasterizacije nema vijabilnih bakterija (92, 102). Pohranjuje se na temperaturi od -30 °C, rok valjanosti je 3, a od 1. lipnja 2024. godine 6 mjeseci od pasterizacije (92, 101). Postupak obrade DHM-a prikazan je na Slici 8. Svaka mješavina mlijeka koja je napravljena u BHM-u testirana je na bakterije prije i poslije pasterizacije. Mlijeko novih darivateljica se nastoji uključiti u postupak obrade što je prije moguće, da bi im se dala povratna informacija o tome pridržavaju li se na zadovoljavajući način propisanih uputa da bi što više mlijeka moglo biti korišteno za kliničku primjenu. Različite banke različito provode testiranje mlijeka, neke, na primjer, ne testiraju svaku mješavinu svake darivateljice (103).



Slika 8. Postupak obrade darovanog humanog mljeka

### 1.4.3. Mikrobiota darovanog humanog mlijeka

Darovano mlijeko, ako majčino nije dostupno, pruža brojne dobrobiti za nedonešenu i ugroženu novorođenčad, ali je pasterizacijom lišeno i potencijalno korisne bakterijske mikrobiote. U pasteriziranom DHM-u nema vijabilnih bakterija, što se prema nekim istraživačima čak i ne smatra nedostatkom (104). Pretpostavlja se da se probiotički efekt postiže aktivacijom imunološkog sustava nakon prepoznavanja bakterijskih stanica ili njihovih dijelova inaktiviranih visokim temperaturama. Čitave bakterije ili samo njihovi dijelovi (stanične ovojnice ili nukleinske kiseline, itd), nazivaju se paraprobioticima ili probioticima – duhovima (105). U istraživanju Stinson i suradnika gotovo 70 % bakterijskih stanica u uzorcima svježeg mlijeka nisu bile vijabilne, ali se pretpostavlja da i takve imaju ulogu u probavnom sustavu dojenčadi time što izlažu imunološki sustav sluznica u razvoju nizu bakterija na način koji nije prijeteći (106).

Do sada su provedena rijetka istraživanja bakterijske mikrobiote DHM-a u kojima testirani uzorci nisu uzimani iz mješavina darovanog mlijeka, nego pojedinačno, jednokratno izdojenog mlijeka darivateljica (107, 108). Novijim istraživanjima dokazano je da se sirovo MM može uspješno „transplantirati“ u pasterizirano mlijeko s ciljem obnavljanja mikrobiote pasteriziranog mlijeka (109, 110). Pretpostavlja se da disbioza crijevne mikrobiote novorođenčadi, posebno rođene prijevremeno, predisponira za pojavu NEK-a, dok ga probiotičke bakterije izolirane iz humanog mlijeka preveniraju (60, 111, 112). Neka klinička istraživanja dokazala su smanjenje incidencije i težine NEK-a nakon davanja probiotika, ali dokazi su nedosljedni zbog nedostatka istraživanja na velikom uzorku ispitanika (113, 114). HMM, kao i mikrobiota dojenčadi, podložna je promjenama. Istražuje se davanje probiotika trudnicama, majkama u laktaciji i dojenčadi, a rezultati ukazuju na moguće smanjenje alergijskih komplikacija kasnije u životu (115).

U budućnosti će se možda i sirovo DHM određenog sastava i provjerene sigurnosti moći dodavati u pasterizirano mlijeko te koristiti za obnavljanje mikrobiote pasteriziranog mlijeka s ciljem personalizacije prehrane primatelja i prevencije crijevnih komplikacija nedonešenosti.

## 2. HIPOTEZA

Bakterijska mikrobiota darovanog humanog mlijeka majki koje su rodile vaginalno i nisu bile izložene antibioticima imat će veću zastupljenost bakterija iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

#### 3.1. Opći cilj

Opći cilj istraživanja je metodom sekvenciranja nove generacije odrediti sastav bakterijske mikrobiote darovanog humanog mlijeka i odrediti zastupljenost pojedinih rodova bakterija.

#### 3.2. Specifični ciljevi

1. Ispitati povezanost sastava bakterijske mikrobiote darovanog humanog mlijeka s poznatim obilježjima majki darivateljica – dob, indeks tjelesne mase, primjena antibiotika unutar posljednjih šest mjeseci prije izdavanja mlijeka, zemljopisno područje stanovanja, način poroda i termin poroda odnosno tjedni gestacije na porodu.
2. Ispitati povezanost sastava bakterijske mikrobiote darovanog humanog mlijeka s obilježjima djece darivateljica – spol, redoslijed rođenja, dob tijekom izdavanja i način hranjenja majčinim mlijekom.
3. Ispitati povezanost sastava bakterijske mikrobiote darovanog humanog mlijeka s obilježjima mlijeka – vrsta mlijeka, način izdavanja, vrsta spremnika za mlijeko prije pasterizacije, duljina i temperatura pohrane i prehrambena vrijednost.
4. Identificirati mlijeko koje bi prema zastupljenosti bakterija iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* bolje odgovaralo prijevremeno rođenoj djeci s ciljem personalizacije prehrane.

## **4. MATERIJALI I METODE**

Istraživanje je provedeno u Banci humanog mlijeka KBC-a Zagreb u suradnji sa Znanstvenim centrom izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Laboratorijem za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Odobrila su ga Etičko povjerenstvo KBC-a Zagreb i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### **4.1. Ispitanice i uzorci**

U ovo retrospektivno presječno istraživanje s prigodnim uzorkom uključeni su uzorci mlijeka 88 različitih majki darivateljica. Ispitanice su izdajale i darivale mlijeko u BHM u razdoblju od siječnja 2020. do lipnja 2022. godine i zadovoljile su medicinske zahtjeve i postupak odabira za darivatelje tkiva (92, 99, 100). Uzorci mlijeka iz mješavina izdajani su u prvih 6 mjeseci odnosno 25 tjedana od poroda i zadovoljili su kriterije za kliničku primjenu (92, 101). Analizom snage testa za binarnu logističku regresiju prema sljedećim parametrima: pretpostavljeni omjer vjerojatnosti (engl. Odds Ratio, OR) predikcije odgovarajuće mikrobiote od  $OR=2,5$ , razina značajnosti  $\alpha=0,05$  i snagom testa od 0,80, u istraživanje je bilo potrebno uključiti najmanje 70 ispitanica. Analiza snage testa je provedena pomoću kompjuterskog programa G\*Power for Windows, verzija 3.1.3.

Uključene darivateljice su u sklopu Objašnjenja i pristanka za darivateljicu humanog mlijeka dale suglasnost za mikrobiološko testiranje mlijeka te za pohranu male količine mlijeka na rok od 20 godina za etički odobrena istraživanja povezana s darivanjem, kvalitetom i primjenom mlijeka.

### **4.2. Ispitivana obilježja**

Iz dokumentacije koju ispunjavaju darivateljice i djelatnici Banke mlijeka prikupljeni su podatci o:

1. darivateljicama – dob, ITM, primjena antibiotika unutar posljednjih 6 mjeseci prije izdavanja, zemljopisno područje stanovanja, način poroda, tjedni gestacije na porodu,

2. djeci – spol, redoslijed rođenja, dob djeteta tijekom izdavanja odnosno tjedni laktacije, način hranjenja majčinim mlijekom i

3. mlijeku – vrsta mlijeka, način izdavanja, vrsta spremnika za mlijeko prije pasterizacije, duljina i temperatura pohrane, prehrambena vrijednost, nalaz mikrobiološke kulture prije pasterizacije.

Zemljopisno područje stanovanja darivateljica je Republika Hrvatska, a najvećim dijelom Grad Zagreb i okolica. Načini poroda su vaginalni porod ili carski rez. Način hranjenja majčinim mlijekom je dojenje, isključivo izdavanje i hranjenje izdojenim majčinim mlijekom ili kombinacija dojenja i izdavanja. Mlijeko majki koje su rodile prije punih 37 tjedana gestacije, a izdajano je u prva 4 tjedna nakon poroda, naziva se pretermiskim. Nakon tog razdoblja, kao i mlijeko majki koje su rodile s navršenih 37 tjedana i više, naziva se terminskim. Načini izdavanja mlijeka su posredstvom izdajalice, mehaničke ili električne te ručnom tehnikom. Spremnik za mlijeko prije pasterizacije je bočica ili vrećica.

S obzirom na nalaz kultivacije bakterija na komercijalnom KA prije pasterizacije, uzorci su razvrstani u 4 skupine prema porastu CFU:

1. sterilno, nema porasta
2. ukupan broj CFU u uzorku mlijeka do  $\leq 10^3$
3. ukupan broj CFU u uzorku mlijeka u rasponu od  $>10^3$  do  $\leq 10^4$
4. ukupan broj CFU u uzorku mlijeka u rasponu od  $>10^4$  do  $\leq 10^5$

S obzirom na nalaz kultivacije mlijeka na TOS i MRS agarima uzorci su razvrstani prema tome da li je rast bakterija detektiran ili ne.

### **4.3. Određivanje prehrambene vrijednosti darovanog humanog mlijeka**

Na uređaju za analizu humanog mlijeka (Miris, Uppsala, Švedska) određena je prehrambena vrijednost iz uzoraka mješavina mlijeka prije pasterizacije. Analizator humanog mlijeka služi za određivanje kvalitete mlijeka. Mjeri se koncentracija ugljikohidrata (UH), masti i proteina prema Beerovom zakonu – apsorpcija je proporcionalna koncentraciji, a softver Miris HMA™ analizatora obrađuje mjerne podatke putem unutarnje kalibracije. Iz dobivenih koncentracija softver računa i kalorijsku vrijednost mlijeka. Uzorci mlijeka se prije analize griju u kupelji s kuglicama



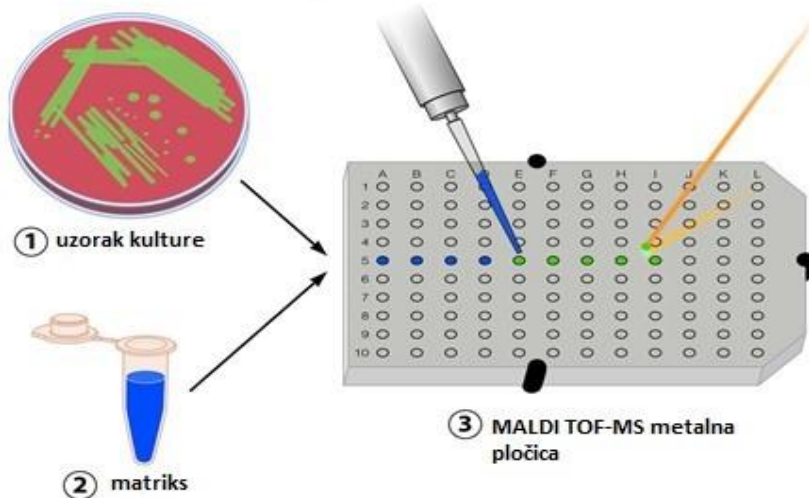
za prijenos topline te homogeniziraju uz pomoć Miris ultrazvučnog procesora (Slika 9.).



Slika 9. S lijeva na desno: Miris ultrazvučni procesor, kupelj s kuglicama za prijenos topline i analizator humanog mlijeka

#### 4.4. Metode kultivacije darovanog humanog mlijeka

Svježi uzorci sirovog mlijeka su u sklopu rutinske kontrole kvalitete u mikrobiološkom laboratoriju nasađeni na podlogu, odnosno komercijalni KA. Po inokulaciji 0,01 mL mlijeka na KA, inkubiraju se u termostatu na 35 °C, u atmosferi obogaćenju CO<sub>2</sub> tijekom 24-48 h. Sve različite kolonije na KA identificirane su MALDI-TOF masenom spektrometrijom na uređaju Maldi Biotyper (Bruker, Massachusetts, SAD). Kao MALDI matriks na tom uređaju koristi se  $\alpha$ -cijano-4-hidroksicinamična kiselina te se matriks, uz uzorak kolonija poraslih na KA, nanosi na metalnu pločicu s koje se identificira (Slika 10.). U mikrobiološkom laboratoriju KBC-a Zagreb određena je vrsta i količina bakterija iz uzoraka mlijeka izražena kao broj CFU/mL.



Slika 10. Postupak pripreme uzorka za identifikaciju MALDI-TOF masenom spektrometrijom

U Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, odmrznuti arhivski uzorci sirovog mlijeka nasađeni su na podloge pogodne za BMK. Broj živih bakterija određen je indirektnom metodom, odnosno naciepljivanjem priređenih decimalnih razrjeđenja suspenzija uzorka mlijeka u sterilnoj fiziološkoj otopini na MRS agar u obliku kapi (0,01 mL) u svrhu određivanja ukupnog broja laktobacila te na TOS agar u svrhu određivanja ukupnog broja bifidobakterija u dvije paralele. Nakon 48 h anaerobne inkubacije na 37 °C izbrojane su porasle kolonije i izračunat je broj živih stanica, odnosno CFU/mL uzorka.

#### 4.5. Izolacija bakterijske DNA iz uzoraka darovanog humanog mlijeka

Uzorci od 5 mL DHM-a centrifugirani su 10 min na 3600 g i 4 °C. Nakon uklanjanja supernatanta i masnog sloja, bakterijske stanice prisutne u talogu su lizirane dvosatnom inkubacijom u 200 µL otopine lizozima u tris etilendiamintetraoctena kiselina (TE) puferu. Nakon inkubacije, uzorci su uronjeni u kutiju s ledom kako bi se spriječilo njihovo zagrijavanje tijekom sonikacije. Sonikacija je provedena pomoću

uređaja Sonopuls mini 20 (Bandelin electronic GmbH & Co, Berlin, Njemačka) tri puta po 30 s i 15 s pauze između svakog ciklusa, nakon čega su uzorci prebačeni u jažice kasete Maxwell® 16 Tissue DNA purification kita (Promega, Madison, SAD) koje su umetnute u Maxwell® 16 Research System uređaj za automatsku izolaciju DNA. Nakon završetka izolacije DNA, spektrofotometrijski je određena koncentracija DNA iz 2 µL uzorka pomoću BioSpec-nano uređaja (Shimadzu, Kyoto, Japan) pri valnoj duljini od 0,7 nm, pri čemu je kao slijepa proba korištena otopina u kojoj je resuspendirana DNA.

Uzorci izolirane DNA pohranjeni su na -30 °C do slanja na sekvenciranje.

#### **4.6. Sekvenciranje nove generacije**

Uzorci od 30 µL izolirane DNA poslani su u laboratorij Molecular Research (MR) DNA, u Shallowater, Texas, Sjedinjene Američke Države (SAD), a ostatak je pohranjen na -30 °C. Iz uzoraka izolirane DNA učinjeno je 30 PCR amplifikacija hipervarijabilne regije V1-V3 gena 16S rRNA s početnicama ill 27Fmod (5'-AGRGTGGGATCMTGGCTCAG-3') i ill 519Rmod (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3'). Za pripremu uzoraka za PCR korišten je HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Germantown, SAD). Nakon početnog koraka denaturacije DNA na 94 °C tijekom 3 minute uslijedilo je 28 ciklusa (30 s na 94 °C, 40 s na 53 °C i 1 min na 72 °C) praćenih posljednjim korakom elongacije (5 min na 72 °C). Uspjeh amplifikacije PCR produkata je provjeren u 2 % agaroznom gelu. Više uzoraka je na temelju molekularne mase i koncentracije DNA spojeno u jedan u jednakim omjerima te potom pročišćeno pomoću kalibriranih kuglica adenozin monofosfata (eng. AMPure XP). Skupljeni i pročišćeni PCR produkti su korišteni za pripremu Illumina DNA knjižnice. Sekvenciranje je učinjeno na Illumina Miseq (Illumina, San Diego, SAD) platformi prema uputama proizvođača (Slika 11.). Podatci o sekvencama obrađeni su korištenjem MR DNA analize (MR DNA, Shallowater, Texas, SAD). Procese sekvenciranja barkodiranih amplicona opisuje se pod mnogim nazivima i izvode mnoge tehnologije. U laboratoriju MR DNA (MR DNA, Shallowater, Texas, SAD) izvodi se sekvenciranje pod zaštitnim znakom usluge bTEFAP® (engl. Bacterial Tag-Encoded FLX Amplicon Pyrosequencing) koju je izumio dr. Scot E Dowd 2007. godine (116).

Sekvence su spojene, uklonjene su one s manje od 150 BP i s dvosmislenim očitanjima baza. Sekvence su kvalitetno filtrirane korištenjem najvećeg očekivanog praga pogreške od 1,0 i dereplicirane. Jedinstvene sekvence identificirane sekvenciranjem ili pogreškama PCR točaka uklonjene su, čime se osiguralo sekvence bez šuma ili operativne taksonomske jedinice nultog radijusa (engl. zero radius Operational Taxonomic Units, zOTU). Konačni zOTU taksonomski su klasificirani korištenjem alata za pretraživanje osnovnog lokalnog poravnanja nukleotida (engl. Basic Local Alignment Search Tool, BLASTn) iz odabrane baze podataka izvedene iz nacionalnog centra za biotehnoške informacije SAD-a (National Center for Biotechnology Information, NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Sirovi podatci u obliku FASTQ datoteka, od kojih je jedna odgovarala očitanim sljedovima nukleotida uzoraka u načinu čitanja slijeda prema naprijed (engl. forward), a druga unatrag (engl. reverse), preuzeti su s Illumina platforme (<https://basespace.illumina.com>).

U datoteke s rezultatima uneseni su brojevi izoliranih sekvenci i postotci zastupljenosti pojedine taksonomske razine izoliranih bakterija prema podjeli na koljena, razrede, redove, porodice, rodove i vrste. Klasifikacija prema vrstama nije dovoljno precizna u 16S rRNA sekvenciranju pa je dodatno napravljena datoteka s identitetima bakterija. Kod definiranja identiteta, postotak odstupanja diktira razinu za procjenu najvalidnije taksonomske klasifikacije (Tablica 2.).

Tablica 2. Identitet bakterija

Istovjetnost s referentnom sekvencom	Oznaka identiteta
> 97 %	vrsta
između 97 % i 95 %	(neklasificirani rod)
između 95 % i 90 %	(neklasificirana porodica)
između 90 % i 85 %	(neklasificirani red)
između 85 % i 80 %	(neklasificirani razred)
između 80 % i 77 %	(neklasificirano koljeno)
< 77 %	(nepoznat)

Za daljnu obradu i naprednu analizu dobivenih sekvenci korištena je QIIME 2 platforma (engl. Quantitative Insights into Microbial Ecology, <https://qiime2.org/>). Dva uzorka nisu uključena u naprednu analizu zbog kvalitete. Alfa-raznolikost određena je mjerama 'Observed features', Faith PD i Shannon, a  $\beta$ -raznolikost težinskom Unifrac mjerom. Na platformi QIIME 2 je moguće koristiti vizualizacije o OTU dobivenih

sekvenciranjem, koja kao bazu podataka koristi Greengenes (<https://greengenes.secondgenome.com/>). Također, moguće je koristiti vizualizacije platforme za prikaz usporedbi skupina i pojedinih uzoraka mjerama  $\alpha$  i  $\beta$ -raznolikosti.



Slika 11. Illumina MiSeq i osnovni koraci u sekvenciranju

Prilagođeno prema: <https://www.medicalbiochemist.com/2020/10/target-enrichment-mutation-analysis-miseq.html>

Pristupljeno 02.04.2024.

#### 4.7. Statistička analiza

Podatci su prikazani tablično i grafički. Učinjena je analiza normalnosti raspodjele numeričkih podataka te je, u skladu s dobivenim rezultatima, primijenjena odgovarajuća parametrijska i/ili neparametrijska statistička analiza i način prikaza podataka.

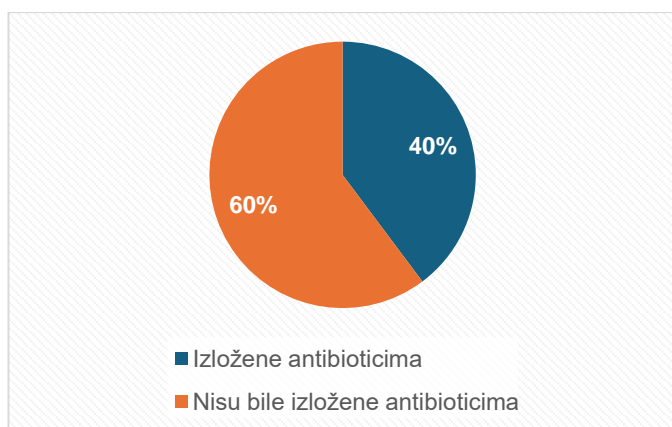
Kvantitativni podatci su prikazani kroz raspone, aritmetičke sredine i standardne devijacije, odnosno medijane i interkvartilne raspone u slučajevima neparametrijske raspodjele. Kategorijski podatci su prikazani kroz apsolutne frekvencije i pripadajuće udjele. Razlike u kvantitativnim vrijednostima mikrobiote procijenjene su zbog neparametrijske raspodjele Mann-Whitney U odnosno Kruskal Wallis H testom. Razlike u kategorijskim varijablama analizirane su  $\chi^2$  testom ili Fisherovim egzaktnim testom. Izračunate su odgovarajuće mjere povezanosti između promatranih kliničkih i socio-demografskih varijabli (dob, ITM, primjena antibiotika unutar posljednjih 6 mjeseci prije izdavanja, zemljopisno područje stanovanja, način poroda, tjedni

gestacije na porodu, spol, redoslijed rođenja, tjedni laktacije, način hranjenja majčinim mlijekom, način izdavanja, vrsta spremnika za mlijeko prije pasterizacije, duljina i temperatura pohrane, prehrambena vrijednost, nalaz mikrobiološke kulture prije pasterizacije) u odnosu na kvantitativne vrijednosti mikrobiote. Logističkom regresijom određeni su rezultati sklonosti (engl. propensity scores) korištenjem prikupljenih kliničkih i anamnestičkih podataka postavljene kroz ciljeve i hipotezu na temelju kojih je učinjena predikcija pripadnosti skupini koja ima odgovarajuću mikrobiotu. Napravljen je regresijski model predikcije, a kao prediktori su se koristile one varijable koje su u prethodnim analizama pokazivale razinu značajnosti  $P < 0,200$ . Sve  $P$  vrijednosti manje od 0,05 smatrane su značajnima. U analizi je korištena programska podrška IBM SPSS Statistics verzija 27.0.1. Vrijednosti mjera  $\alpha$ -raznolikosti unutar pojedinih skupina uzoraka uspoređene su u Qiime 2 programu uparenim Kruskal Wallis testom. Kako bi se provjerilo postoji li statistička razlika između mikrobni zajednica skupina uzoraka, u MRDNA laboratoriju je proveden test analize sličnosti (ANOSIM), a  $\beta$ -raznolikost određena je težinskom UniFrac mjerom u R statistici.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Deskriptivna statistička analiza ispitanica i uzoraka

U istraživanje je uključeno ukupno 88 različitih majki darivateljica humanog mlijeka, odnosno 88 uzoraka njihovog mlijeka. Od postojećih arhivskih uzoraka DHM-a u istraživanje je uključeno mlijeko izdvojeno što ranije nakon poroda, od što više različitih darivateljica koje zadovoljavaju uključne kriterije. Od ukupnog broja uključenih darivateljica, njih 35 (39,8 %) bilo je izloženo antibioticima, a 53 (60,2 %) darivateljice nisu primale antibiotsku terapiju ni profilaksu unutar posljednjih 6 mjeseci prije izdavanja mlijeka (Slika 12.). Klinička i demografska obilježja kategorijskih varijabli darivateljica, njihove djece i darovanog humanog mlijeka prikazana su u Tablicama 3., 4. i 5.



Slika 12. Glavne skupine darivateljice s obzirom na izloženost antibioticima (N=88)

Tablica 3. Obilježja darivateljica humanog mlijeka (N=88)

		N	%
Skupine	Izložene antibioticima	35	39,8
	Nisu bile izložene antibioticima	53	60,2
Podskupine	Antibiotska profilaksa	27	77,1
	Antibiotska terapija	8	22,9
Mjesto stanovanja	Grad Zagreb	57	64,8
	Ostatak Hrvatske	31	35,2
Način poroda	Vaginalni	59	67,0
	Carski rez	29	33,0

Tablica 4. Obilježja djece darivateljica humanog mlijeka (N=88)

		N	%
Spol djeteta	Muški	42	47,7
	Ženski	46	52,3
Redoslijed rođenja	1	43	48,9
	2	27	30,7
	3	13	14,8
	4	5	5,7
Način hranjenja majčinim mlijekom	Dojenje	53	60,2
	Isključivo izdajanje	22	25,0
	Kombinacija	13	14,8



Tablica 5. Obilježja darovanog humanog mlijeka (N=88)

		N	%
Vrsta mlijeka	Terminsko	81	92,0
	Preterminsko	7	8,0
Način izdavanja	Mehanička izdajalica	30	34,1
	Električna izdajalica	47	53,4
	Ručno	11	12,5
Spremnik za mlijeko prije pasterizacije	Vrećica	23	26,1
	Bočica	65	73,9
Ukupan broj CFU prije pasterizacije	Sterilno	5	5,7
	$\leq 10^3$	30	34,1
	$>10^3 \leq 10^4$	26	29,5
	$>10^4 \leq 10^5$	27	30,7

CFU – jedinice koje formiraju kolonije

Tablica 6. Deskriptivna statistika za kvantitativne varijable darivateljica, djece i mlijeka

Obilježje	N	Prosjeak	SD	Min	Max	25. centila	Medijan	75. centila
Dob darivateljice (godine)	88	32,25	4,189	22	43	29	32	35
ITM darivateljice (kg/m <sup>2</sup> )	88	24,33	4,239	18	43	21	23	27
Termin poroda (GD)	88	37,95	3,594	24	42	38	39	40
Tjedni laktacije	88	10,33	7,046	1	25	4	8,5	16
Pohrana kod kuće (dani)	88	25,12	15,075	3	82	14	23	32
Prosjeak temperature u kućnom zamrzivaču (-°C)	66	19,773	4,278	11	31	17	19	22
Pohrana u Banci prije stvaranja mješavine (dani)	88	18,23	18,316	2	84	6	9	24,25
Pohrana u Banci od stvaranja mješavine do izolacije DNA (dani)	88	367,36	233,451	8	886	171,75	347,5	511,5
Masti (g/100 mL)	88	3,73	1,140	1,4	7,6	3,02	3,7	4,42
Ugljikohidrati (g/100 mL)	88	8,39	0,206	7,8	8,8	8,3	8,4	8,5
Proteini (g/100 mL)	88	1,095	0,229	0,7	1,8	0,9	1,1	1,2
Energetska vrijednost (kcl/100 mL)	88	74,09	11,127	52	110	67,25	73,50	80
Koncentracija izolirane DNA (ng/μL)	88	14,53	11,285	1,68	49,63	6,53	10,79	19,32

ITM – indeks tjelesne mase; GD – gestacijska dob djeteta u tjednima; DNA – deoksiribonukleinska kiselina

## 5.2. Rezultati kultivacije uzoraka darovanog humanog mlijeka

Iz uzoraka sirovog mlijeka rađene su rutinske mikrobiološke metode kultivacije na komercijalnom KA. Iz 5 (5,6 %) uzoraka nije porasla niti jedna bakterija nakon inkubacije, a u 57 (64,7 %) uzoraka mlijeka izolirana je jedna vrsta bakterija. U preostalim uzorcima porasle su dvije (21,5 %) odnosno tri (7,9 %) vrste bakterija. Najčešća vrsta kao pojedinačni izolat ili zajedno s drugim bakterijama je *Staphylococcus epidermidis* (Slika 13. i Tablica 7.).



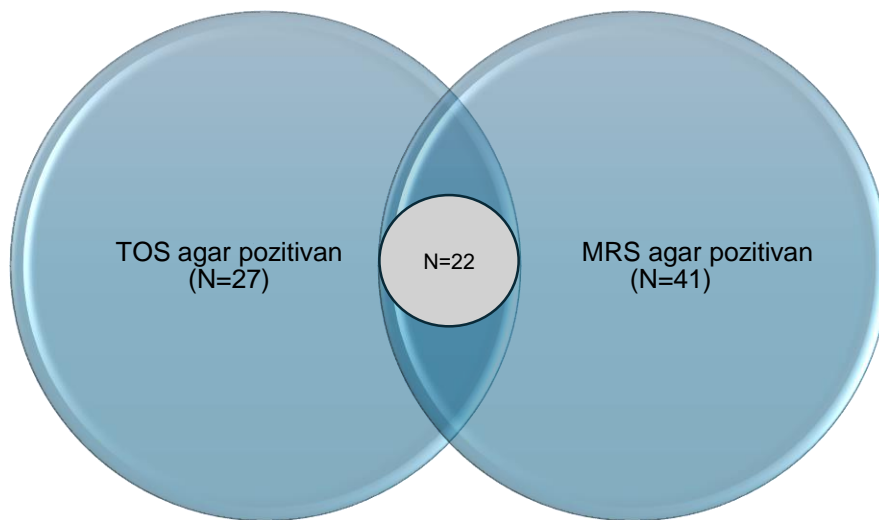
Slika 13. Kolonije *Staphylococcus epidermidis* na krvnom agaru

Tablica 7. Izolirane vrste bakterija u uzorcima sirovog darovanog humanog mlijeka, porast na komercijalnom krvnom agaru, identifikacija MALDI-TOF metodom (N=88)

BROJ IZOLIRANIH UZROČNIKA	IZOLIRANA VRSTA BAKTERIJA	Broj uzoraka (%)
Bez bakterijskog porasta	/	5 (5,6)
1 bakterija	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	41 (46,5)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (3,4)
	<i>Enterococcus faecalis</i>	3 (3,4)
	<i>Acinetobacter junii</i>	3 (3,4)
	<i>Staphylococcus species</i> (koagulaza-negativan)	2 (2,2)
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1 (1,1)
	<i>Rothia spp</i>	1 (1,1)
	<i>Pseudomonas monteilii</i>	1 (1,1)
	<i>Acinetobacter ursingii</i>	1 (1,1)
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (1,1)
2 bakterije	<i>Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecalis</i>	5 (5,6)
	<i>Staphylococcus epidermidis, Acinetobacter junii/johnsonii</i>	2 (2,2)
	<i>Staphylococcus epidermidis, Acinetobacter ursingii</i>	1 (1,1)
	<i>Staphylococcus epidermidis, Streptococcus agalactiae</i> (grupa B)	1 (1,1)
	<i>Staphylococcus epidermidis, Rothia mucilaginosa</i>	1 (1,1)
	<i>Staphylococcus epidermidis, Serratia marcescens</i>	1 (1,1)
	<i>Staphylococcus hominis, Acinetobacter ursingii</i>	1 (1,1)
	<i>Acinetobacter species, Streptococcus oralis</i>	1 (1,1)
	<i>Enterococcus faecalis, Esherichia coli</i>	1 (1,1)
	<i>Acinetobacter junii/johnsonii, Klebsiella oxytoca</i>	1 (1,1)
	<i>Acinetobacter dijkshoorniae, Enterobacter asburiae</i>	1 (1,1)
	<i>Acinetobacter lwoffii, Klebsiella oxytoca</i>	1 (1,1)
	<i>Acinetobacter junii/johnsonii, Enterobacter cloacae</i>	1 (1,1)
	<i>Acinetobacter junii, Stenotrophomonas maltophilia</i>	1 (1,1)
	3 bakterije	<i>Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Lactobacillus gasseri</i>
<i>Staphylococcus epidermidis, Acinetobacter junii, Enterobacter cloacae</i>		1 (1,1)
<i>Acinetobacter junii, Staphylococcus epidermidis, Enterobacter kobei</i>		1 (1,1)
<i>Rothia mucilaginosa, Klebsiella oxytoca, Citrobacter freundii</i>		1 (1,1)
<i>Pseudomonas putida, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae</i>		1 (1,1)
<i>Comamonas spp, Staphylococcus epidermidis, Sphingomonas paucimobilis</i>		1 (1,1)
<i>Acinetobacter junii/johnsonii, Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae</i>		1 (1,1)

MALDI TOF– matriksom posredovana laserska desorpcija/ionizacija vrijeme preleta

Arhivski uzorci mlijeka su nakon odmrzavanja nasađeni na selektivne podloge pogodne za kultivaciju BMK. U 27 (30,7 %) uzoraka došlo je do porasta kolonija na TOS agaru, odnosno u 41 (46,6 %) uzorku na MRS agaru (Slike 14.-16.). Iz 22 (25 %) uzorka porasle su kolonije na obje selektivne podloge, odnosno u 42 (47,7 %) uzorka nije bilo porasta bakterija ni na jednoj selektivnoj podlozi (Slike 14. i 16.).



TOS – transgalaktozilirani oligosaharidi; MRS – De Man, Rogosa i Sharpe

Slika 14. Broj pozitivnih kultura na selektivnim podlogama za bakterije mliječne kiseline



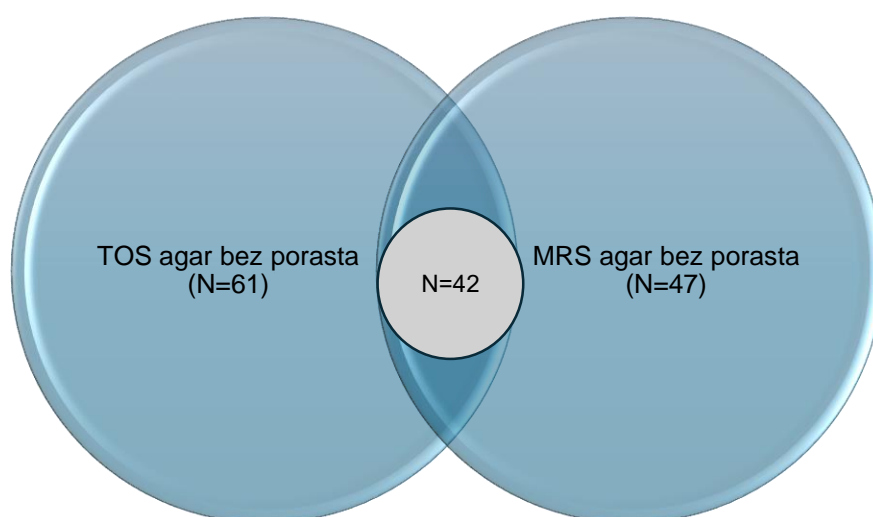
Slika 15. Porast kolonija bifidokabterija na TOS agaru

TOS – transgalaktozilirani oligosaharidi



Slika 16. Porast kolonija laktobacila na MRS agaru

MRS – De Man, Rogosa i Sharpe



TOS – transgalaktozilirani oligosaharidi; MRS – De Man, Rogosa i Sharpe

Slika 17. Negativne kulture na selektivnim podlogama za bakterije mliječne kiseline

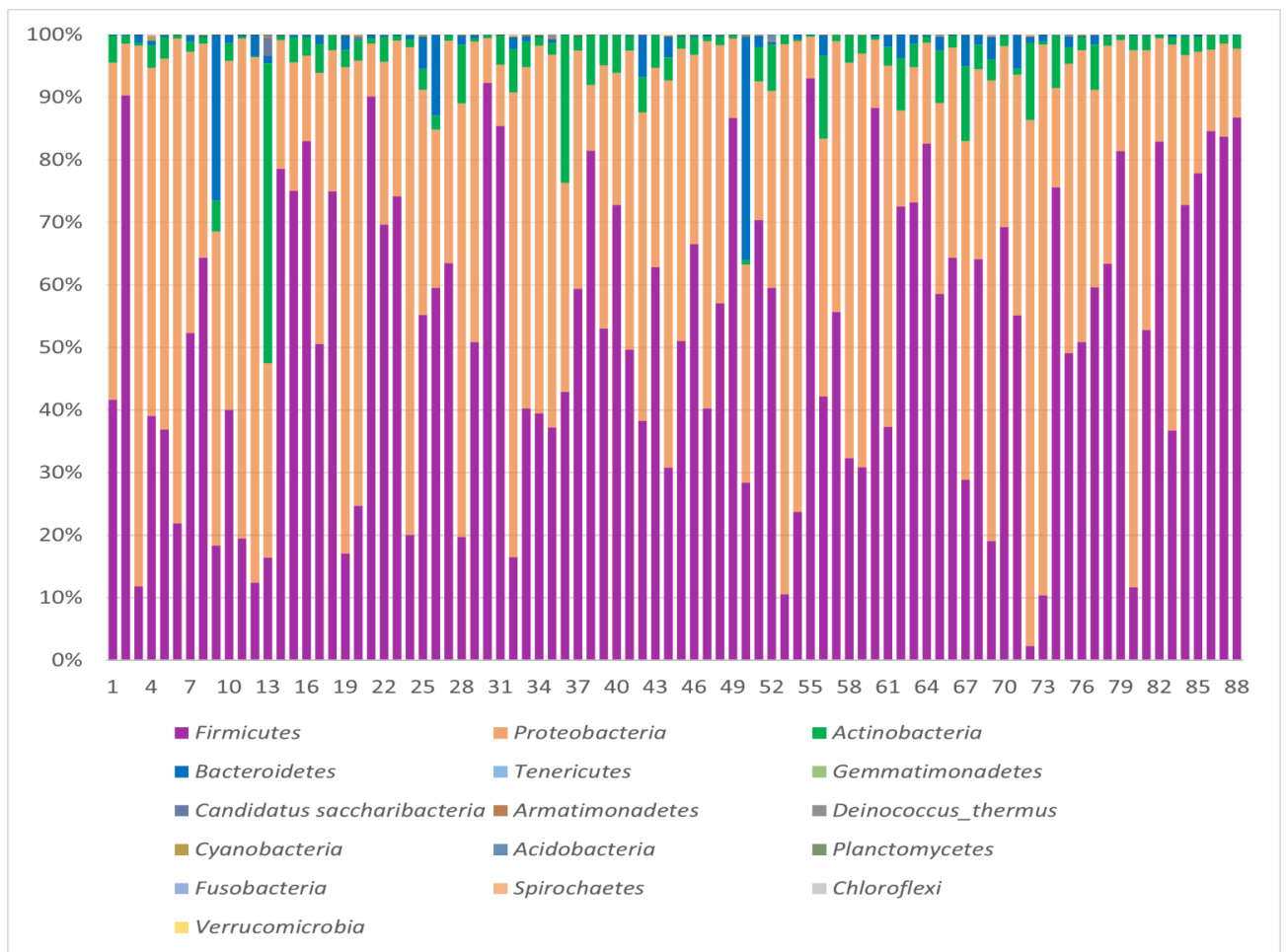
### 5.3. Rezultati sekvenciranja nove generacije izolirane bakterijske DNA iz uzoraka darovanog humanog mlijeka

Po učinjenom sekvenciranju nove generacije, dobiveni podatci o OTU u uzorcima mlijeka razvrstani su u datoteke prema kraljevstvu, koljenu, razredu, redu, porodici, rodu i vrsti.

Tablica 8. Operativne taksonomske jedinice (OTU) dobivene sekvenciranjem uzoraka darovanog humanog mlijeka

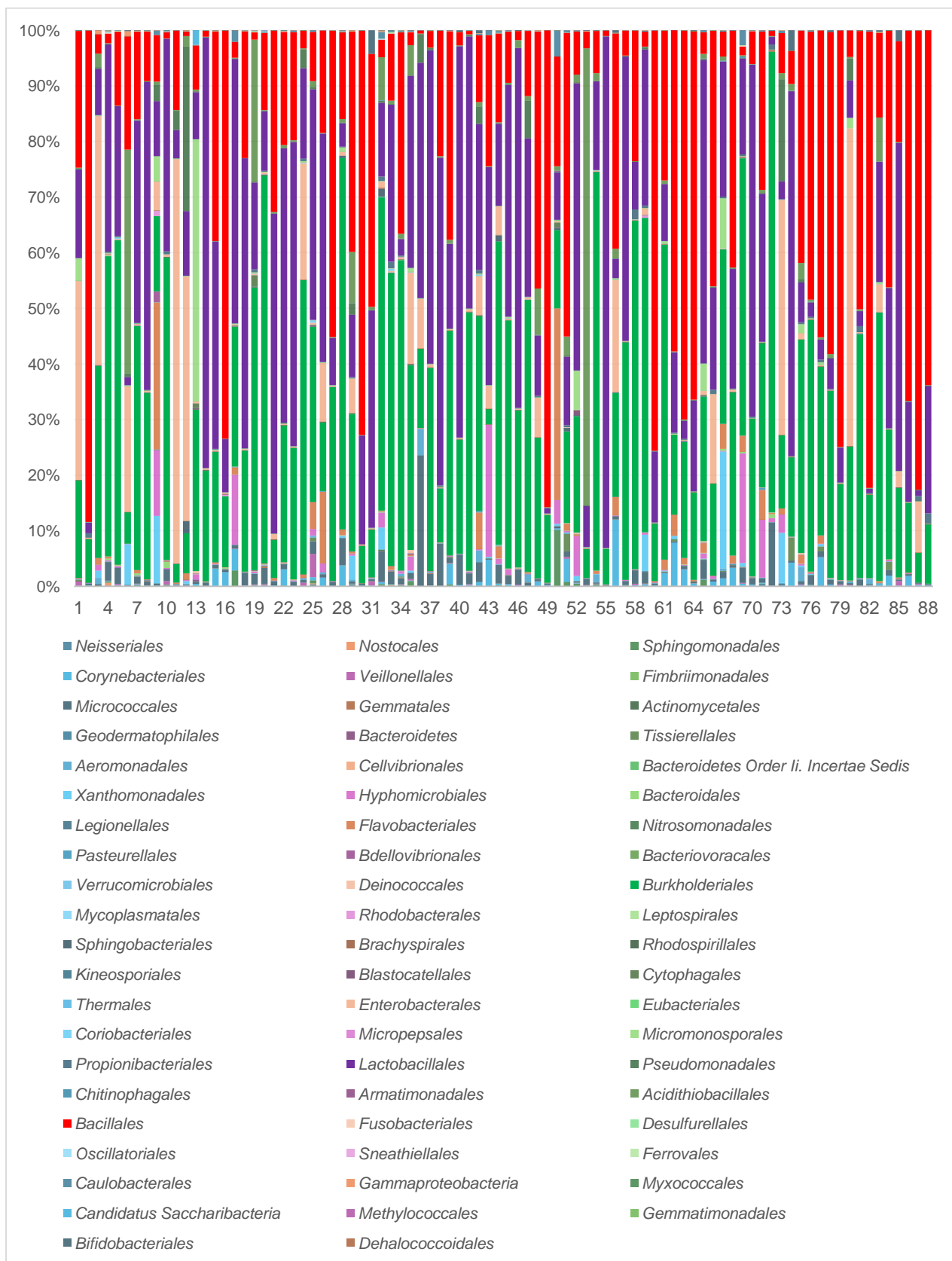
OTU	Broj različitih bakterijskih OTU-a
Kraljevstvo (engl. Kingdom)	1
Koljeno (engl. Phylum)	16
Razred (engl. Class)	31
Red (engl. Order)	62
Porodica (engl. Family)	100
Rod (engl. Genus)	162
Vrsta (engl. Species)	361

Grafički je prikazana relativna zastupljenost OTU-a u pojedinačnim uzorcima mlijeka na razini koljena (Slika 18.) i razini reda (Slika 19.). U Tablici 9. nalaze se najčešće sekvencirane OTU-e na razini roda bakterija iz uzoraka mlijeka u ovom istraživanju, s pripadajućom deskriptivnom statistikom. S obzirom na veliki broj različitih OTU-a na razini roda te nemogućnost preglednog prikaza, na Slici 20. prikazano je samo 19 rodova bakterija, od kojih je 18 najčešće sekvenciranih uz, za istraživanje značajni *Bifidobacterium*, a preostalih 143 su u stupcima i legendi označeni kao ostali rodovi. U vizualizaciji s Qiime 2 platforme (Slike 21. i 22.) prikazana je i relativna zastupljenost najčešćih OTU-a na razini roda, dobiveni analizom prema Greengenes bazi podataka.



Slika 18. Relativna zastupljenost operativnih taksonomskih jedinica na razini koljena



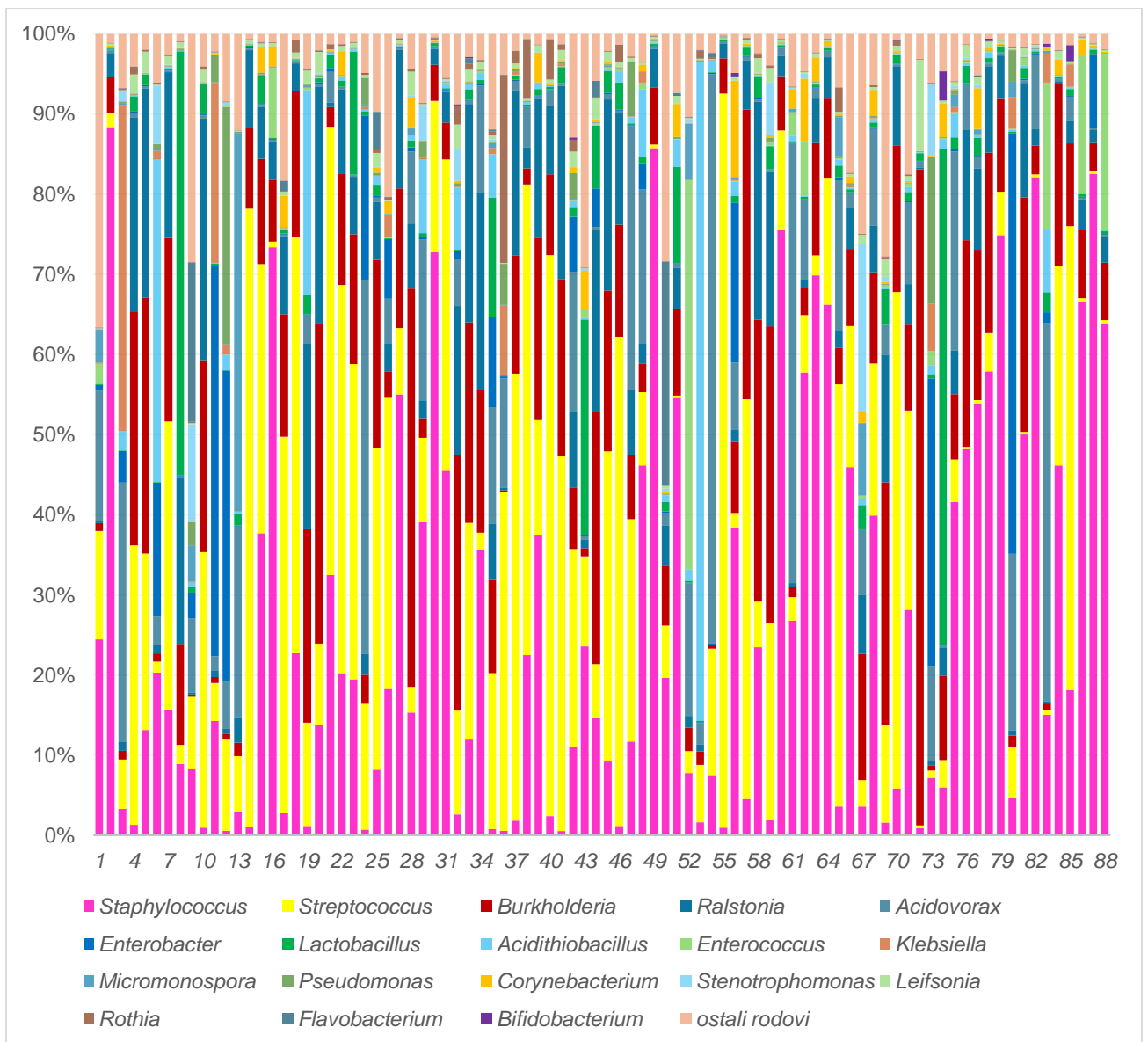


Slika 19. Relativna zastupljenost operativnih taksonomskih jedinica na razini **reda**

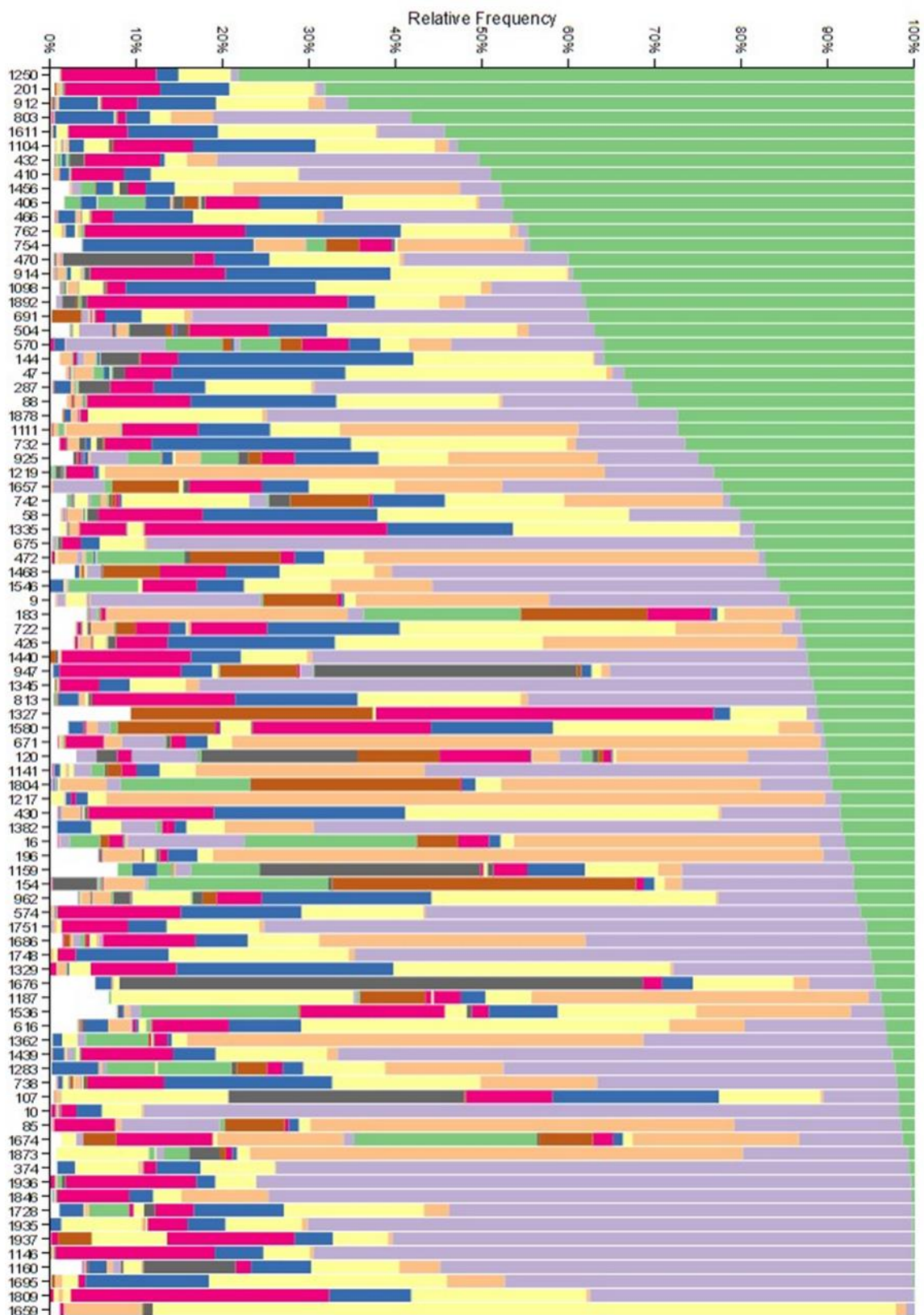
Tablica 9. Najzastupljeniji rodovi bakterija (%) iz uzoraka mlijeka

Rod bakterija	N (%) <sup>a</sup>	Prosjek	SD	Min	Max	25. centila	Medijan	75. centila
<i>Staphylococcus</i>	88 (100)	26,201	25,687	0,531	88,349	3,572	16,857	45,816
<i>Streptococcus</i>	88 (100)	20,606	21,465	0,258	91,562	3,244	12,301	35,747
<i>Burkholderia</i>	88 (100)	13,642	13,343	0,279	81,890	3,450	10,196	21,626
<i>Ralstonia</i>	88 (100)	8,351	8,511	0,177	30,184	1,906	5,122	12,981
<i>Acidovorax</i>	88 (100)	7,587	13,072	0,153	71,035	0,273	1,211	9,752
<i>Lactobacillus</i>	88 (100)	3,051	9,194	0,070	61,925	0,234	0,597	1,560
<i>Enterobacter</i>	88 (100)	3,361	9,823	0,049	52,414	0,103	0,132	0,322
<i>Acidithiobacillus</i>	88 (100)	2,561	10,069	0,051	82,249	0,110	0,231	0,775
<i>Enterococcus</i>	87 (99)	1,574	6,251	0,000	48,582	0,015	0,090	0,207
<i>Klebsiella</i>	87 (99)	1,146	5,031	0,000	40,672	0,017	0,065	0,106
<i>Micromonospora</i>	88 (100)	0,988	5,182	0,006	47,154	0,025	0,043	0,114
<i>Pseudomonas</i>	88 (100)	0,984	3,810	0,004	29,573	0,031	0,056	0,171
<i>Corynebacterium</i>	88 (100)	0,959	1,901	0,022	11,977	0,054	0,134	0,692
<i>Stenotrophomonas</i>	88 (100)	0,826	2,922	0,004	21,017	0,022	0,038	0,123
<i>Leifsonia</i>	88 (100)	0,809	1,366	0,024	11,339	0,139	0,420	0,971
<i>Rothia</i>	88 (100)	0,686	2,670	0,001	23,459	0,032	0,102	0,246
<i>Flavobacterium</i>	88 (100)	0,668	3,658	0,004	27,946	0,012	0,016	0,022
<i>Rhizobium</i>	88 (100)	0,655	2,264	0,009	13,165	0,022	0,035	0,129
<i>Escherichia</i>	70 (79,5)	0,462	3,723	0,000	34,957	0,002	0,030	0,054
<i>Chryseobacterium</i>	85 (100)	0,449	1,182	0,000	6,204	0,010	0,019	0,144
<i>Agitococcus</i>	87 (98,8)	0,363	1,489	0,000	12,470	0,009	0,021	0,092
<i>Serratia</i>	87 (98,8)	0,269	1,718	0,000	15,535	0,005	0,010	0,019
<i>Elizabethkingia</i>	87 (98,8)	0,268	0,720	0,000	4,309	0,011	0,021	0,119
<i>Methylobacterium</i>	87 (98,8)	0,252	1,250	0,000	10,914	0,006	0,013	0,045
<i>Propionibacterium</i>	88 (100)	0,226	0,348	0,004	1,829	0,038	0,084	0,227
<i>Aeromonas</i>	85 (96,6)	0,221	0,650	0,000	4,775	0,007	0,015	0,093
<i>Bacillus</i>	84 (95,4)	0,193	0,659	0,000	4,953	0,005	0,013	0,059
<i>Ochrobactrum</i>	66 (75)	0,190	1,578	0,000	14,793	0,000	0,009	0,014
<i>Sphingomonas</i>	88 (100)	0,186	0,839	0,002	7,414	0,010	0,027	0,063
<i>Brevundimonas</i>	85 (96,6)	0,174	0,571	0,000	4,173	0,005	0,014	0,076
<i>Agrobacterium</i>	75 (85,2)	0,165	0,745	0,000	6,101	0,003	0,006	0,030
<i>Bifidobacterium</i>	62 (70,4)	0,090	0,438	0,000	3,619	0,000	0,003	0,011
<i>Veillonella</i>	87 (98,8)	0,137	0,473	0,000	4,204	0,003	0,012	0,111
<i>Leclercia</i>	54 (61,3)	0,108	0,637	0,000	4,392	0,000	0,003	0,008
<i>Gemella</i>	80 (91)	0,104	0,271	0,000	1,384	0,004	0,008	0,035
<i>Pantoea</i>	50 (56,8)	0,102	0,664	0,000	5,811	0,000	0,003	0,009
<i>Citrobacter</i>	35 (39,7)	0,010	0,051	0,000	0,438	0,000	0,000	0,002
<i>Comamonas</i>	13 (14,7)	0,001	0,006	0,000	0,037	0,000	0,000	0,000

<sup>a</sup> broj i postotak uzoraka u kojima je detektiran rod sekvenciranjem nove generacije



Slika 20. Najzastupljenije operative taksonomske jedinice na razini **roda**



Slika 21. Najzastupljenije operative taksonomske jedinice na razini **roda** u pojedinačnim **uzorcima mlijeka**, prikaz iz platforme Qiime 2, silazno od roda *Streptococcus*

	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Streptococcaceae;g_Streptococcus
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Staphylococcaceae;g_Staphylococcus
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Pseudomonadales;f_Moraxellaceae;g_Acinetobacter
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Burkholderiaceae;g_Burkholderia
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Oxalobacteraceae;g_Ralstonia
	k_Bacteria;_:_:_:_:_
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;_
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Lactobacillaceae;g_Lactobacillus
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_Enterobacter
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Pseudomonadales;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Lactobacillaceae;g_
	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Micrococcaceae;g_Rothia
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Xanthomonadales;f_Xanthomonadaceae;g_Stenotrophomor
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Rhizobiaceae;g_Agrobacterium
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Flavobacteriia;o_Flavobacteriales;f_Flavobacteriaceae;g_Flavobacterium
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Pseudomonadales;f_Moraxellaceae;g_Enhydrobacter
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Flavobacteriia;o_Flavobacteriales;f_[Weeksellaceae];g_Chryseobacterium
	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Microbacteriaceae;g_Cryocolla
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Enterococcaceae;_
	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Corynebacteriaceae;g_Corynebacterium
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Brucellaceae;g_Ochrobactrum
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;_:_:_:_
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_Klebsiella
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Methylobacteriaceae;g_
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Veillonella
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Bacillaceae;g_Bacillus
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Gemellales;f_Gemellaceae;g_
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Caulobacteriales;f_Caulobacteraceae;g_
	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;_:_:_
	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Bifidobacteriales;f_Bifidobacteriaceae;g_Scardovia
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Delftia
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Sphingomonas
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Bdellovibrionales;f_Bdellovibrionaceae;g_Bdellovibrio
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Sphingobacteriia;o_Sphingobacteriales;f_:_:_

Slika 22. Legenda za Sliku 21. najzastupljenije operative taksonomske jedinice na razini roda

#### 5.4. Povezanost sastava bakterijske mikrobiote darovanog humanog mlijeka s obilježjima darivateljica

Uzorci darovanog mlijeka razvrstani su u skupine s obzirom na izloženost darivateljica antibioticima unutar posljednjih 6 mjeseci prije izdavanja darovanog mlijeka. U Tablici 10. prikazani su medijani i interkvartilni rasponi pojedinih obilježja te usporedba skupina Mann Whitney U testom. U donjem dijelu tablice uspoređene su vrijednosti medijana relativne zastupljenosti najčešće izoliranih rodova bakterija, uz dodatak rodova za koje je dokazana statistička značajnost usporedbom skupina. Zbog preglednosti rezultata, u Tablicama 10.-27. su prikazane vrijednosti za deset najzastupljenijih rodova, rod *Bifidobacterium* i one sa statistički značajnim rezultatima. Nisu prikazane vrijednosti usporedba skupina ni korelacija za rodove koji su bili manje zastupljeni od roda *Klebsiella* (Tablica 9., rodovi od *Micromonospora* do *Comamonas*).

Tablica 10. Usporedba skupina darivateljica i njihovih uzoraka mlijeka podijeljenih prema izloženosti antibioticima unutar posljednjih 6 mjeseci prije darivanja mlijeka

Obilježje	IZLOŽENE ANTIBIOTICIMA (N=35) Medijan (25.-75. centila)	NISU BILE IZLOŽENE ANTIBIOTICIMA (N=53) Medijan (25.-75. centila)	Mann Whitney U	Z	P
Dob darivateljice (godine)	32 (30-37)	31(29-34,5)	768	-1,364	0,173
ITM darivateljice (kg/m <sup>2</sup> )	23 (20-28)	23 (22-26)	883,5	-0,377	0,706
Termin poroda (GD)	38 (33-39)	40 (39-40)	425,5	-4,391	<b>0,000</b>
Tjedni laktacije	11 (4-17)	7 (4-15,5)	868,5	-0,504	0,614
Pohrana kod kuće (dani)	20 (10-32)	23 (17-32,5)	815,5	-0,956	0,339
Prosjek temperature u kućnom zamrzivaču (-°C)	18,5 (17-21,75)	20 (17-22)	430	-0,991	0,322
Pohrana u Banci, dani prije stvaranja mješavine	10 (6-25)	9 (6-25,5)	899,5	-0,240	0,811
Pohrana u Banci, dani od stvaranja mješavine do izolacije DNA	435 (143-173,5)	296 (173,5-458)	770	-1,343	0,179

<b>Obilježje</b>	<b>IZLOŽENE ANTIBIOTICIMA (N=35) Medijan (25.-75. centila)</b>	<b>NISU BILE IZLOŽENE ANTIBIOTICIMA (N=53) Medijan (25.-75. centila)</b>	<b>Mann Whitney U</b>	<b>Z</b>	<b>P</b>
Masti (g/100mL)	3,8 (3,5-4,9)	3,5 (2,9-4,15)	704	-1,907	0,057
Ugljikohidrati (g/100mL)	8,4 (8,2-8,5)	8,5 (8,3-8,55)	693,5	-2,026	<b>0,043</b>
Proteini (g/100mL)	1,1 (0,9-1,3)	1,1 (0,9-1,2)	838,5	-0,774	0,439
Energetska vrijednost (kcal/100mL)	76 (71-86)	72 (66-78)	711,5	-1,843	0,065
Koncentracija DNA ng/μL	10,72 (5,52-18,83)	10,84 (6,71-20,42)	865,5	-0,529	0,597
<b>Rod bakterija</b>	<b>Medijan relativne zastupljenosti u % (25.-75. centila)</b>				
<i>Bifidobacterium</i>	0,0019 (0,00-0,001)	0,004 (0,00-0,002)	761	-1,438	0,150
<i>Lactobacillus</i>	0,5 (0,2-1,4)	0,8 (0,28-1,74)	771	-1,334	0,182
<i>Staphylococcus</i>	26,79 (14,26-54,59)	8,88 (2,12-35,45)	572	-3,031	<b>0,002</b>
<i>Streptococcus</i>	4,74 (0,51-22,02)	17,6 (6,6-38,77)	593	-2,852	<b>0,004</b>
<i>Burkholderia</i>	10,03 (3,75-18,75)	10,31 (3,33-22,66)	914	-0,115	0,908
<i>Ralstonia</i>	4,78 (2,48-10,58)	5,41 (1,32-14,94)	916	-0,098	0,922
<i>Acidovorax</i>	0,35 (0,24-8,98)	1,77 (0,31-11,07)	758	-1,445	0,148
<i>Enterobacter</i>	0,13 (0,10-0,27)	0,14 (0,10-0,34)	891	-0,311	0,756
<i>Acidithiobacillus</i>	0,24 (0,11-0,68)	0,22 (0,11-0,97)	851	-0,652	0,514
<i>Enterococcus</i>	0,05 (0,01-0,25)	0,10 (0,02-0,18)	888	-0,337	0,736
<i>Klebsiella</i>	0,06 (0,02-0,09)	0,07 (0,02-0,09)	860	-0,575	0,565
<i>Rothia</i>	0,05 (0,02-0,16)	0,14 (0,05-0,52)	600	-2,792	<b>0,005</b>
<i>Rhizobium</i>	0,03 (0,02-0,06)	0,05 (0,02-0,24)	649	-2,374	<b>0,018</b>
<i>Agrobacterium</i>	0,00 (0,00-0,01)	0,01 (0,00-0,08)	669	-2,207	<b>0,027</b>

ITM – indeks tjelesne mase; GD – gestacijska dob djeteta u tjednima; DNA – deoksiribonukleinska kiselina

Skupina darivateljica koje su bile izložene antibioticima unutar posljednjih 6 mjeseci razlikovala se po kraćem trajanju trudnoće, a uzorci mlijeka po nižoj razini UH-a, većoj relativnoj zastupljenosti bakterija iz roda *Staphylococcus* te manjoj zastupljenosti rodova *Streptococcus*, *Rothia*, *Rhizobium* i *Agrobacterium* u odnosu na uzorke darivateljica koje nisu primale antibiotike (Tablica 10.).

Analizom podataka o izloženosti antibiotskim lijekovima, u Tablici 11. prikazano je koliko je darivateljica primilo koju vrstu antibiotika. Od njih 35 ukupno, 27 (77 %) dobilo je profilaktičku dozu cefazolina na dan poroda. Ostale darivateljice primile su antibiotsku terapiju zbog različitih indikacija, pojedine i terapiju i profilaksu, svaka je primila drugačiju kombinaciju lijekova i u različitom razdoblju trudnoće odnosno laktacije (Tablica 11.).

Tablica 11. Izloženost darivateljica humanog mlijeka antibioticima (N=35)

ANTIBIOTICI generički naziv, doza i put primjene	TJEDNI LAKTACIJE U VRIJEME DARIVANJA	
	Prosjek (raspon)	Medijan
<b>PROFILAKSA (N=27)</b> cefazolin 2g i.v. na dan poroda	13 (2-25)	15
<b>TERAPIJA (N=8)</b> koamoksiklav 1 mj prije poroda; peripartalno ampicilin 2g i.v. azitromicin p.o. 1mj prije poroda ampicilin i.v. 1,5 mjesec prije poroda, ertapenem 1 mjesec prije poroda cefuroksim 2x500mg p.o. 9 dana prije poroda cefuroksim 3x1,5 gr i.v. 7 dana prije poroda, nakon poroda- garamicin 2x120 mg, metronidazol 3x500 mg i.v., cefuroksim aksetil 2x500 mg garamicin i ampicilin i.v. 14 dana prije poroda, amoksicilin 3x500mg p.o.nakon poroda peripartalno- azitromicin 1g p.o. jednokratno i ampicilin 2x2g i.v., cefazolin 1gr preoperativno; nakon poroda- flukloksacilin i.v. i p.o., garamicin 2x120mg i.v., metronidazol 3x500mg i.v., kloksacilin 4x1g i.v. cefaleksin p.o. tijekom laktacije 7 dana	5 (1-15)	3,5

i.v. – intravenski; p.o. – per os

Nalazi uzoraka mlijeka darivateljica koje su primale antibiotike razvrstani su u terapijsku i profilaktičku skupinu te su uspoređeni prema obilježjima i zastupljenosti pojedinih rodova (Tablica 12.).



Tablica 12. Usporedba skupina darivateljica i uzoraka mlijeka podijeljenih prema primanju antibiotske profilakse odnosno terapije

Obilježje	ANTIBIOTSKA PROFILAKSA (N=27) Medijan (25.-75. centila)	ANTIBIOTSKA TERAPIJA (N=8) Medijan (25.-75. centila)	Mann Whitney U	Z	P
Dob darivateljice (godine)	32 (30-37)	33 (31-38)	87	-0,829	0,407
ITM darivateljice (kg/m <sup>2</sup> )	23 (21-29)	21,5 (19,5-27)	84	-0,947	0,343
Termin poroda (GD)	38 (35-40)	34 (27-36,5)	42,5	-2,593	<b>0,010</b>
Tjedni laktacije	14 (7-18)	3,5 (2-7)	40	-2,676	<b>0,007</b>
Pohrana kod kuće (dani)	25 (13-32)	11 (5-31)	77,5	-1,200	0,230
Prosjek temperature u kućnom zamrzivaču (-°C)	19 (17-22)	17 (13-18)	13	-1,624	0,104
Pohrana u Banci, dani prije stvaranja mješavine	8 (6-19)	27,5 (10-45,5)	63,5	-1,760	0,078
Pohrana u Banci, dani od stvaranja mješavine do izolacije DNA	468 (233-650)	330,5 (93-538)	85,5	-0,884	0,377
Masti (g/100mL)	3,8 (3,5-4,9)	4,05 (3,25-4,8)	103	-0,197	0,844
Ugljikohidrati (g/100mL)	8,4 (8,2-8,5)	8,35 (8,2-8,4)	87,5	-0,823	0,411
Proteini (g/100mL)	1 (0,9-1,2)	1,4 (1,1-1,6)	49,5	-2,341	<b>0,019</b>
Energetska vrijednost (kcal/100mL)	75 (71-86)	79 (70-86)	101,5	-0,256	0,798
Koncentracija DNA ng/μL	11,99 (5,52-18,16)	9,95 (4,04-24,87)	107	-0,039	0,969
<b>Rod bakterija</b>	<b>Medijan relativne zastupljenosti u % (25.-75. centila)</b>				
<i>Bifidobacterium</i>	0,00 (0,00-0,001)	0,00 (0,00-0,00)	100,5	-0,301	0,764
<i>Lactobacillus</i>	0,51 (0,2-1,34)	0,39 (0,18-2,07)	106	-0,079	0,937
<i>Staphylococcus</i>	22,73 (13,78-50,02)	60,77 (21,95-82,32)	69	-1,532	0,126
<i>Streptococcus</i>	6,17 (1,74-22,02)	0,58 (0,37-26,42)	77	-1,218	0,223

Rod bakterija	Medijan relativne zastupljenosti u % (25.-75. centila)		Mann Whitney U	Z	P
<i>Burkholderia</i>	10,51 (3,57-18,75)	7,42 (3,51-19,18)	97	-0,432	0,666
<i>Ralstonia</i>	3,76 (2,5-10,58)	4,8 (1,83-10,44)	97	-0,432	0,666
<i>Acidovorax</i>	0,55 (0,25-8,98)	0,29 (0,2-7,57)	88	-0,786	0,432
<i>Enterobacter</i>	0,13 (0,11-0,27)	0,11 (0,1-0,4)	99	-0,354	0,724
<i>Acidithiobacillus</i>	0,3 (0,11-0,88)	0,13 (0,09-0,26)	71	-1,453	0,146
<i>Enterococcus</i>	0,03 (0,01-0,22)	0,16 (0,08-1,3)	62	-1,807	0,071
<i>Klebsiella</i>	0,06 (0,02-0,09)	0,03 (0,02-0,12)	107	-0,039	0,969
<i>Rothia</i>	0,09 (0,03-0,16)	0,02 (0,01-0,04)	54	-2,121	<b>0,034</b>
<i>Citrobacter</i>	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	56	-2,356	<b>0,018</b>

ITM – indeks tjelesne mase; GD – gestacijska dob djeteta u tjednima; DNA – deoksiribonukleinska kiselina

Skupina darivateljica koje su primale antibiotsku terapiju rodila je u ranijoj gestacijskoj dobi djeteta te su u ranijim tjednima laktacije izdajale mlijeko. Sukladno tome, uzorci mlijeka iz te skupine imali su višu razinu proteina. U uzorcima mlijeka darivateljica koje su primile terapiju, statistički je značajno manja zastupljenost bakterija iz rodova *Rothia* i *Citrobacter* u odnosu na uzorke mlijeka darivateljica koje su primale antibiotsku profilaksu (Tablica 12.).

Uspoređene su skupine uzoraka mlijeka prema načinu poroda darivateljica te medijani zastupljenosti najčešće izoliranih rodova bakterija u ovom istraživanju (Tablica 13.).

Tablica 13. Usporedba skupina darivateljica i njihovih uzoraka mlijeka prema načinu poroda

Obilježje	VAGINALNI POROD	CARSKI REZ	Mann Whitney U	Z	P
	(N=59) Medijan (25.-75. centila)	(N=29) Medijan (25.-75. centila)			
Dob darivateljice (godine)	31 (29-34)	33 (30-37)	667	-1,679	0,093
ITM darivateljice (kg/m <sup>2</sup> )	23 (22-26)	23 (21-28)	815	-0,361	0,718
Termin poroda (GD)	39 (39-40)	38 (33-40)	504,5	-3,196	<b>0,001</b>
Tjedni laktacije	7 (4-15)	12 (7-17)	673,5	-1,620	0,105
Pohrana kod kuće (dani)	23 (16-32)	20 (10-32)	771	-0,751	0,453
Prosjek temperature u kućnom zamrzivaču (-°C)	20 (17-22)	19 (17-22)	443	-0,560	0,575
Pohrana u Banci, dani prije stvaranja mješavine	9 (6-30)	9 (6-19)	822	-0,299	0,765
Pohrana u Banci, dani od stvaranja mješavine do izolacije DNA	296 (162-447)	503 (233-650)	591,5	-2,344	<b>0,019</b>
Masti (g/100mL)	3,5 (2,9-4,1)	4 (3,5-4,9)	620,5	-2,088	<b>0,037</b>
Ugljikohidrati (g/100mL)	8,4 (8,3-8,5)	8,3 (8,2-8,5)	649,5	-1,857	0,063
Proteini (g/100mL)	1,1 (0,9-1,2)	1 (0,9-1,2)	851	-0,041	0,968
Energetska vrijednost (kcal/100mL)	72 (66-78)	76 (72-86)	643	-1,888	0,059
Koncentracija DNA ng/μL	10,75 (6,51-19,45)	12,74 (6,8-18,83)	838,5	-0,151	0,880
<b>Rod bakterija</b>	<b>Medijan relativne zastupljenosti u % (25.-75. centila)</b>				
<i>Bifidobacterium</i>	0,00 (0,00-0,01)	0,00 (0,00-0,01)	690,5	-1,484	0,138
<i>Lactobacillus</i>	0,69 (0,26-1,89)	0,51 (0,20-1,34)	726	-1,150	0,250
<i>Staphylococcus</i>	11,08 (2,39-41,58)	24,45 (14,26-50,02)	613	-2,153	<b>0,031</b>
<i>Streptococcus</i>	15,85 (5,66-38,87)	6,17 (1,74-15,71)	610	-2,179	<b>0,029</b>
<i>Burkholderia</i>	10,08 (3,36-22,53)	10,51 (3,61-10,13)	839	-0,146	0,884
<i>Ralstonia</i>	5,15 (1,49-13,99)	4,83 (2,5-14,94)	839	-0,146	0,884

Rod bakterija	Medijan relativne zastupljenosti u % (25.-75. centila)		Mann Whitney U	Z	P
<i>Acidovorax</i>	1,77 (0,3-9,88)	0,35 (0,24-8,98)	712	-1,274	0,203
<i>Enterobacter</i>	0,13 (0,10-0,34)	0,13 (0,10-0,27)	851	-0,040	0,968
<i>Acidithiobacillus</i>	0,21 (0,11-0,78)	0,3 (0,11-0,76)	854	-0,013	0,989
<i>Enterococcus</i>	0,11 (0,02-0,18)	0,04 (0,01-0,39)	781	-0,661	0,508
<i>Klebsiella</i>	0,07 (0,02-0,20)	0,06 (0,02-0,09)	832	-0,209	0,835
<i>Rothia</i>	0,12 (0,04-0,52)	0,05 (0,03-0,16)	609	-2,188	<b>0,029</b>
<i>Rhizobium</i>	0,05 (0,02-0,22)	0,03 (0,02-0,05)	630	-2,002	<b>0,045</b>
<i>Agrobacterium</i>	0,01 (0,00-0,06)	0,00 (0,00-0,01)	628	-2,023	<b>0,043</b>

ITM – indeks tjelesne mase; GD – gestacijska dob djeteta u tjednima; DNA – deoksiribonukleinska kiselina

Skupina darivateljica koje su rodile carskim rezom razlikovala se od skupine darivateljica koje su rodile vaginalno po kraćem trajanju trudnoće i duljoj pohrani uzoraka mlijeka u BHM-u prije izolacije bakterijske DNA. U uzorcima mlijeka darivateljica koje su rodile carskim rezom bile su više razine masti, veća zastupljenost bakterija iz roda *Staphylococcus* te manja zastupljenosti rodova *Streptococcus*, *Rothia*, *Rhizobium* i *Agrobacterium*, u odnosu na uzorke darivateljica koje su rodile vaginalno (Tablica 13.).

Darivateljice mlijeka su iz cijele RH, te smo htjeli ispitati postoji li razlika u zastupljenosti rodova bakterija ovisno o mjestu stanovanja. Grad Zagreb je najčešće mjesto stanovanja darivateljica mlijeka te su ostale regije svrstane u jednu skupinu. U Tablici 14. prikazane su usporedbe skupina razvrstane po mjestu stanovanja i zastupljenosti najčešće izoliranih rodova bakterija u DHM-u.

Tablica 14. Usporedba skupina darivateljica i njihovih uzoraka mlijeka prema mjestu stanovanja

Obilježje	GRAD ZAGREB (N=57) Medijan (25.-75. centila)	OSTATAK RH (N=31) Medijan (25.-75. centila)	Mann Whitney U	Z	P
Dob darivateljice (godine)	33 (30-36)	30 (29-33)	686,5	-1,726	0,084
ITM darivateljice (kg/m <sup>2</sup> )	23 (21-26)	24 (22-27)	750,5	-1,167	0,243
Termin poroda (GD)	39 (38,5-40)	38 (36-40)	647	-2,119	<b>0,034</b>
Tjedni laktacije	9 (4-16)	7 (3-17)	736,5	-1,288	0,198
Pohrana kod kuće (dani)	23 (17-32)	21 (10-34)	783,5	-0,874	0,382
Prosjek temperature u kućnom zamrzivaču (-°C)	19 (17-22)	19,5 (17-22)	429	-0,435	0,664
Pohrana u Banci, dani prije stvaranja mješavine	8 (6-18)	10 (7-29)	766,5	-1,026	0,305
Pohrana u Banci, dani od stvaranja mješavine do izolacije DNA	412 (201-526)	296 (94-435)	700,5	-1,599	0,110
Masti (g/100mL)	3,7 (2,95-4,5)	3,7 (3,1-4,2)	857	-0,232	0,817
Ugljikohidrati (g/100mL)	8,4 (8,25-8,5)	8,4 (8,3-8,5)	823,5	-0,532	0,595
Proteini (g/100mL)	1 (0,9-1,2)	1,1 (0,9-1,3)	769	-1,020	0,308
Energetska vrijednost (kcal/100mL)	73 (66,5-80)	74 (68-81)	872,5	-0,096	0,923
Koncentracija DNA ng/μL	11,58 (5,66-19,41)	10,02 (6,81-17,33)	849,5	-0,297	0,766
<b>Rod bakterija</b>	<b>Medijan relativne zastupljenosti u % (25.-75. centila)</b>				
<i>Bifidobacterium</i>	0,002 (0,00- 0,011)	0,004 (0,001-0,019)	775,5	-0,956	0,339
<i>Lactobacillus</i>	0,68 (0,22-1,65)	0,52 (0,24-1,58)	880	-0,031	0,976
<i>Staphylococcus</i>	14,26 (2,81-32,91)	35,54 (5,95-50,01)	682	-1,760	0,078
<i>Streptococcus</i>	12,94 (5,53-38,99)	7,17 (1,36-24,82)	652	-2,022	<b>0,043</b>

Rod bakterija	Medijan relativne zastupljenosti u % (25.-75. centila)		Mann Whitney U	Z	P
<i>Burkholderia</i>	11,64 (3,38-23,82)	8,04 (3,57-13,97)	685	-1,734	0,083
<i>Ralstonia</i>	6,46 (2,11-14,8)	3,52 (1,09-8,11)	721	-1,419	0,156
<i>Acidovorax</i>	1,18 (0,28-9,12)	1,24 (0,26-12,08)	865	-0,162	0,872
<i>Enterobacter</i>	0,12 (0,1-0,25)	0,14 (0,1-0,49)	795	-0,773	0,439
<i>Acidithiobacillus</i>	0,17 (0,1-0,74)	0,25 (0,12-1,12)	785	-0,860	0,390
<i>Enterococcus</i>	0,05 (0,01-0,16)	0,11 (0,02-0,28)	692	-1,673	0,094
<i>Klebsiella</i>	0,06 (0,01-0,09)	0,06 (0,02-0,24)	796	-0,764	0,445
<i>Rothia</i>	0,15 (0,05-0,36)	0,03 (0,01-0,15)	590	-2,564	<b>0,010</b>
<i>Serratia</i>	0,007 (0,004-0,015)	0,015 (0,007-0,023)	577,000	-2,677	<b>0,007</b>

ITM – indeks tjelesne mase; GD – gestacijska dob djeteta u tjednima; DNA – deoksiribonukleinska kiselina

Darivateljice koje su stanovale izvan Zagreba rodile su ranije, a u uzorcima njihovog mlijeka manja je zastupljenost bakterija iz roda *Streptococcus* i *Rothia*, a veća zastupljenost roda *Serratia* u odnosu na uzorke darivateljica koje su stanovale u Zagrebu (Tablica 14.).

Tablica 15. Korelacije obilježja majki i zastupljenosti rodova bakterija

Rod bakterija	Dob darivateljice (godine)		ITM darivateljice (kg/m <sup>2</sup> )		Termin poroda (GD)	
	Korelacijski koeficijent	P	Korelacijski koeficijent	P	Korelacijski koeficijent	P
<i>Bifidobacterium</i>	-0,060	0,577	0,210	<b>0,050</b>	-0,085	0,433
<i>Lactobacillus</i>	0,115	0,285	-0,018	0,871	0,007	0,951
<i>Staphylococcus</i>	0,131	0,224	0,152	0,156	-0,353	<b>0,001</b>
<i>Streptococcus</i>	-0,087	0,422	-0,130	0,229	0,318	<b>0,003</b>
<i>Burkholderia</i>	0,068	0,529	-0,138	0,199	0,036	0,740
<i>Ralstonia</i>	0,116	0,281	-0,139	0,197	0,105	0,329
<i>Acidovorax</i>	-0,183	0,087	0,101	0,348	0,072	0,503
<i>Enterobacter</i>	-0,182	0,089	0,033	0,758	0,133	0,218
<i>Acidithiobacillus</i>	0,012	0,913	0,029	0,787	-0,037	0,729
<i>Enterococcus</i>	0,064	0,556	0,139	0,196	-0,186	0,083
<i>Klebsiella</i>	-0,123	0,252	-0,034	0,751	0,079	0,466
<i>Rothia</i>	-0,167	0,119	-0,095	0,379	0,430	<b>0,000</b>
<i>Agitococcus</i>	-0,095	0,376	0,257	<b>0,015</b>	0,021	0,846
<i>Serratia</i>	-0,185	0,085	0,247	<b>0,020</b>	-0,034	0,751
<i>Ochrobactrum</i>	-0,059	0,584	-0,244	<b>0,022</b>	0,131	0,224
<i>Propionibacterium</i>	0,070	0,517	-0,019	0,858	-0,278	<b>0,009</b>
<i>Sphingomonas</i>	0,090	0,403	-0,126	0,243	0,220	<b>0,040</b>
<i>Gemella</i>	-0,063	0,558	-0,139	0,195	0,301	<b>0,004</b>
<i>Citrobacter</i>	-0,266	<b>0,012</b>	-0,172	0,108	0,161	0,133

ITM – indeks tjelesne mase; GD – gestacijska dob djeteta u tjednima

U Tablici 15. prikazani su rezultati korelacije kvantitativnih varijabli darivateljica sa zastupljenošću bakterijskih rodova u DHM-u. Statistički značajna negativna korelacija

nađena je između dobi darivateljice i roda *Citrobacter*. Indeks tjelesne mase darivateljica pozitivno je korelirao sa zastupljenošću bifidobakterija te rodova *Agitococcus* i *Serratia*, a negativno s rodom *Ochrobactrum*. Darivateljice koje su rodile u kasnijim tjednima gestacije imale su u mlijeku više bakterija iz rodova *Streptococcus*, *Rothia*, *Sphingomonas* i *Gemella*, a manje rodova *Stapylococcus* i *Propionibacterium*.

## 5.5. Povezanost sastava bakterijske mikrobiote darovanog humanog mlijeka s obilježjima djece darivateljica

Uzorci darovanog mlijeka razvrstani su u skupine prema spolu djece darivateljica. U Tablici 16. prikazani su medijani i interkvartilni rasponi pojedinih obilježja te usporedba skupina Mann Whitney U testom. U drugom dijelu tablice uspoređene su vrijednosti medijana relativne zastupljenosti najčešće izoliranih rodova bakterija, uz dodatak rodova za koje je dokazana statistička značajnost usporedbom skupina.

Tablica 16. Usporedba skupina darivateljica i uzoraka mlijeka podijeljenih prema spolu djece

Obilježje	MUŠKI (N=42) Medijan (25.-75. centila)	ŽENSKI (N=46) Medijan (25.-75. centila)	Mann Whitney U	Z	P
Dob darivateljice (godine)	32 (30-35)	31 (29-35)	852	-0,955	0,339
ITM darivateljice (kg/m <sup>2</sup> )	22 (21-27)	23,5 (22-27)	815,5	-1,263	0,207
Termin poroda (GD)	39 (38-40)	39 (38-40)	901	-0,557	0,577
Tjedni laktacije	9,5 (4-17)	7,5 (4-15)	903	-0,528	0,598
Pohrana kod kuće (dani)	26,5 (15-32)	21,5 (13-30)	863,5	-0,857	0,391
Prosjek temperature u kućnom zamrzivaču (-°C)	19,5 (17-22)	18,5 (17-22)	509	-0,451	0,652
Pohrana u Banci, dani prije stvaranja mješavine	8,5 (6-22)	10,5 (6-30)	868	-0,822	0,411
Pohrana u Banci, dani od stvaranja mješavine do izolacije DNA	372,5 (157-504)	328,5 (190-526)	940,5	-0,213	0,831



<b>Obilježje</b>	<b>MUŠKI (N=42)</b> Medijan (25.-75. centila)	<b>ŽENSKI (N=46)</b> Medijan (25.-75. centila)	<b>Mann Whitney U</b>	<b>Z</b>	<b>P</b>
Masti (g/100mL)	3,7 (2,9-4,2)	3,6 (3,3-4,5)	942	-0,201	0,841
Ugljikohidrati (g/100mL)	8,45 (8,3-8,5)	8,4 (8,2-8,5)	742,5	-1,896	0,058
Proteini (g/100mL)	1,1 (0,9-1,2)	1,05 (0,9-1,2)	952	-0,119	0,905
Energetska vrijednost (kcal/100mL)	73,5 (67-80)	73,5 (68-80)	960	-0,050	0,960
Koncentracija DNA ng/μL	10,01 (5,34-15,42)	12,73 (8,21-24,19)	713	-2,114	<b>0,035</b>
<b>Rod bakterija</b>	<b>Medijan relativne zastupljenosti u % (25.-75. centila)</b>				
<i>Bifidobacterium</i>	0,00 (0,00-0,01)	0,00 (0,00-0,01)	963,5	-0,021	0,983
<i>Lactobacillus</i>	0,52 (0,2-1,31)	0,74 (0,28-2,48)	807	-1,328	0,184
<i>Staphylococcus</i>	19,3 (4,52-48,18)	14,86 (2,9-39,9)	911	-0,459	0,646
<i>Streptococcus</i>	12,1 (2,21-40,09)	12,3 (4,77-33,59)	962	-0,033	0,973
<i>Burkholderia</i>	10,78 (3,61-18,75)	9,97(3,41-22,15)	923	-0,359	0,719
<i>Ralstonia</i>	5,07 (2,22-9,79)	5,15 (1,63-19,22)	904	-0,518	0,604
<i>Acidovorax</i>	0,67 (0,25-11,93)	1,39 (0,29-8,42)	939	-0,226	0,822
<i>Enterobacter</i>	0,12 (0,1-0,34)	0,14 (0,11-0,24)	873	-0,777	0,437
<i>Acidithiobacillus</i>	0,3 (0,11-0,88)	0,21 (0,11-0,76)	916	-0,418	0,676
<i>Enterococcus</i>	0,07 (0,01-0,22)	0,11 (0,02-0,19)	959	-0,058	0,953
<i>Klebsiella</i>	0,06 (0,01-0,09)	0,06 (0,02-0,2)	873	-0,777	0,437
<i>Propionibacterium</i>	0,12 (0,05-0,34)	0,06 (0,03-0,19)	720	-2,055	<b>0,040</b>

ITM – indeks tjelesne mase; GD – gestacijska dob djeteta u tjednima; DNA – deoksiribonukleinska kiselina

Uzorci mlijeka darivateljica koje su rodile djevojčice razlikovali su se po većoj koncentraciji izolirane bakterijske DNA i manjoj zastupljenosti roda *Propionibacterium* (Tablica 16.).

Darivateljice svoju djecu hrane dojenjem, isključivo izdojenim mlijekom ili kombiniraju dojenje i izdavanje za vlastito dijete. Skupine uzoraka podijeljene su ovisno o načinu hranjenja, uspoređene Kruskal-Wallisovim testom te im je uspoređena zastupljenost najčešćih rodova bakterija.

Tablica 17. Usporedba skupina darivateljica i uzoraka mlijeka podijeljenih prema načinu hranjenja majčinim mlijekom

Obilježje	DOJENJE (N=53) Medijan (25.-75. centila)	ISKLUČIVO IZDAJANJE (N=22) Medijan (25.-75. centila)	KOMBINACIJA (N=13) Medijan (25.-75. centila)	Kruskal- Wallis H	P
Dob darivateljice (godine)	31 (29-34,5)	32,5 (29-36,25)	32 (30-38)	0,897	0,638
ITM darivateljice (kg/m <sup>2</sup> )	23 (21-26,5)	23,5 (22-27,25)	25 (21-27,5)	0,478	0,787
Termin poroda (GD)	40 (39-40)	35,5 (30,75-39)	39 (38-40)	21,406	<b>0,000</b>
Tjedni laktacije	11 (4,5-17)	7 (3-10,5)	5 (4-19)	5,545	0,063
Pohrana kod kuće (dani)	25 (18,5-32)	17,5 (8,5-32,25)	19 (6,5-33)	3,669	0,160
Prosjek temperature u kućnom zamrzivaču (-°C)	20 (18-22)	20,5 (16,5-23,25)	17,5 (13,5-18,5)	5,987	<b>0,050</b>
Pohrana u Banci, dani prije stvaranja mješavine	9 (6-29,5)	11,5 (6-22,75)	9 (6-29)	0,256	0,880
Pohrana u Banci, dani od stvaranja mješavine do izolacije DNA	435 (243-526)	215,5 (60,75-424,5)	258 (118,5-419,5)	8,999	<b>0,011</b>
Masti (g/100mL)	3,6 (2,85-4,2)	4 (3,5-4,98)	3,8 (2,7-4,35)	4,230	0,121
Ugljikohidrati (g/100mL)	8,4 (8,2-8,5)	8,4 (8,2-8,5)	8,5 (8,3-8,65)	1,827	0,401
Proteini (g/100mL)	1 (0,9-1,2)	1,2 (0,9-1,43)	1,1 (0,9-1,2)	3,591	0,166
Energetska vrijednost (kcal/100mL)	72 (66-78,5)	78 (70,75-87,75)	74 (65-80)	5,203	0,074
Koncentracija DNA ng/μL	11,99 (6,06-20,41)	10,38 (6,54-17,89)	8,93 (6,19-17,92)	1,034	0,596

Rod bakterija	Medijan relativne zastupljenosti u %			KW	P
	(25.-75. centila)				
<i>Bifidobacterium</i>	0,002 (0,00-0,01)	0,007 (0,001-0,014)	0,006 (0,00-0,04)	2,717	0,257
<i>Lactobacillus</i>	0,84 (0,25-1,53)	0,37 (0,22-1,61)	0,37 (0,2-2,44)	1,328	0,515
<i>Staphylococcus</i>	8,34 (1,71-21,35)	54,19 (34,96-70,72)	19,45(6,56-45,69)	31,561	<b>0,000</b>
<i>Streptococcus</i>	18,96 (6,82-46,87)	1,77 (0,43-9,66)	15,77 (2,39-38,77)	20,190	<b>0,000</b>
<i>Burkholderia</i>	3,6 (2,85-4,2)	7,42 (3,39-15,2)	9,62 (1,21-18,12)	3,774	0,152
<i>Ralstonia</i>	7,24 (2,53-18,9)	3,11 (1,13-5,77)	3,81 (0,84-10,44)	6,793	<b>0,033</b>
<i>Acidovorax</i>	1,97 (0,28-11,15)	0,39 (0,25-9,49)	0,72 (0,2-8,84)	0,977	0,613
<i>Enterobacter</i>	0,14 (0,11-0,34)	0,11 (0,09-0,28)	0,12 (0,09-8,43)	2,306	0,316
<i>Acidithiobacillus</i>	0,22 (0,09-0,81)	0,16 (0,11-0,66)	0,34 (0,19-1,17)	1,695	0,429
<i>Enterococcus</i>	0,03 (0,01-0,13)	0,2 (0,1-3,89)	0,1 (0,03-0,18)	15,245	<b>0,000</b>
<i>Klebsiella</i>	0,06 (0,04-0,16)	0,02 (0,01-0,8)	0,05 (0,01-0,72)	3,724	0,155
<i>Pseudomonas</i>	0,06 (0,03-0,33)	0,03 (0,01-0,05)	0,03 (0,02-0,39)	10,405	<b>0,006</b>
<i>Corynebacterium</i>	0,11 (0,05-0,24)	1,35 (0,23-3,41)	0,13 (0,04-0,66)	17,662	<b>0,000</b>
<i>Rothia</i>	0,19 (0,08-0,62)	0,027 (0,01-0,05)	0,01 (0,03-0,09)	42,264	<b>0,000</b>
<i>Escherichia</i>	0,03 (0,007-0,05)	0,003 (0,00-0,03)	0,01 (0,00-0,18)	7,479	<b>0,024</b>
<i>Methylobacterium</i>	0,021 (0,008-0,083)	0,007 (0,005-0,017)	0,008 (0,004-0,049)	9,896	<b>0,007</b>
<i>Bacillus</i>	0,017 (0,007-0,074)	0,011 (0,003-0,058)	0,007 (0,003-0,013)	8,932	<b>0,011</b>
<i>Ochrobactrum</i>	0,011 (0,00-0,015)	0,00 (0,00-0,009)	0,006 (0,00-0,012)	6,960	<b>0,031</b>
<i>Sphingomonas</i>	0,033 (0,011-0,093)	0,011 (0,006-0,031)	0,034 (0,012-0,134)	8,029	<b>0,018</b>
<i>Leclercia</i>	0,004 (0,00-0,011)	0,00 (0,00-0,005)	0,002 (0,00-0,004)	9,154	<b>0,010</b>
<i>Gemella</i>	0,019 (0,005-0,136)	0,005 (0,002-0,008)	0,004 (0,002-0,022)	12,834	<b>0,002</b>
<i>Pantoea</i>	0,005 (0,00-0,011)	0,00 (0,00-0,003)	0,001 (0,00-0,009)	10,467	<b>0,005</b>

ITM – indeks tjelesne mase; GD – gestacijska dob djeteta u tjednima; DNA – deoksiribonukleinska kiselina; KW – Kruskal Wallis H

Skupina djece koja su hranjena isključivo izdojenim mlijekom rođena je u ranijim tjednima gestacije te su uzorci mlijeka iz te skupine bili duže pohranjeni u BHM-u prije izolacije DNA. Prosjek temperature kućnog zamrzivača bio je niži kod darivateljica koje su isključivo izdojenim mlijekom hranile svoju djecu, vjerojatno i zbog pohrane veće količine vlastitog mlijeka. Mlijeko djece koja su hranjenja isključivo izdojenim mlijekom imalo je statistički značajno više rodova *Staphylococcus*, *Enterococcus* i *Corynebacterium* u odnosu na druge dvije skupine. Uzorci mlijeka dojene djece imali su više bakterija iz rodova *Streptococcus*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Leifsonia*, *Rothia* i *Escherichia* te još nekolicinu manje zastupljenih rodova navedenih u Tablici 17.

Uspoređena je i povezanost redoslijeda rođenja djeteta sa zastupljenošću rodova bakterija te tjedni laktacije, odnosno dob djeteta u vrijeme majčinog darivanja mlijeka, prikazano u Tablici 18.

Kod prvorođenih, odnosno ranije rođenih, bilo je više roda *Rhizobium* (Tablica 18.). Što je dijete bilo mlađe u vrijeme izdavanja mlijeka, odnosno što je ranije tijekom laktacije majka darivala, to je veća zastupljenost roda *Staphylococcus*, a kod DHM-a izdajanom u kasnijim tjednima laktacije je veća zastupljenost rodova *Lactobacillus*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Acidithiobacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* i *Leifsonia*.

Tablica 18. Korelacije obilježja djece i zastupljenosti rodova bakterija

Rod bakterija	Redoslijed rođenja		Tjedni laktacije	
	Korelacijski koeficijent	P	Korelacijski koeficijent	P
<i>Bifidobacterium</i>	-0,143	0,183	-0,065	0,545
<i>Lactobacillus</i>	-0,090	0,407	0,284	<b>0,007</b>
<i>Staphylococcus</i>	0,081	0,455	-0,324	<b>0,002</b>
<i>Streptococcus</i>	0,050	0,647	-0,002	0,984
<i>Burkholderia</i>	-0,152	0,159	0,334	<b>0,001</b>
<i>Ralstonia</i>	-0,033	0,761	0,317	<b>0,003</b>
<i>Acidovorax</i>	-0,140	0,194	-0,031	0,776
<i>Enterobacter</i>	-0,124	0,252	0,108	0,315
<i>Acidithiobacillus</i>	-0,106	0,325	0,223	<b>0,037</b>
<i>Enterococcus</i>	-0,009	0,931	-0,186	0,082
<i>Klebsiella</i>	0,023	0,832	0,076	0,483
<i>Pseudomonas</i>	-0,009	0,937	0,261	<b>0,014</b>
<i>Stenotrophomonas</i>	-0,198	0,064	0,351	<b>0,001</b>
<i>Leifsonia</i>	-0,159	0,139	0,387	<b>0,000</b>
<i>Rhizobium</i>	-0,215	<b>0,044</b>	0,150	0,162
<i>Methylobacterium</i>	-0,004	0,974	0,296	<b>0,005</b>
<i>Propionibacterium</i>	-0,080	0,457	0,222	<b>0,037</b>
<i>Ochrobactrum</i>	-0,031	0,775	0,217	<b>0,042</b>
<i>Sphingomonas</i>	-0,115	0,287	0,310	<b>0,003</b>
<i>Veillonella</i>	-0,048	0,654	0,323	<b>0,002</b>
<i>Gemella</i>	0,001	0,990	0,254	<b>0,017</b>

## 5.6. Povezanost sastava bakterijske mikrobiote s obilježjima mlijeka

Darovano humano mlijeko može biti izdajano na način koji najviše odgovara darivateljici, s opremom koju već koristi. Najčešće su darivateljice izdajale posredstvom izdajalice, električne ili mehaničke (Tablice 5. i 19.). Uspoređene su skupine uzoraka mlijeka s obzirom na način izdavanja Kruskal Wallisovim testom te prema zastupljenosti najčešće detektiranih rodova bakterija. U Tablici 19. prikazani su i rezultati za rodove koji su bili manje zastupljeni u uzorcima DHM-a, ali za koje se pokazalo da postoji statistički značajna razlika između skupina.

Tablica 19. Usporedba skupina darivateljica i uzoraka mlijeka podijeljenih prema načinu izdavanja mlijeka

Obilježje	MEHANIČKA IZDAJALICA (N=30) Medijan (25.-75. centila)	ELEKTRIČNA IZDAJALICA (N=47) Medijan (25.-75. centila)	RUČNA TEHNIKA (N=11) Medijan (25.-75. centila)	Kruskal- Wallis H	P
Dob darivateljice (godine)	33 (29-36)	31 (29-34)	33 (31-36)	2,319	0,314
ITM darivateljice (kg/m <sup>2</sup> )	23 (21-26,25)	23 (22-27)	24 (20-28)	0,107	0,948
Termin poroda (GD)	39,5 (38-40)	39 (36-40)	40 (39-40)	6,900	<b>0,032</b>
Tjedni laktacije	7 (3-15,25)	8(4-16)	15 (7-23)	4,141	0,126
Pohrana kod kuće (dani)	20,5 (12,5-32,25)	24 (14-32)	30 (18-46)	3,502	0,174
Prosjek temperature u kućnom zamrzivaču (-°C)	19 (16,5-21,5)	19 (17,25-22)	22(17,5-25,5)	1,861	0,394
Pohrana u Banci, dani prije stvaranja mješavine	8 (6-21,5)	9 (6-27)	14 (6-36)	0,488	0,783
Pohrana u Banci, dani od stvaranja mješavine do izolacije DNA	468 (186,75-689,5)	258 (143-434)	491 (365-526)	9,520	<b>0,009</b>
Masti (g/100mL)	3,65 (3,38-4,2)	3,7 (3-4,5)	3,9 (2,6-5,1)	0,025	0,988
Ugljikohidrati (g/100mL)	8,4 (8,2-8,53)	8,4 (8,3-8,5)	8,4 (8,3-8,5)	0,291	0,865
Proteini (g/100mL)	1,1 (0,9-1,23)	1 (0,9-1,2)	1,1 (0,9-1,1)	0,414	0,813

Obilježje	MEHANIČKA IZDAJALICA (N=30) Medijan (25.-75. centila)	ELEKTRIČNA IZDAJALICA (N=47) Medijan (25.-75. centila)	RUČNA TEHNIKA (N=11) Medijan (25.-75. centila)	Kruskal- Wallis H	P
Energetska vrijednost (kcal/100mL)	73,5 (69,75-79,25)	73 (67-81)	75 (63-86)	0,017	0,992
Koncentracija DNA ng/μL	11,36 86,58-21,62)	10,73 (5,79-17,2)	11,58 (10,01-19,45)	0,994	0,608
Rod bakterija	Medijan relativne zastupljenosti u % (25.-75. centila)				
<i>Bifidobacterium</i>	0,002 (0,00-0,006)	0,007 (0,00-0,019)	0,002 (0,00-0,013)	4,608	0,100
<i>Lactobacillus</i>	0,61 (0,24-1,37)	0,61 (0,24-2,25)	0,55 (0,13-1,17)	1,127	0,569
<i>Staphylococcus</i>	12,1 (3,19-30,47)	23,55 (5,95-50,01)	5,84 (1,16-22,72)	4,382	0,112
<i>Streptococcus</i>	13,92 (4,37-34,5)	7,15 (1,81-33,58)	12,94 (10,12-51,98)	3,877	0,144
<i>Burkholderia</i>	8,67 (1,92-17,83)	8,84 (3,6-20,05)	18,13 (13,83-24,14)	5,056	0,080
<i>Ralstonia</i>	4,8 (1,39-9,5)	5,07 (1,63-10,13)	17,31 (5,41-23,13)	6,346	<b>0,042</b>
<i>Acidovorax</i>	2,24 (0,32-10,64)	1,24 (0,28-13,37)	0,29 (0,18-3,54)	4,970	0,083
<i>Enterobacter</i>	0,12 (0,09-0,36)	0,13 (0,11-0,34)	0,13 (0,1-0,24)	0,590	0,744
<i>Acidithiobacillus</i>	0,21 (0,1-0,75)	0,25 (0,12-0,84)	0,09 (0,07-1,9)	1,447	0,485
<i>Enterococcus</i>	0,03 (0,01-0,25)	0,12 (0,02-0,22)	0,03 (0,01-0,11)	4,882	0,087
<i>Klebsiella</i>	0,06 (0,03-0,11)	0,06 (0,01-0,08)	0,06 (0,05-0,24)	2,505	0,286
<i>Rothia</i>	0,08 (0,03-0,24)	0,08 (0,02-0,2)	0,23 (0,11-1,5)	6,738	<b>0,034</b>
<i>Ochrobactrum</i>	0,01 (0,00-0,014)	0,02 (0,00-0,012)	0,013 (0,04-0,015)	6,252	<b>0,044</b>
<i>Gemella</i>	0,01 (0,005-0,041)	0,005 (0,002-0,022)	0,038 (0,06-0,14)	7,962	<b>0,019</b>
<i>Pantoea</i>	0,005 (0,00-0,011)	0,001 (0,00-0,06)	0,008 (0,00-0,014)	7,133	<b>0,028</b>

ITM – indeks tjelesne mase; GD – gestacijska dob djeteta u tjednima; DNA – deoksiribonukleinska kiselina

Skupine uzoraka mlijeka podijeljene prema načinu izdavanja razlikovale su se u kraćem trajanju trudnoće i kraćem razdoblju proteklom od stvaranja mješavine do izolacije DNA darivateljica koje su izdajale električnom izdajalicom. Uzorci izdajani ručno imali

su veću relativnu zastupljenost bakterija iz rodova *Ralstonia*, *Rothia*, *Ochrobactrum*, *Gemella* i *Pantoea* (Tablica 19.).

S obzirom na to da je među ispitivanim uzorcima bilo i preterminskog i terminskog mlijeka, uspoređene su skupine uzoraka po obilježjima darivateljica, djece i mlijeka te zastupljenosti rodova bakterija.

Tablica 20. Usporedba skupina darivateljica i uzoraka mlijeka podijeljenih prema vrsti mlijeka

Obilježje	TERMINSKO MLIJEKO (N=81) Medijan (25.-75. centila)	PRETERMINSKO MLIJEKO (N=7) Medijan (25.-75. centila)	Mann Whitney U	Z	P
Dob darivateljice (godine)	31 (29-35)	33 (32-38)	177	-1,648	0,099
ITM darivateljice (kg/m <sup>2</sup> )	23 (21-27)	24 (19-27)	272,5	-0,170	0,865
Termin poroda (GD)	39 (38-40)	34 (26-35)	35	-3,931	<b>0,000</b>
Tjedni laktacije	9 (4-16)	3 (2-3)	56,5	-3,510	<b>0,000</b>
Pohrana kod kuće (dani)	23 (15-32)	27 (7-37)	277,5	-0,093	0,926
Prosjek temperature u kućnom zamrzivaču (-°C)	19 (17-22)	NP	NP	NP	NP
Pohrana u Banci, dani prije stvaranja mješavine	9 (6-22)	9 (6-44)	268,5	-0,232	0,816
Pohrana u Banci, dani od stvaranja mješavine do izolacije DNA	365 (190-510)	62 (28-573)	156,5	-1,959	0,050
Masti (g/100mL)	3,6 (3-4,2)	4,2 (3,9-4,9)	174,5	-1,682	0,093
Ugljikohidrati (g/100mL)	8,4 (8,3-8,5)	8,5 (8,2-8,6)	247	-0,572	0,568
Proteini (g/100mL)	1 (0,9-1,2)	1,5 (1,3-1,8)	26	-4,050	<b>0,000</b>
Energetska vrijednost (kcal/100mL)	73 (67-79)	81 (79-87)	142	-2,184	<b>0,029</b>
Koncentracija DNA ng/μL	10,84 (6,6-19,36)	9,44 (5,79-17,33)	261	-0,347	0,729



Rod bakterija	Medijan relativne zastupljenosti u % (25.-75. centila)		Mann Whitney U	Z	P
<i>Bifidobacterium</i>	0,00 (0,00-0,01)	0,00 (0,00-0,01)	258	-0,398	0,690
<i>Lactobacillus</i>	0,69 (0,25-1,89)	0,28 (0,11-0,51)	169	-1,766	0,077
<i>Staphylococcus</i>	14,7 (3,29-38,41)	63,8 (46,16-82,1)	70	-3,292	<b>0,001</b>
<i>Streptococcus</i>	12,87 (4,77-36,2)	0,47 (0,35-13,52)	115	-2,598	<b>0,009</b>
<i>Burkholderia</i>	10,51 (3,57-20,06)	7,15 (3,41-22,79)	243	-0,625	0,532
<i>Ralstonia</i>	5,41 (2,22-13,71)	2,02 (0,31-4,83)	172	-1,719	0,086
<i>Acidovorax</i>	1,49 (0,29-9,88)	0,3 (0,23-9,36)	202	-1,257	0,209
<i>Enterobacter</i>	0,13 (0,1-0,27)	0,12 (0,11-0,66)	275	-0,131	0,896
<i>Acidithiobacillus</i>	0,25 (0,11-0,84)	0,11 (0,1-0,21)	168	-1,781	0,075
<i>Enterococcus</i>	0,06 (0,01-0,18)	0,95 (0,12-8,68)	111	-2,660	<b>0,008</b>
<i>Klebsiella</i>	0,07 (0,02-0,11)	0,04 (0,01-0,05)	225	-0,902	0,367
<i>Pseudomonas</i>	0,06 (0,03-0,22)	0,04 (0,01-0,05)	151	-2,043	<b>0,041</b>
<i>Rothia</i>	0,12 (0,04-0,32)	0,01 (0,01-0,03)	45	-3,678	<b>0,000</b>
<i>Elizabethkingia</i>	0,02 (0,01-0,12)	0,01 (0,01-0,01)	142	-2,182	<b>0,029</b>
<i>Pantoea</i>	0,00 (0,00-0,01)	0,00 (0,00-0,00)	137	-2,334	<b>0,020</b>
<i>Citrobacter</i>	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	161	-2,137	<b>0,033</b>

ITM - indeks tjelesne mase; GD - gestacijska dob djeteta u tjednima; NP - nema osjetnika; DNA- deoksiribonukleinska kiselina

Uzorci preterminskog mlijeka su se, očekivano, razlikovali po kraćem trajanju trudnoće darivateljica, ranijim tjednima laktacije u vrijeme izdavanja, većom koncentracijom proteina i većoj energetske vrijednosti darovanog mlijeka. Većina mješavina preterminskog mlijeka (6/7, odnosno 86 %) bila je prikupljena u vrećice uz koje darivateljice nemaju osjetnik za praćenje temperature u kućnim uvjetima, zbog čega se temperatura za vrijeme pohrane u domu darivateljica nije mogla usporediti. Preterminsko mlijeko imalo je veću zastupljenost bakterija iz rodova *Staphylococcus* i

*Enterococcus*, a manju zastupljenost rodova *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Rothia*, *Elizabethkingia*, *Pantoea* i *Citrobacter* (Tablica 20.).

Uspoređene su skupine uzoraka DHM-a prema spremnicima za mlijeko prije pasterizacije (Tablica 21.). Spremnici za mlijeko prije pasterizacije su bočice i vrećice, od čega je preterminsko mlijeko dominantno darivano u vrećicama, kao i brojne prve donacije terminskog mlijeka.

Tablica 21. Usporedba skupina uzoraka podijeljenih prema vrsti spremnika s mlijekom prije pasterizacije

Obilježje	VREĆICA (N=23) Medijan (25.-75. centila)	BOČICA (N=65) Medijan (25.-75. centila)	Mann Whitney U	Z	P
Dob darivateljice (godine)	32 (29-34)	32 (29-35,5)	741	-0,062	0,951
ITM darivateljice (kg/m <sup>2</sup> )	23 (21-26)	23 (21,5-27)	653	-0,902	0,367
Termin poroda (GD)	37 (30-40)	39 (38-40)	415	-3,239	<b>0,001</b>
Dob djeteta (tjedni)	3 (2-8)	11 (5-18,5)	314,5	-4,123	<b>0,000</b>
Pohrana kod kuće (dani)	27 (17-40)	22 (14-30,5)	596	-1,440	0,150
Prosjek temperature u kućnom zamrzivaču (-°C)	NP	19 (17-22)	NP	NP	NP
Pohrana u Banci, dani prije stvaranja mješavine	13 (6-22)	9 (6-28)	678,5	-0,658	0,510
Pohrana u Banci, dani od stvaranja mješavine do izolacije DNA	365 (108-650)	330 (183,5-503,5)	717	-0,290	0,772
Masti (g/100mL)	3,8 (3,5-4,2)	3,6 (2,85-4,5)	666	-0,775	0,439
Ugljikohidrati (g/100mL)	8,4 (8,2-8,5)	8,4 (8,3-8,5)	699	-0,468	0,640
Proteini (g/100mL)	1,3 (0,9-1,5)	1 (0,9-1,1)	366	-3,695	<b>0,000</b>
Energetska vrijednost (kcal/100mL)	75 (71-81)	73 (66-80)	624,5	-1,169	0,242
Koncentracija DNA ng/μL	12,38 (6,81-24,19)	10,72 (5,45-18,54)	624	-1,173	0,241

Rod bakterija	Medijan relativne zastupljenosti u % (25.-75. centila)		Mann Whitney U	Z	P
<i>Bifidobacterium</i>	0,004 (0,001-0,011)	0,003 (0,00-0,012)	744,5	-0,029	0,977
<i>Lactobacillus</i>	0,28 (0,12-1,37)	0,8 (0,28-2,12)	491	-2,436	<b>0,015</b>
<i>Staphylococcus</i>	19,3 (4,52-48,18)	14,26 (3,42-36,52)	487	-2,474	<b>0,013</b>
<i>Streptococcus</i>	6,98 (0,44-24,82)	12,87 (5,36-38,77)	525	-2,113	<b>0,035</b>
<i>Burkholderia</i>	7,13 (1,68-14,02)	11,36 (4-22,33)	558	-1,800	0,072
<i>Ralstonia</i>	3,15 (0,55-6,46)	5,79 (2,36-16,58)	510	-2,255	<b>0,024</b>
<i>Acidovorax</i>	1,24 (0,25-9,36)	1,18 (0,28-10,05)	718	-0,280	0,779
<i>Enterobacter</i>	0,12 (0,1-0,49)	0,13 (0,1-0,3)	711	-0,347	0,729
<i>Acidithiobacillus</i>	0,17 (0,1-0,34)	0,26 (0,11-0,81)	625	-1,163	0,245
<i>Enterococcus</i>	0,06 (0,01-0,25)	0,1 (0,01-0,2)	740	-0,071	0,943
<i>Klebsiella</i>	0,06 (0,01-0,09)	0,06 (0,01-0,2)	721	-0,252	0,801
<i>Leifsonia</i>	0,18 (0,08-0,96)	0,45 (0,18-1,15)	521	-2,151	<b>0,031</b>
<i>Rothia</i>	0,03 (0,01-0,18)	0,12 (0,04-0,33)	486	-2,483	<b>0,013</b>

ITM – indeks tjelesne mase; GD – gestacijska dob djeteta u tjednima; DNA – deoksiribonukleinska kiselina

Uzorci mlijeka koje je prije pasterizacije bilo pohranjeno u vrećice razlikovali su se po kraćem trajanju trudnoće darivateljica, kao i mlađoj dobi djece u vrijeme izdavanja i većoj vrijednosti proteina. Mlijeko koje je bilo u bočicama imalo je veću zastupljenost bakterija iz rodova *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Ralstonia*, *Leifsonia* i *Rothia*, dok je mlijeko u vrećicama imalo više bakterija iz roda *Staphylococcus* (Tablica 21.).

U domu darivateljice mlijeko je pohranjeno do najviše 2 mjeseca, najčešće na temperaturi od -18 do -20 °C koja je optimalna i preporučena u uputama koje dobivaju darivateljice. Uspoređeni su dani pohrane u kućnim uvjetima te prosječne temperature kućnih zamrzivača sa zastupljenošću rodova bakterija izoliranim u uzorcima DHM-a (Tablica 22.).

Tablica 22. Korelacije obilježja pohrane mlijeka u domu darivateljice i zastupljenosti rodova bakterija

Rod bakterija	Dani pohrane u kućnim uvjetima		Prosjek temperature kućnog zamrzivača	
	Korelacijski koeficijent	P	Korelacijski koeficijent	P
<i>Bifidobacterium</i>	-0,059	0,586	-0,056	0,653
<i>Lactobacillus</i>	0,138	0,201	0,139	0,266
<i>Staphylococcus</i>	-0,176	0,101	-0,055	0,661
<i>Streptococcus</i>	0,076	0,480	-0,026	0,837
<i>Burkholderia</i>	0,279	<b>0,008</b>	0,053	0,670
<i>Ralstonia</i>	0,288	<b>0,006</b>	0,116	0,352
<i>Acidovorax</i>	-0,050	0,646	0,100	0,423
<i>Enterobacter</i>	0,108	0,317	0,199	0,110
<i>Acidithiobacillus</i>	-0,013	0,905	-0,101	0,418
<i>Enterococcus</i>	-0,248	<b>0,020</b>	-0,150	0,229
<i>Klebsiella</i>	0,053	0,626	0,170	0,171
<i>Pseudomonas</i>	0,259	<b>0,015</b>	0,215	0,083
<i>Leifsonia</i>	0,340	<b>0,001</b>	0,080	0,524
<i>Methylobacterium</i>	0,272	<b>0,010</b>	0,013	0,919
<i>Ochrobactrum</i>	0,153	0,219	0,226	<b>0,034</b>
<i>Gemella</i>	0,233	<b>0,029</b>	-0,089	0,477
<i>Elizabethkingia</i>	0,014	0,901	0,337	<b>0,006</b>
<i>Leclercia</i>	0,141	0,190	0,259	<b>0,036</b>
<i>Comamonas</i>	-0,142	0,188	0,329	<b>0,007</b>
<b>KONCENTRACIJA DNA (ng/μL)</b>	0,168	0,117	-0,018	0,887

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

U darovanom mlijeku koje je dulje bilo pohranjeno u kućnim uvjetima bile su zastupljenije bakterije iz roda *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Leifsonia*, *Methylobacterium* i *Gemella*, a manje iz roda *Enterococcus* (Tablica 22.). Uzorci mlijeka iz zamrzivača koji su imali nižu prosječnu temperaturu pohrane imali su i veću zastupljenost rodova *Ochrobactrum*, *Elizabethkingia*, *Leclercia* i *Comammonas*. Nije bilo razlike u koncentraciji izolirane bakterijske DNA u odnosu na dane pohrane i temperature kućnih zamrzivača.

Mlijeko nakon zaprimanja u Banku, ulazne kontrole i dospjelih nalaza darivateljice na krvlju prenosive bolesti različito dugo stoji pohranjeno do pripreme za pasterizaciju kada se radi mješavina i 'poolira' mlijeko jedne darivateljice u volumenu do najviše 2,2 L. Bolnički zamrzivači koji su redovito kontrolirani i umjeravani rade na temperaturi pohrane od -30 °C. Tablica 23. prikazuje korelaciju dana pohrane do izrade mješavine i od izrade mješavine do izolacije DNA sa zastupljenošću rodova bakterija u uzorcima DHM-a.

Tablica 23. Korelacije trajanja pohrane mlijeka u Banci i zastupljenosti rodova bakterija

Rod bakterija	Pohrana na -30 °C u BHM prije stvaranja mješavine		Pohrana na -30 C u BHM od stvaranja mješavine do izolacije DNA	
	Korelacijski koeficijent	P	Korelacijski koeficijent	P
<i>Bifidobacterium</i>	0,079	0,465	-0,512	<b>0,000</b>
<i>Lactobacillus</i>	0,207	0,054	-0,165	0,124
<i>Staphylococcus</i>	-0,090	0,405	-0,284	<b>0,007</b>
<i>Streptococcus</i>	0,025	0,815	0,307	<b>0,004</b>
<i>Burkholderia</i>	0,282	<b>0,008</b>	-0,037	0,734
<i>Ralstonia</i>	0,240	<b>0,024</b>	0,176	0,101
<i>Acidovorax</i>	0,053	0,622	-0,130	0,228
<i>Enterobacter</i>	-0,010	0,924	0,343	<b>0,001</b>
<i>Acidithiobacillus</i>	0,066	0,543	-0,081	0,452
<i>Enterococcus</i>	0,104	0,335	-0,677	<b>0,000</b>

Rod bakterija	Pohrana na -30 °C u BHM prije stvaranja mješavine		Pohrana na -30 C u BHM od stvaranja mješavine do izolacije DNA	
	Korelacijski koeficijent	P	Korelacijski koeficijent	P
<i>Klebsiella</i>	-0,011	0,919	0,371	<b>0,000</b>
<i>Micromonospora</i>	-0,043	0,692	0,322	<b>0,002</b>
<i>Pseudomonas</i>	0,038	0,726	0,295	<b>0,005</b>
<i>Corynebacterium</i>	0,041	0,701	-0,387	<b>0,000</b>
<i>Leifsonia</i>	0,332	<b>0,002</b>	0,038	0,727
<i>Rothia</i>	0,036	0,736	0,342	<b>0,001</b>
<i>Escherichia</i>	0,030	0,781	0,652	<b>0,000</b>
<i>Methylobacterium</i>	0,241	<b>0,024</b>	0,310	<b>0,003</b>
<i>Propionibacterium</i>	0,151	0,159	-0,232	<b>0,030</b>
<i>Bacillus</i>	-0,125	0,245	0,266	<b>0,012</b>
<i>Ochrobactrum</i>	-0,029	0,790	0,761	<b>0,000</b>
<i>Sphingomonas</i>	0,279	<b>0,009</b>	0,222	<b>0,037</b>
<i>Brevundimonas</i>	0,212	<b>0,047</b>	-0,091	0,400
<i>Agrobacterium</i>	0,011	0,918	-0,286	<b>0,007</b>
<i>Leclercia</i>	-0,117	0,279	0,579	<b>0,000</b>
<i>Pantoea</i>	-0,057	0,596	0,535	<b>0,000</b>
<i>Citrobacter</i>	-0,215	<b>0,044</b>	0,189	0,078
<b>KONCENTRACIJA DNA (ng/μL)</b>	0,137	0,202	0,424	<b>0,000</b>

BHM – banka humanog mlijeka; DNA – deoksiribonukleinska kiselina

Darovano mlijeko koje je duže bilo pohranjeno u BHM-u na -30 °C do datuma izrade mješavine i pasterizacije, imalo je veću zastupljenost bakterija iz roda *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Leifsonia*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas* i *Brevundimonas*, a manju zastupljenost roda *Citrobacter* (Tablica 23.). Mlijeko kojem je razdoblje pohrane između stvaranja mješavine do izolacije DNA bilo kraće, imalo je veću zastupljenost

rodova *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* i *Agrobacterium*, a dulja pohrana korelirala je pozitivno sa zastupljenošću rodova *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Rothia*, *Escherichia*, *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Ochrobactrum*, *Sphingomonas*, *Leclercia* i *Pantoea* (Tablica 23.). Što je mlijeko dulje bilo pohranjeno u BHM-u nakon izrade mješavine, to je detektirana veća koncentracija izolirane bakterijske DNA.

Za svaku mješavinu mlijeka poznate su prehrambene vrijednosti masti, UH i proteina. Ispitana je korelacija prehrambenih vrijednosti sa zastupljenošću najčešće detektiranih bakterijskih rodova, a u Tablici 24. su prikazani i rodovi koji su manje zastupljeni, ali za koje je dokazana statistički značajna povezanost.

Tablica 24. Korelacije prehrambenih vrijednosti mlijeka i zastupljenosti rodova bakterija

Rod bakterija	Masti		Ugljikohidrati		Proteini	
	Korelacijski koeficijent	P	Korelacijski koeficijent	P	Korelacijski koeficijent	P
<i>Bifidobacterium</i>	-0,173	0,107	0,204	0,056	-0,060	0,580
<i>Lactobacillus</i>	-0,183	0,087	0,013	0,901	-0,334	<b>0,001</b>
<i>Staphylococcus</i>	0,334	<b>0,001</b>	0,174	0,105	0,233	<b>0,029</b>
<i>Streptococcus</i>	-0,154	0,151	0,034	0,757	0,007	0,950
<i>Burkholderia</i>	-0,085	0,431	-0,074	0,493	-0,308	<b>0,004</b>
<i>Ralstonia</i>	-0,106	0,326	-0,056	0,606	-0,296	<b>0,005</b>
<i>Acidovorax</i>	0,083	0,442	0,072	0,505	-0,093	0,389
<i>Enterobacter</i>	0,042	0,699	-0,192	0,073	-0,077	0,478
<i>Acidithiobacillus</i>	-0,024	0,824	0,004	0,969	-0,308	<b>0,003</b>
<i>Enterococcus</i>	0,013	0,905	0,260	0,014	0,030	0,779
<i>Klebsiella</i>	-0,018	0,869	-0,056	0,602	-0,171	0,111
<i>Pseudomonas</i>	-0,048	0,659	-0,104	0,335	-0,265	<b>0,013</b>
<i>Stenotrophomonas</i>	0,013	0,907	0,007	0,950	-0,246	<b>0,021</b>
<i>Leifsonia</i>	-0,083	0,443	-0,093	0,387	-0,359	<b>0,001</b>
<i>Rhizobium</i>	-0,081	0,454	-0,106	0,325	-0,215	<b>0,044</b>
<i>Elizabethkingia</i>	-0,028	0,796	0,052	0,633	-0,241	<b>0,024</b>
<i>Ochrobactrum</i>	-0,004	0,968	-0,216	<b>0,043</b>	-0,021	0,844
<i>Sphingomonas</i>	-0,066	0,540	-0,121	0,260	-0,285	<b>0,007</b>
<i>Brevundimonas</i>	-0,236	0,027	-0,046	0,672	-0,242	<b>0,023</b>
<i>Veillonella</i>	-0,067	0,533	-0,134	0,213	-0,252	<b>0,018</b>
<i>Comamonas</i>	0,212	<b>0,047</b>	-0,116	0,280	0,182	0,090



Darovano mlijeko koje je imalo veću razinu masti i proteina imalo je i veću zastupljenost roda *Staphylococcus*. Veća količina masti korelirala je pozitivno sa zastupljenošću roda *Comamonas*. Količina ugljikohidrata negativno je korelirala sa zastupljenošću roda *Ochrobactrum*. Mlijeko s većom razinom proteina imalo je manju zastupljenost rodova *Lactobacillus*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Acidithiobacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Leifsonia*, *Rhizobium*, *Elizabethkingia*, *Sphingomonas*, *Brevundimonas* i *Veillonella*.

Uspoređene su i energetska vrijednost i koncentracija izolirane bakterijske DNA iz uzoraka mlijeka sa zastupljenošću najčešće detektiranih rodova bakterija.

Tablica 25. Korelacije obilježja mlijeka i zastupljenosti rodova bakterija

Rod bakterija	Energetska vrijednost		Koncentracija DNA ng/μL	
	Korelacijski koeficijent	P	Korelacijski koeficijent	P
<i>Bifidobacterium</i>	-0,154	0,153	-0,229	<b>0,032</b>
<i>Lactobacillus</i>	-0,200	0,061	-0,022	0,839
<i>Staphylococcus</i>	0,358	<b>0,001</b>	-0,046	0,669
<i>Streptococcus</i>	-0,138	0,198	0,172	0,109
<i>Burkholderia</i>	-0,127	0,239	-0,014	0,894
<i>Ralstonia</i>	-0,148	0,168	0,127	0,238
<i>Acidovorax</i>	0,080	0,461	-0,092	0,396
<i>Enterobacter</i>	0,025	0,815	0,148	0,169
<i>Acidithiobacillus</i>	-0,039	0,719	-0,011	0,918
<i>Enterococcus</i>	0,044	0,685	-0,198	0,065
<i>Klebsiella</i>	-0,028	0,799	0,232	<b>0,030</b>
<i>Micromonospora</i>	0,030	0,782	0,244	<b>0,022</b>
<i>Rothia</i>	-0,171	0,112	0,283	<b>0,008</b>
<i>Escherichia</i>	-0,017	0,873	0,348	<b>0,001</b>
<i>Agitococcus</i>	-0,059	0,583	-0,241	<b>0,024</b>
<i>Ochrobactrum</i>	-0,004	0,970	0,472	<b>0,000</b>
<i>Pantoea</i>	-0,046	0,667	0,322	<b>0,002</b>

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

Darovano mlijeko koje je imalo veću energetska vrijednost, imalo je i veću zastupljenost roda *Staphylococcus*. Mlijeko s više izolirane bakterijske DNA imalo je veću zastupljenost rodova *Klebsiella*, *Micromonospora*, *Rothia*, *Escherichia*, *Ochrobactrum* i *Pantoea*. Mlijeko s manjom koncentracijom izolirane DNA imalo je veću zastupljenost rodova *Bifidobacterium* i *Agitococcus*.

Rutinski nalazi mikrobioloških kultura mlijeka na komercijalnom KA uspoređeni su s izloženošću darivateljica antibioticima (Tablica 26.).

Tablica 26. Usporedba količine bakterija prije pasterizacije u uzorcima DHM-a s izloženošću darivateljica antibioticima

Ukupno CFU u uzorcima mlijeka prije pasterizacije	Izložene antibioticima		Nisu bile izložene antibioticima		P
	N (35)	%	N (53)	%	
Sterilno	1	2,9%	4	7,5%	0,180
$\leq 10^3$	8	22,9%	22	41,5%	
$>10^3 \leq 10^4$	13	37,1%	13	24,5%	
$>10^4 \leq 10^5$	13	37,1%	14	26,4%	

CFU – jedinice koje formiraju kolonije

Nije bilo značajnih razlika između nalaza broja bakterija prije pasterizacije i izloženosti antibioticima majki unutar posljednjih 6 mjeseci prije darivanja mlijeka,  $\chi^2$  test,  $P=0,180$ .

Nalazi rutinske kulture mlijeka razvrstani su u 4 skupine, ovisno o porastu bakterija i broju kolonija (Tablica 5. i 26.), a nalazi kultura na selektivnim podlogama TOS i MRS podijeljeni su prema tome je li porast zabilježen ili ne. TOS selektivna podloga pogodna je za uzgoj bifidobakterija i nalaz pozitivno govori u prilog vijabilnim bifidobakterijama koje su porasle iz uzoraka DHM-a, dok je MRS selektivna kultura namijenjena uzgoju laktobacila.

U Tablici 27. prikazane su korelacije nalaza mikrobioloških kultura uzoraka DHM-a i zastupljenosti rodova bakterija detektiranih NGS metodom.

Tablica 27. Korelacije mikrobioloških kultura mlijeka i zastupljenosti rodova bakterija

Rod bakterija	Ukupno bakterija prije pasterizacije		Kultura TOS		Kultura MRS	
	Korelacijski koeficijent	P	Korelacijski koeficijent	P	Korelacijski koeficijent	P
<i>Bifidobacterium</i>	-0,008	0,939	0,224	<b>0,036</b>	0,087	0,419
<i>Lactobacillus</i>	-0,338	<b>0,001</b>	-0,2	0,061	-0,293	<b>0,006</b>
<i>Staphylococcus</i>	0,375	<b>0,000</b>	0,319	<b>0,002</b>	0,122	0,259
<i>Streptococcus</i>	-0,336	<b>0,001</b>	-0,295	<b>0,005</b>	-0,258	<b>0,015</b>
<i>Burkholderia</i>	-0,564	<b>0,000</b>	-0,312	<b>0,003</b>	-0,478	<b>0,000</b>
<i>Ralstonia</i>	-0,623	<b>0,000</b>	-0,341	<b>0,001</b>	-0,515	<b>0,000</b>
<i>Acidovorax</i>	0,18	0,094	-0,034	0,75	0,031	0,775
<i>Enterobacter</i>	-0,063	0,563	-0,041	0,703	0,048	0,657
<i>Acidithiobacillus</i>	-0,009	0,932	0,162	0,13	0,109	0,312
<i>Enterococcus</i>	0,075	0,486	0,153	0,155	0,122	0,256
<i>Klebsiella</i>	-0,059	0,588	-0,163	0,128	-0,001	0,99
<i>Micromonospora</i>	0,224	<b>0,036</b>	-0,128	0,236	-0,007	0,95
<i>Pseudomonas</i>	-0,152	0,159	-0,232	<b>0,029</b>	-0,097	0,367
<i>Corynebacterium</i>	-0,026	0,809	0,237	<b>0,026</b>	-0,061	0,575
<i>Leifsonia</i>	-0,538	<b>0,000</b>	-0,302	<b>0,004</b>	-0,498	<b>0,000</b>
<i>Rothia</i>	-0,322	<b>0,002</b>	-0,278	<b>0,009</b>	-0,261	<b>0,014</b>
<i>Methylobacterium</i>	-0,260	<b>0,014</b>	-0,191	0,075	-0,282	<b>0,008</b>
<i>Propionibacterium</i>	-0,219	<b>0,041</b>	-0,044	0,683	-0,250	<b>0,019</b>
<i>Sphingomonas</i>	-0,388	<b>0,000</b>	-0,229	<b>0,032</b>	-0,291	<b>0,006</b>
<i>Brevundimonas</i>	-0,233	<b>0,029</b>	-0,083	0,442	-0,068	0,531
<i>Veillonella</i>	-0,233	<b>0,029</b>	-0,192	0,074	-0,121	0,263

Rod bakterija	Ukupno bakterija prije pasterizacije		Kultura TOS		Kultura MRS	
	Korelacijski koeficijent	P	Korelacijski koeficijent	P	Korelacijski koeficijent	P
<i>Leclercia</i>	-0,051	0,635	-0,276	<b>0,009</b>	-0,125	0,245
<i>Gemella</i>	-0,283	<b>0,007</b>	-0,193	0,071	-0,200	0,062

TOS – transgalaktozilirani oligosaharidi; MRS – de Man, Rogosa i Sharpe

Darovano mlijeko koje je imalo veći broj izoliranih bakterija prije pasterizacije na komercijalnom KA, imalo je i veću zastupljenost rodova *Staphylococcus* i *Micromonospora*, a manju zastupljenost rodova *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Leifsonia*, *Rothia* i drugih manje zastupljenih rodova (Tablica 27.). Pozitivna anaerobna kultura na selektivnoj podlozi TOS očekivano je pozitivno korelirala sa zastupljenošću roda *Bifidobacterium*, kao i *Staphylococcus* i *Corynebacterium*. TOS pozitivne kulture negativno su korelirale sa zastupljenošću rodova *Streptococcus*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Leifsonia*, *Rothia*, *Sphingomonas* i *Leclercia*. Pozitivna anaerobna kultura na selektivnoj podlozi MRS neočekivano je negativno korelirala sa zastupljenošću roda *Lactobacillus*, kao i rodova *Streptococcus*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Leifsonia*, *Rothia* i drugih rjeđe zastupljenih rodova.

## 5.7. Povezanost $\alpha$ i $\beta$ mjera raznolikosti napredne analiza sekvenciranja nove generacije s ispitivanim obilježjima

Skupne uzoraka DHM-a razvrstane su prema pojedinim obilježjima darivateljica, djece i mlijeka te uspoređene su mjerama  $\alpha$ -raznolikosti – Faith PD, 'Observed features' i Shannonovim indeksom. Rezultati napredne analize  $\alpha$  mjerama raznolikosti prikazani su u Tablici 28. i na Slikama 23.-28. Dva uzorka iz tehničkih razloga nisu zadovoljila kriterije za naprednu analizu.

Tablica 28. Usporedba skupina uzoraka mlijeka prema mjerama  $\alpha$  raznolikosti (N=86)

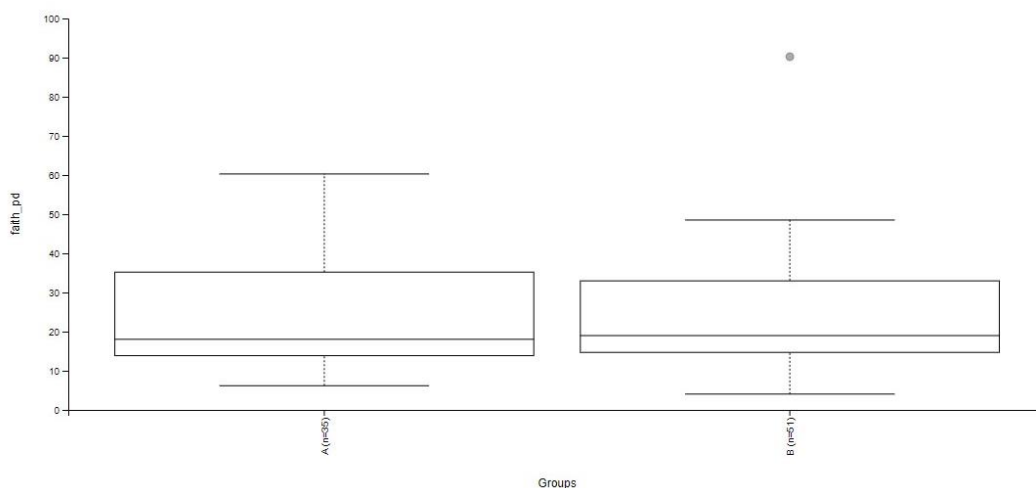
Obilježje	Mjera $\alpha$ -raznolikosti	P
<b>Izloženost antibioticima u posljednjih 6 mjeseci</b>		
Izložene antibioticima (N=35)	Faith PD	0.968
Neizložene antibioticima (N=51)	Observed features	0.954
	Shannon	0.143
<b>Način poroda</b>		
Vaginalni (N=57)	Faith PD	0.664
Carski rez (N=29)	Observed features	0.501
	Shannon	0.413
<b>Način hranjenja</b>		
dojenje (N=53) vs kombinacija (N=12)		<b>0.004</b>
dojenje (N=53) vs isključivo izdavanje (N=21)	Faith PD	<b>0.001</b>
kombinacija (N=12) vs isključivo izdavanje (N=21)		0.910
dojenje (N=53) vs kombinacija (N=12)		<b>0.004</b>
dojenje (N=53) vs isključivo izdavanje (N=21)	Observed features	<b>0.00006</b>
kombinacija (N=12) vs isključivo izdavanje (N=21)		0.409
dojenje (N=53) vs kombinacija (N=12)		0.310
dojenje (N=53) vs isključivo izdavanje (N=21)	Shannon	0.062
kombinacija (N=12) vs. Isključivo izdavanje (N=21)		0.940

Obilježje	Mjera $\alpha$ -raznolikosti	P
<b>Spol djeteta</b>		
Muški (N=42)	Faith PD	0.436
Ženski (N=44)	Observed features	0.927
	Shannon	0.979
<b>Način izdavanja mlijeka</b>		
električna izdajalica (n=44) vs ručno (n=11)		<b>0.002</b>
električna izdajalica (n=44) vs mehanička izdajalica (n=31)	Faith PD	0.212
ručno (n=11) vs mehanička izdajalica (n=31)		<b>0.005</b>
električna izdajalica (n=44) vs ručno (n=11)		0.067
električna izdajalica (n=44) vs mehanička izdajalica (n=31)	Observed features	0.265
ručno (n=11) vs mehanička izdajalica (n=31)		0.330
električna izdajalica (n=44) vs ručno (n=11)		0.333
električna izdajalica (n=44) vs mehanička izdajalica (n=31)	Shannon	0.666
ručno (n=11) vs mehanička izdajalica (n=31)		0.296
<b>Mlijeko</b>		
Preterminsko (N=7)	Faith PD	0.455
Terminsko (N=79)	Observed features	0.285
	Shannon	0.068
<b>Spremnik za mlijeko prije pasterizacije</b>		
Bočica (N=63)	Faith PD	0.434
Vrećica (N=23)	Observed features	0.069
	Shannon	0.389

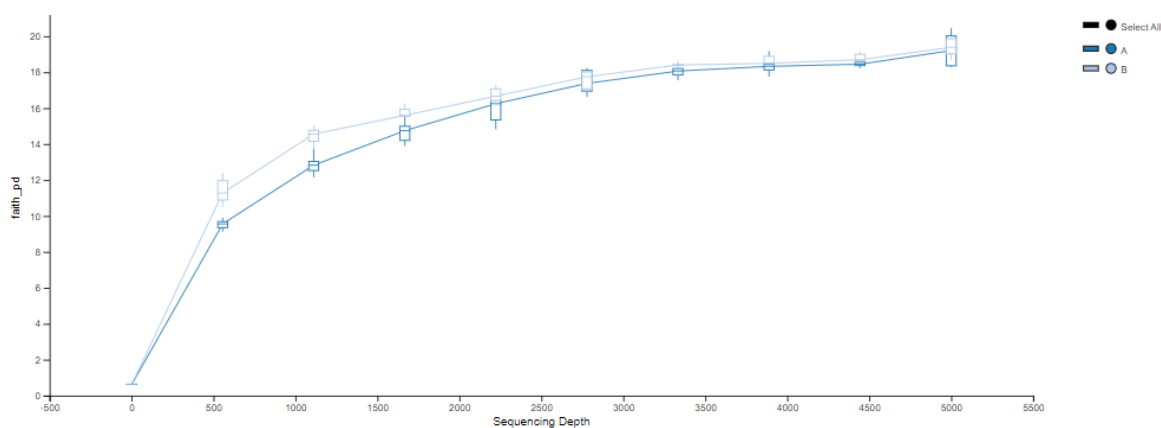
Faith PD- Faithova filogenetska raznolikost; Preterminsko mlijeko – izdvojeno u roku od 4 tjedna nakon poroda koji je nastupio s < 37 tjedana gestacije

Proširenom analizom taksonomskih podataka dobivenih sekvenciranjem utvrđene su statistički značajne razlike između skupina uzoraka s obzirom na način hranjenja djece i način izdavanja darovanog mlijeka (Tablica 28.). Utvrđeno je da je  $\alpha$ -raznolikost veća

u uzorcima mlijeka isključivo dojene djece, mjerom Faith PD i Observed features te u uzorcima izdojenim ručnom tehnikom mjerom Faith PD (Tablica 28., Slike 23.-26.). Uspoređujući skupine uzoraka darivateljica s obzirom na izloženost antibioticima, nije pronađena razlika u  $\alpha$ -raznolikosti trima mjerama ni  $\beta$ -raznolikosti težinskom UniFrac mjerom (Tablica 28., Slike 23., 24. i 29.). Slike 23.-29. su vizualizacije rezultata dobivene s Qiime 2 platforme.

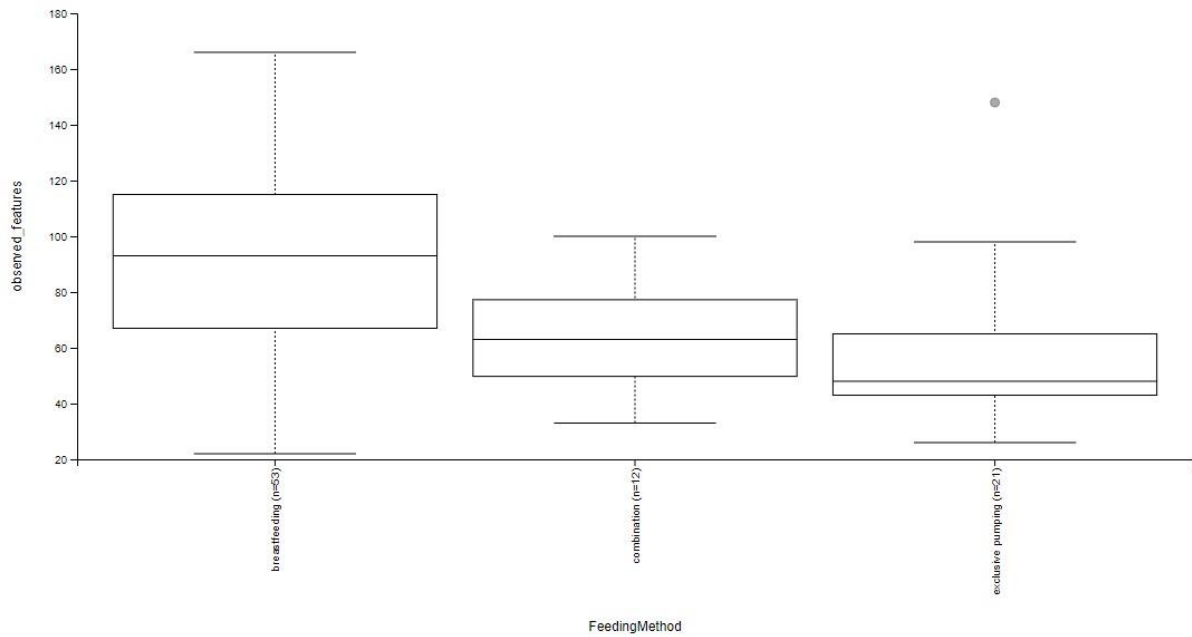


Slika 23. Alfa-raznolikost mjerom Faith PD usporedba skupina prema izloženosti antibioticima (A=izložene, B=neizložene antibioticima unutar posljednjih 6 mjeseci prije darivanja mlijeka)

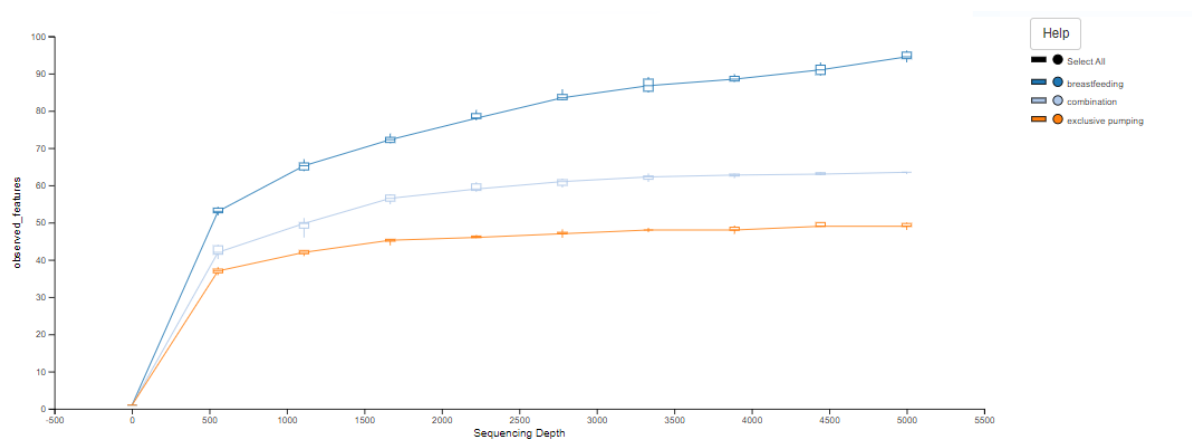


Slika 24. Krivulje  $\alpha$ -razrjeđenja mjerom Faith PD usporedba skupina prema izloženosti antibioticima (A=izložene, B=neizložene antibioticima unutar posljednjih 6 mjeseci prije darivanja mlijeka)

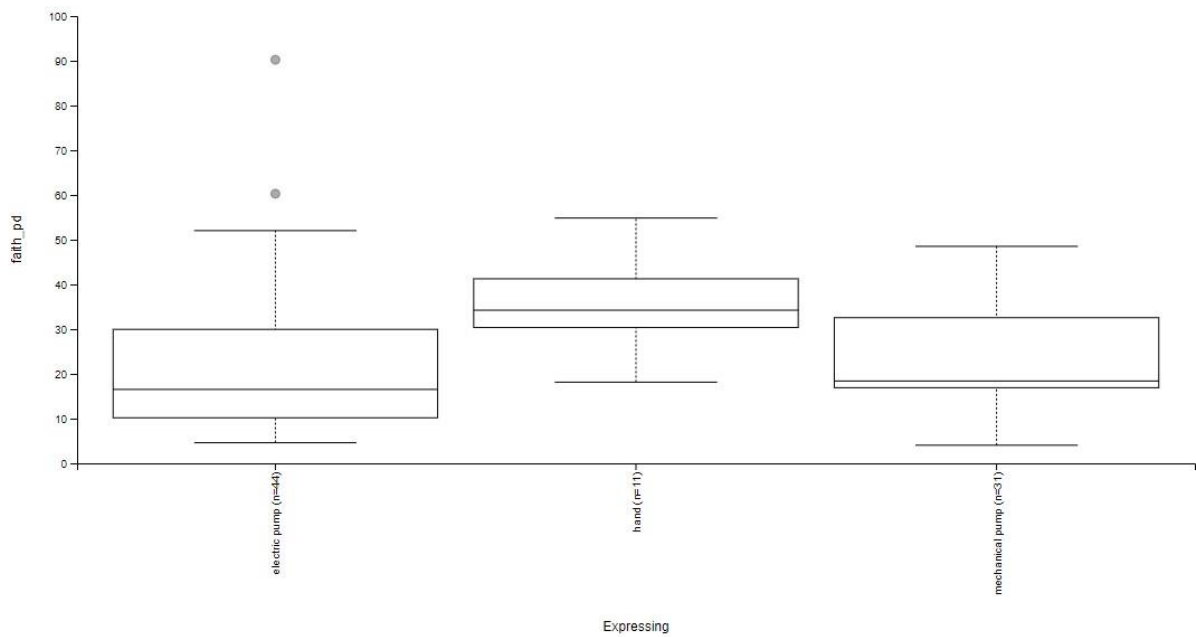




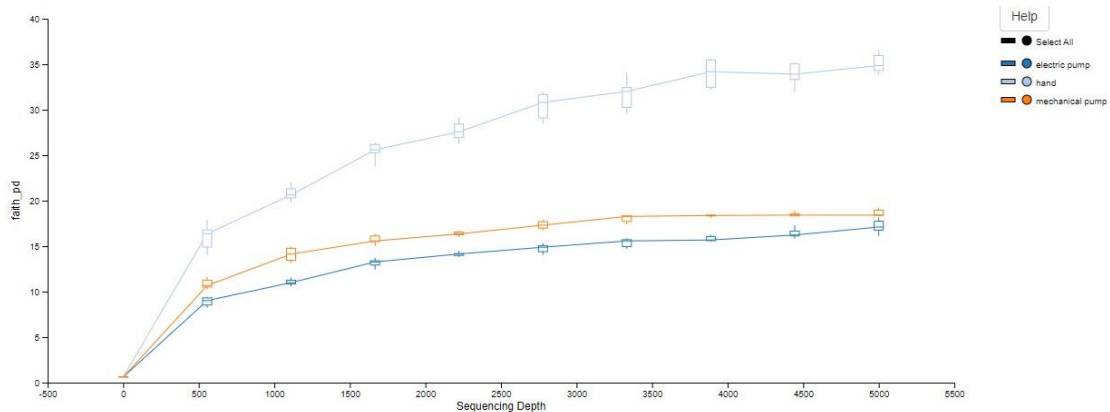
Slika 25. Alfa-raznolikost mjerom Observed features, usporedba skupina prema načinu hranjenja majčinim mlijekom, s lijeva na desno: uzorci DHM-a dojene djece, hranjene kombinacijom dojenja i izdojenog mlijeka te desno isključivo izdajanim mlijekom



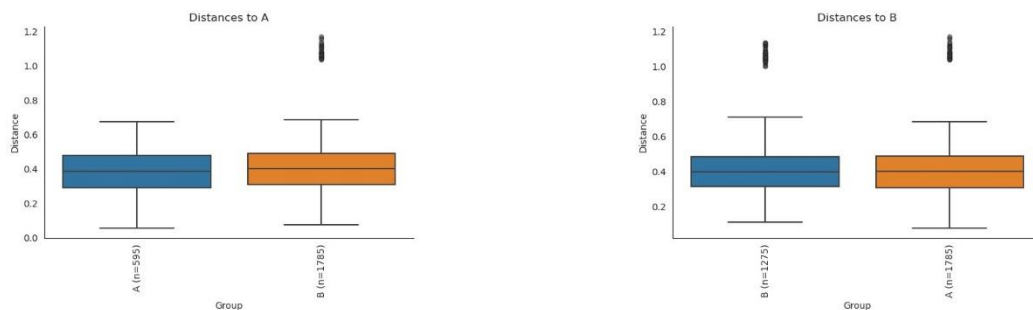
Slika 26. Krivulje  $\alpha$ -razrjeđenja mjerom Observed features usporedba skupina prema načinu hranjenja majčinim mlijekom



Slika 27. Alfa-raznolikost mjerom Faith PD, usporedba skupina prema načinu izdavanja mlijeka: lijevo- električna izdajalica, sredina- ručna tehnika, desno- mehanička izdajalica

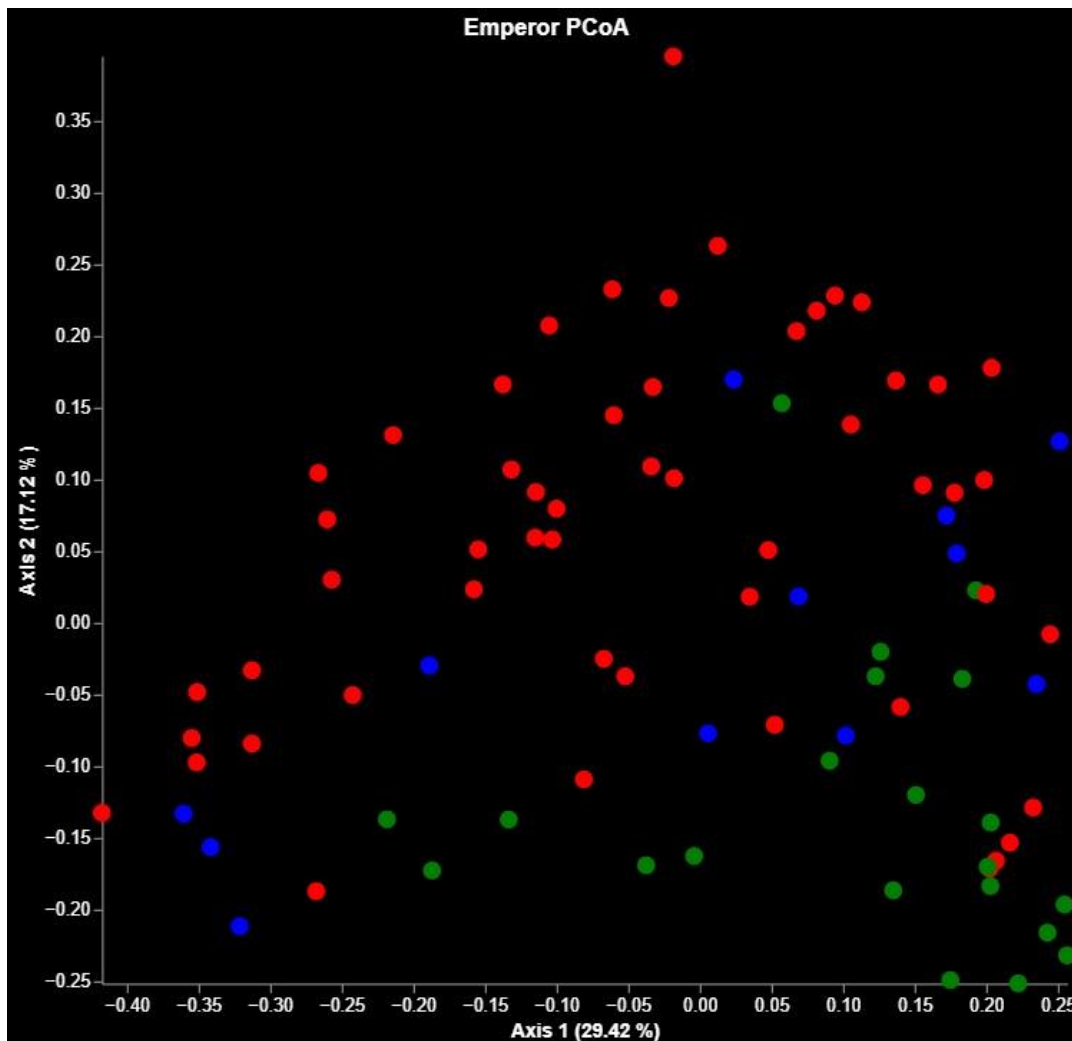


Slika 28. Krivulje  $\alpha$ -razrjeđenja mjerom Faith PD usporedba skupina prema načinu izdavanja mlijeka

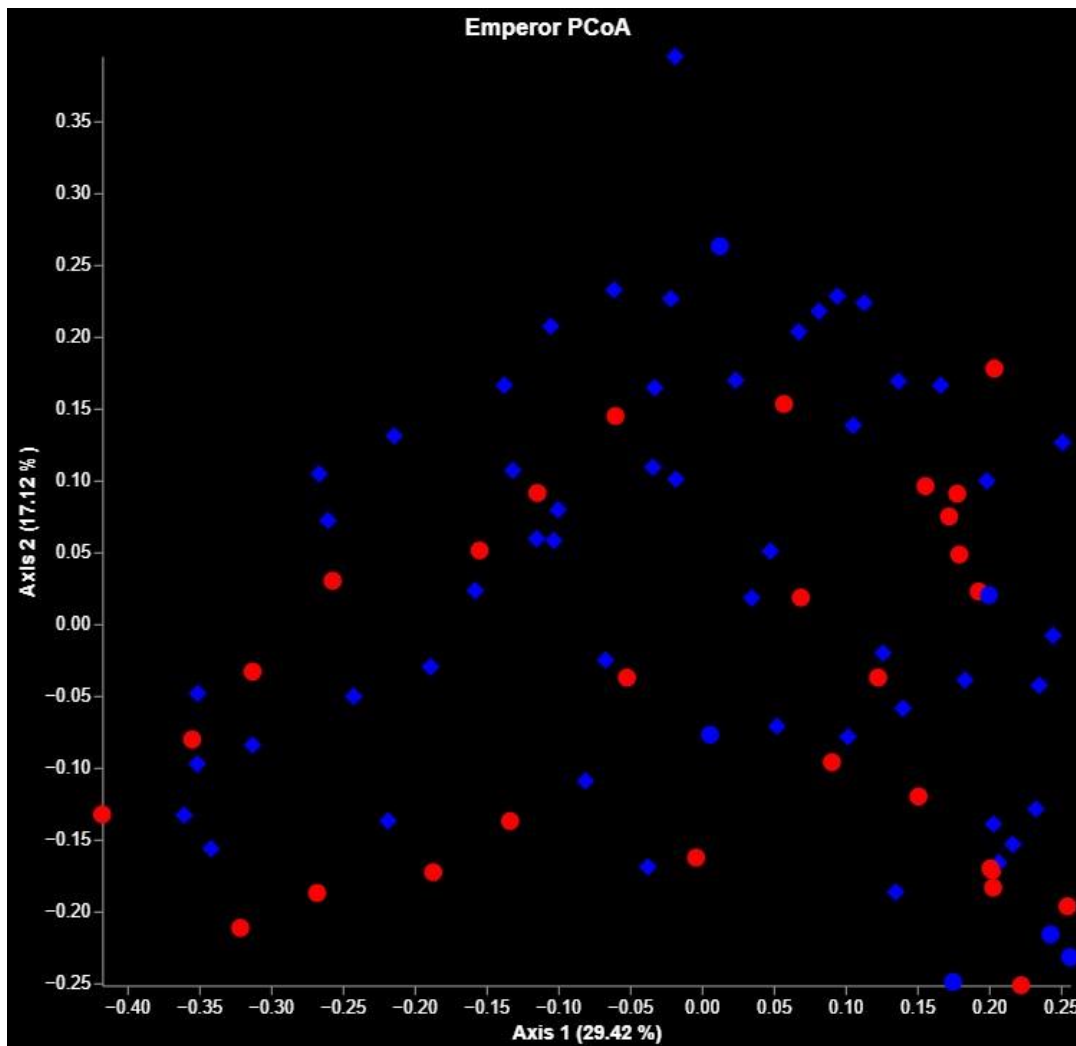


Slika 29. Beta-raznolikost težinskom Unifrac mjerom, usporedba skupina prema izloženosti antibioticima (A=izložene, B=neizložene antibioticima unutar posljednjih 6 mjeseci prije darivanja mlijeka)

Na Slikama 30. i 31. prikazane su Emperor vizualizacije s Qiime 2 platforme koje prikazuju težinsku UniFrac mjeru  $\beta$ -raznolikosti uzoraka prikazanih u različitim bojama i/ili oblicima prema pojedinim obilježjima. Na Slici 30. prikazani su uzorci DHM-a podijeljeni s obzirom na način hranjenja majčinim mlijekom djece darivateljica, a na Slici 31. uzorci su podijeljeni na skupine ovisno o načinu poroda i izloženosti antibiotskoj terapiji.



Slika 30. Beta-raznolikost uzoraka težinskom UniFrac mjerom; uzorci podijeljeni s obzirom na način hranjenja majčinim mlijekom: crveni krug – uzorci mlijeka dojene djece, zeleni krug – isključivo izdajano mlijeko, plavi krug – kombinacija dojenja i izdavanja



Slika 31. Beta-raznolikost netežinskom UniFrac mjerom; uzorci DHM-a podijeljeni s obzirom na način poroda i izloženost antibioticima: crvena boja – porod carskim rezom, plava boja – vaginalni porod; krug – uzorci mlijeka skupine izložene antibioticima unutar posljednjih 6 mjeseci prije darivanja mlijeka, dijamant – skupina neizloženih antibioticima unutar posljednjih 6 mjeseci prije darivanja mlijeka

## 5.8. Probiotičke bakterije u darovanom humanom mlijeku

Iako metoda sekvenciranja gena 16S rRNA nije precizna za određivanje bakterija na razini vrsta, analizirani su identiteti i vrste dobivenih bakterija iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* zbog njihovog posebnog probiotičkog značaja.

U Tablici 29. prikazana je deskriptivna statistika vrsta laktobacila i bifidobakterija detektiranih NGS-om u uzorcima DHM-a.

Tablica 29. Relativna zastupljenost u postocima bakterijskih vrsta iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* metodom sekvenciranja nove generacije iz uzoraka darovanog humanog mlijeka (N=88)

Bakterijska vrsta	Prosjek	SD	Min	Max	25. centila	Medijan	75. centila
<i>Lactobacillus gasseri</i>	1,517	7,292	0,020	61,363	0,046	0,071	0,261
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,957	2,810	0,009	22,017	0,056	0,176	0,597
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0,427	3,184	0,000	29,869	0,008	0,016	0,049
<i>Lactobacillus zeae</i>	0,008	0,055	0,000	0,464	0,000	0,000	0,000
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	0,069	0,414	0,000	3,721	0,000	0,000	0,006
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0,021	0,035	0,000	0,150	0,000	0,004	0,022
<i>Lactobacillus brevis</i>	0,030	0,109	0,000	0,769	0,000	0,002	0,006
<i>Lactobacillus reuteri</i>	0,022	0,101	0,000	0,702	0,000	0,000	0,001
<i>Bifidobacterium breve</i>	0,047	0,217	0,000	1,943	0,000	0,002	0,007
<i>Bifidobacterium longum</i>	0,043	0,384	0,000	3,604	0,000	0,000	0,004

Iz uzoraka mlijeka metodom NGS detektirano je 7 vrsta iz roda *Lactobacillus* i 2 vrste iz roda *Bifidobacterium*. *L. gasseri* je bio najzastupljenija vrsta prema prosječnoj vrijednosti, a *L. plantarum* prema medijanu (Tablica 29.). Obilježja darivateljica, djece i mlijeka su korelirana sa zastupljenošću bakterijskih vrsta iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, prikazani u Tablici 30.

Tablica 30. Zastupljenost bakterijskih vrsta iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* u korelaciji s poznatim obilježjima majki, djece i mlijeka

Bakterijska vrsta	ITM	Termin poroda (GD)	Tjedni laktacije	Prosjek T kućnog zamrzivača	U BHM prije stvaranja mješavine	U BHM od stvaranja mješavine do izolacije DNA	UH	Proteini	
<b><i>Lactobacillus gasseri</i></b>	Rho	0,088	-0,214	0,016	0,149	0,129	-0,378	0,187	-0,060
	P	0,413	<b>0,046</b>	0,879	0,233	0,229	<b>0,000</b>	<b>0,081</b>	0,581
<b><i>Lactobacillus plantarum</i></b>	Rho	0,059	-0,032	0,099	0,045	0,279	-0,440	0,211	-0,221
	P	0,587	0,770	0,361	0,717	<b>0,008</b>	<b>0,000</b>	<b>0,048</b>	0,038
<b><i>Lactobacillus fermentum</i></b>	Rho	-0,068	0,035	0,272	0,167	0,069	0,294	-0,132	-0,182
	P	0,529	0,747	<b>0,010</b>	0,181	0,522	<b>0,005</b>	0,222	0,090
<b><i>Lactobacillus zeae</i></b>	Rho	-0,238	0,122	0,247	0,160	-0,067	0,316	-0,213	-0,079
	P	<b>0,025</b>	0,257	<b>0,021</b>	0,199	0,532	<b>0,003</b>	<b>0,046</b>	0,464
<b><i>Lactobacillus johnsonii</i></b>	Rho	-0,129	-0,012	0,138	0,089	-0,123	0,782	-0,404	0,057
	P	0,232	0,912	0,199	0,479	0,254	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,599
<b><i>Lactobacillus paracasei</i></b>	Rho	-0,037	0,017	0,183	0,019	0,170	-0,352	0,280	-0,270
	P	0,730	0,871	0,087	0,881	0,112	<b>0,001</b>	<b>0,008</b>	<b>0,011</b>
<b><i>Lactobacillus brevis</i></b>	Rho	0,204	-0,202	-0,053	-0,054	0,172	-0,429	0,217	0,047
	P	0,057	0,059	0,622	0,664	0,108	<b>0,000</b>	<b>0,043</b>	0,666
<b><i>Lactobacillus reuteri</i></b>	Rho	0,151	0,162	-0,113	-0,258	-0,080	-0,316	0,258	0,017
	P	0,159	0,131	0,293	<b>0,037</b>	0,460	<b>0,003</b>	<b>0,015</b>	0,878
<b><i>Bifidobacterium breve</i></b>	Rho	0,112	-0,107	-0,152	0,059	0,023	-0,358	0,164	-0,017
	P	0,298	0,323	0,157	0,638	0,830	<b>0,001</b>	0,127	0,874
<b><i>Bifidobacterium longum</i></b>	Rho	0,375	-0,034	-0,131	-0,102	0,045	-0,694	0,235	0,044
	P	<b>0,000</b>	0,751	0,225	0,414	0,674	<b>0,000</b>	<b>0,028</b>	0,682

ITM – indeks tjelesne mase; GD – gestacijska dob djeteta u tjednima; T – temperatura; BHM – banka humanog mlijeka; DNA – deoksiribonukleinska kiselina; UH – ugljikohidrati

U Tablici 30. nisu prikazana obilježja za koja nije bilo ni pozitivne ni negativne korelacije sa zastupljenošću pojedinih rodova (dob darivateljice, redosljed rođenja djeteta, dani pohrane kod kuće, količina masti i kalorijska vrijednost). Što je bio kasniji termin poroda i dulja pohrana u Banci od stvaranja mješavine do izolacije bakterijske DNA, to je manja bila zastupljenost *L. gasseri*, a što je bilo više UH-a, to je više bilo i vrste *L. gasseri*. Vrste *L. plantarum* je bilo više u uzorcima koji su dulje bili pohranjeni u Banci prije stvaranja mješavine te imali veću količinu UH-a, a manje u uzorcima mlijeka koji su bili duže pohranjeni u BHM-u nakon stvaranja mješavine te u kojima je bila veća količina proteina. U uzorcima izdajanim s više tjedana laktacije i koji su dulje bili

pohranjeni u BHM-u nakon stvaranja mješavine veća je i zastupljenost vrste *L. fermentum*. Uzorci darivateljica s većim ITM-om i većom razinom UH-a imali su manju zastupljenost *L. zea*, dok su uzorci izdajani u kasnijoj dobi djeteta i koji su bili dulje pohranjeni u BHM-u nakon stvaranja mješavine imali veću zastupljenost iste vrste *Lactobacillus*. U uzorcima mlijeka koji su bili duže pohranjeni u BHM-u nakon stvaranja mješavine bila je veća zastupljenost *L. johnsonii*, a u onima s većom razinom UH-a bila je manja zastupljenost iste vrste.

Zastupljenost *L. paracasei* bila je veća u uzorcima s više UH-a, a manja u onima s duljom pohranom nakon stvaranja mješavine i većom količinom proteina. Sa *L. brevis* i *L. reuteri* također negativno korelira duljina trajanja pohrane nakon stvaranja mješavine, a pozitivno razina UH-a. Blizu praga statističke značajnosti su i pozitivna povezanost ITM-a darivateljice sa zastupljenošću *L. brevis* te negativna povezanost s GD-om na porodu. Što je niža bila temperatura kućnog zamrzivača darivateljice, to je manja bila zastupljenost *L. reuteri*. Uzorci koji su bili dulje pohranjeni nakon stvaranja mješavine imali su manju zastupljenost *Bifidobacterium breve* i *Bifidobacterium longum*. Uzorci darivateljica s većim ITM-om i oni s većom razinom UH-a imali su više vrste *B. longum*.

Binarnom logističkom regresijom postavljen je model predikcije pripadnosti skupini koja sadrži bakterije iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* u uzorcima DHM-a detektiranih NGS metodom (Tablica 31.).

Tablica 31. Regresijski model predikcije pripadnosti skupini u kojoj su rodovi *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*: binarna logistička regresija

P<0,001; 83,3 % klasificiranih, r <sup>2</sup> =52,4 %	OR	95 % CI		P
		Donji	Gornji	
Nisu izložene antibioticima	0,185	0,005	6,806	0,359
Način poroda: carski rez	0,091	0,002	3,957	0,213
Način hranjenja: dojenje (REF.)				0,110
Isključivo izdavanje	0,440	0,044	4,366	0,483
Kombinacija	0,063	0,005	0,863	<b>0,038</b>
Način izdavanja: mehanička izdajalica (REF.)				0,815
Električna izdajalica	0,971	0,167	5,639	0,974
Ručno	0,481	0,042	5,442	0,554
Pohrana kod kuće (dani)	1,059	0,985	1,138	0,122
Prosjek temperature u kućnom zamrzivaču (°C)	1,180	0,956	1,457	0,124
Pohrana u Banci na -30 °C, dani prije stvaranja mješavine	0,987	0,947	1,027	0,515
Pohrana u Banci na -30 °C, dani od stvaranja mješavine do izolacije DNA	0,991	0,985	0,996	<b>0,001</b>
Broj bakterija prije pasterizacije	0,682	0,286	1,627	0,388

OR – omjer vjerojatnosti; CI – interval pouzdanosti; REF. – referentna vrijednost varijable; DNA – deoksiribonukleinska kiselina

Tablica 31. prikazuje regresijski model predikcije pripadnosti skupini koja sadrži rodove *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Model je statistički značajan (P<0,001), uspješno klasificira 83,3 % uzoraka te objašnjava 52,4 % varijance zavisne varijable (r<sup>2</sup>=52,4 %). Od svih korištenih prediktorskih varijabli u regresijskom modelu (izloženost antibioticima unutar posljednjih 6 mjeseci prije izdavanja, način poroda, način hranjenja majčinim mlijekom i izdavanja viška mlijeka, duljina pohrane kod kuće i u Banci, prosjek temperature u kućnom zamrzivaču i broju bakterija u mlijeku prije pasterizacije) samo su se način hranjenja i duljina pohrane u Banci na -30 °C od stvaranja mješavine do izolacije DNA izdvojili kao statistički značajne i to kontrolirane na utjecaj ostalih varijabli u regresijskom modelu. Kombinacija dojenja i izdavanja značajno smanjuje vjerojatnost pripadnosti skupini koja sadrži obje probiotičke bakterije u odnosu na isključivo dojenje i to za 1/0,063=15,87 puta (OR=0,063; 95 % CI=0,005-0,863; P=0,038). Također, za svaki dan dulje pohrane u Banci na -30 °C od stvaranja mješavine do izolacije DNA vjerojatnost pripadnosti skupini koja ima oba roda probiotičkih bakterija se smanjuje 1/0,991=1,009 puta ili 0,9 % (OR=0,991, 95 % CI=0,986-0,999; =0,001).



Binarnom logističkom regresijom postavljeni su i modeli predikcije pripadnosti skupini koja ima u mlijeku rod *Bifidobacterium*, odnosno rod *Lactobacillus* (Tablica 32. i 33.).

Tablica 32. Regresijski model predikcije pripadnosti skupini koja sadrži rod *Bifidobacterium*: binarna logistička regresija

P=0,022; 68,8 % klasificiranih, r <sup>2</sup> =40 %	OR	95 % CI		P
		Donji	Gornji	
Nisu izložene antibioticima	1,496	0,064	35,138	0,802
Način poroda: carski rez	2,556	0,095	68,916	0,577
Način hranjenja: dojenje (REF.)				0,363
Isključivo izdavanje	2,501	0,144	43,405	0,529
Kombinacija	0,344	0,050	2,364	0,278
Način izdavanja: mehanička izdajalica (REF.)				0,437
Električna izdajalica	0,369	0,057	2,387	0,295
Ručno	0,281	0,035	2,291	0,236
Pohrana kod kuće (dani)	1,076	1,012	1,144	<b>0,019</b>
Prosjek temperature u kućnom zamrzivaču (°C)	0,986	0,833	1,168	0,871
Pohrana u Banci na -30 °C, dani prije stvaranja mješavine	0,986	0,954	1,020	0,420
Pohrana u Banci na -30 °C, dani od stvaranja mješavine do izolacije DNA	0,992	0,987	0,997	<b>0,002</b>
Broj bakterija prije pasterizacije	1,484	0,606	3,633	0,388

OR – omjer vjerojatnosti; CI – interval pouzdanosti; REF. – referentna vrijednost varijable; DNA – deoksiribonukleinska kiselina

Tablica 32. prikazuje regresijski model predikcije pripadnosti skupini koja sadrži rod *Bifidobacterium*. Model je statistički značajan (P=0,022), uspješno klasificira 68,8 % uzoraka te objašnjava 40,0 % varijance zavisne varijable (r<sup>2</sup>=40,0 %). Od svih korištenih prediktorskih varijabli u regresijskom modelu (izloženost antibioticima, način poroda, način hranjenja i izdavanja, duljina pohrane kod kuće i u Banci, prosjek temperature u kućnom zamrzivaču i broju bakterija u mlijeku prije pasterizacije) samo su se duljina pohrane kod kuće i duljina pohrane u Banci na -30 °C od stvaranja mješavine do izolacije DNA izdvojile kao statistički značajne i to kontrolirane na utjecaj ostalih varijabli u regresijskom modelu. Dulja pohrana kod kuće značajno povećava vjerojatnost pripadnosti skupini koja ima rod *Bifidobacterium* i to za 7,6 % za svaki dan dulje pohrane (OR=1,076; 95 % CI=1,012-1,144; P=0,019). Također, za svaki dan dulje pohrane u Banci na -30 °C od stvaranja mješavine do izolacije DNA, vjerojatnost pripadnosti skupini koja sadrži *Bifidobacterium* se smanjuje 1/0,992=1,008 puta ili 0,8 % (OR=0,992, 95 % CI=0,987-0,997; P=0,002).

Tablica 33. Regresijski model predikcije pripadnosti skupini koja sadrži rod *Lactobacillus*: binarna logistička regresija

P=0,020; 80,3 % klasificiranih, r <sup>2</sup> =39 %	OR	95 % CI		P
		Donji	Gornji	
Nisu izložene antibioticima	0,553	0,013	23,826	0,758
Način poroda: carski rez	0,432	0,009	19,655	0,666
Način hranjenja: dojenje (REF.)				0,668
Isključivo izdavanje	1,315	0,161	10,772	0,798
Kombinacija	0,485	0,079	2,983	0,435
Način izdavanja: mehanička izdajalica (REF.)				0,431
Električna izdajalica	0,532	0,112	2,518	0,426
Ručno	0,260	0,032	2,121	0,208
Pohrana kod kuće (dani)	1,006	0,951	1,065	0,822
Prosjek temperature u kućnom zamrzivaču (°C)	1,310	1,063	1,614	<b>0,011</b>
Pohrana u Banci na -30 °C, dani prije stvaranja mješavine	1,021	0,988	1,054	0,213
Pohrana u Banci na -30 °C, dani od stvaranja mješavine do izolacije DNA	0,996	0,992	0,999	<b>0,036</b>
Broj bakterija prije pasterizacije	0,304	0,130	0,712	<b>0,006</b>

OR – omjer vjerojatnosti; CI – interval pouzdanosti; REF. – referentna vrijednost varijable; DNA – deoksiribonukleinska kiselina

Tablica 33. prikazuje regresijski model predikcije pripadnosti skupini koja sadrži rod *Lactobacillus*. Model je statistički značajan (P=0,020), uspješno klasificira 80,3 % uzoraka te objašnjava 39,0 % varijance zavisne varijable (r<sup>2</sup>=39,0 %). Od svih korištenih prediktorskih varijabli u regresijskom modelu (izloženost antibioticima, način poroda, način hranjenja i izdavanja, duljina pohrane kod kuće i u Banci, prosjek temperature u kućnom zamrzivaču i broju bakterija u mlijeku prije pasterizacije) samo su se prosjek temperature u kućnom zamrzivaču (°C), duljina pohrane u Banci na -30 °C od pasterizacije do izolacije DNA i broj bakterija prije pasterizacije izdvojile kao statistički značajne i to kontrolirane na utjecaj ostalih varijabli u regresijskom modelu. Za svaki stupanj smanjenja temperature u kućnom zamrzivaču vjerojatnost pripadnosti skupini s izoliranim rodom *Lactobacillus* raste 1,31 puta ili 31 % (OR=1,310; 95 %CI=1,063-1,614; P=0,011). Za svaki dan dulje pohrane u Banci na -30 °C od stvaranja mješavine do izolacije vjerojatnost pripadnosti skupini koja ima rod *Lactobacillus* se smanjuje 1/0,996=1,004 puta ili 0,4 % (OR=0,996, 95 % CI=0,992-0,999; P=0,036). Veći broj bakterija prije pasterizacije značajno smanjuje vjerojatnost pripadnosti skupini koja sadrži rod *Lactobacillus* i to za 1/0,304=3,28 puta (OR=0,304; 95 % CI=0,130-0,712; P=0,006).

## 6. RASPRAVA

Bakterijska mikrobiota darovanog humanog mlijeka majki koje su rodile vaginalno i nisu bile izložene antibioticima unutar posljednjih 6 mjeseci prije izdavanja nije imala veću zastupljenost bakterija iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, čime hipoteza ovog istraživanja nije dokazana.

Opći cilj istraživanja bio je metodom sekvenciranja nove generacije odrediti sastav bakterijske mikrobiote DHM-a i zastupljenost pojedinih rodova bakterija. Istraživanjem su dobiveni slični rezultati u pogledu rodova bakterija koji se smatraju srži HMM-a (23-25). Metodom NGS u svim uzorcima darovanog mlijeka detektirane su bakterije iz rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Acidovorax*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Acidithiobacillus*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Stenotrophomonas*, *Leifsonia*, *Rothia*, *Flavobacterium* i drugih manje zastupljenih (Tablica 9. i Slika 20.). Možemo ih nazvati srži mikrobiote DHM-a u ispitivanih 88 uzoraka različitih darivateljica mlijeka. Uvidom u rezultate Tablice 9. i Slike 20. možemo reći da su to dominantno rodovi *Staphylococcus* i *Streptococcus*, čija zastupljenost također varira, ovisno o drugim obilježjima.

Prvi specifični cilj bio je ispitati povezanost sastava bakterijske mikrobiote darovanog mlijeka s poznatim obilježjima majki darivateljica.

U do sada objavljenoj literaturi nema podataka o tome da dob majke utječe na sastav HMM-a kao što, primjerice, može utjecati na sastav prehrambenih vrijednosti mlijeka (117). U uzorku ispitanica ovog istraživanja nije nađena povezanost između zastupljenosti najčešćih rodova bakterija i dobi majke, osim za rod *Citrobacter* kojega je manje u starijih darivateljica (Tablica 15.).

Indeks tjelesne mase, prema istraživanjima, različito doprinosi sastavu HMM-a. U dva istraživanja s većim brojem ispitanica (133 odnosno 393 žena) nije nađena povezanost sa zastupljenošću bakterijske HMM-e (38, 42).

Prema istraživanju Cabrera-Rubio i suradnika, žene s većim ITM-om imale su veću zastupljenost roda *Lactobacillus* u kolostrumu, a manju roda *Bifidobacterium* u zrelom mlijeku (118). U istraživanju iz Kine, koje je uspoređivalo sastav mlijeka 89 žena iz različitih regija zemlje, veći ITM povezuje se s više roda *Staphylococcus*, a manje *Lactobacillus* i *Streptococcus* (119). U istraživanju Bai i suradnika, u skupini od 267 djece nađena je pozitivna korelacija povećanog ITM-a i zastupljenosti bifidobakterija u

crijevu (120). U ovom istraživanju je ITM darivateljica također pozitivno korelirao sa zastupljenošću rodova *Bifidobacterium*, ali i *Agitococcus* i *Serratia*, a negativno s rodom *Ochrobactrum* (Tablica 15.).

Prema do sada objavljenim istraživanjima, majke koje su primale antibiotike tijekom poroda imale su manji ukupni broj bakterija ( $10^4$  u usporedbi sa  $10^6$  CFU/mL), ali veću  $\alpha$ -raznolikost i bogatstvo HMM-a (44, 45). U drugoj studiji izloženost antibioticima povezana je s manjom  $\alpha$ -raznolikošću i drugačijim mikrobnim ekosustavom u kolostrumu nakon poroda (121). U ovom istraživanju nije nađena povezanost između izloženosti antibioticima darivateljica i broja bakterijskih kolonija u mlijeku prije pasterizacije, prema nalazima mikrobioloških kultura na KA (Tablica 26.).

Skupine uzoraka DHM-a podijeljene prema izloženosti darivateljica antibioticima razlikovale su se u trajanju trudnoće i zastupljenosti pojedinih rodova bakterija (Tablica 10.). U skupini koja je primala antibiotike, a ujedno i imala kraće trajanje gestacije, više je roda *Staphylococcus*, dok je skupina neizloženih imala više rodova *Streptococcus*, *Rothia* i *Citrobacter* (Tablica 10.).

Usporedbom podskupina uzoraka mlijeka darivateljica koje su primale antibiotsku terapiju i onih koje su primile profilaksu, u terapijskoj skupini bilo je manje rodova *Rothia* i *Citrobacter*, trudnoća je kraće trajala i uzorci su prikupljeni u ranijoj laktacijskoj dobi u odnosu na skupinu koja je primala antibiotike profilaktički (Tablice 11. i 12.). Antibiotici koje majke primaju tijekom poroda ili u vrijeme trudnoće, babinja ili laktacije, indicirani su kao preventivna zaštita djeteta ili majke odnosno terapija majke. Darivateljice mlijeka u vrijeme primanja antibiotika ne mogu darivati, a odgoda do početka izdavanja je za većinu lijekova 72 sata od zadnje doze. S obzirom na dobivene rezultate i veliku učestalost korištenja antibiotskih lijekova, prema rezultatima ovog istraživanja nema bojazni za utjecaj na probiotičku HMM darovanog mlijeka.

U istraživanjima se mjesto stanovanja navodi kao obilježje koje utječe na sastav HMM-a i među pojedinim zemljama i regijama unutar njih (24, 38, 118). Hrvatska je relativno mala zemlja i usporedbom darivateljica prema mjestu stanovanja nisu nađene značajnije razlike. Skupine su podijeljene prema tome jesu li darivateljice stanovale u Gradu Zagrebu, njih 65 %, odnosno 35 % u ostatku RH (Tablica 3.). Skupine su se razlikovale po trajanju gestacije, a sukladno tome i po zastupljenosti rodova *Staphylococcus* i *Streptococcus* (Tablica 14.).

Do sada objavljene studije pokazale su proturječne rezultate u pogledu povezanosti načina poroda i sastava HMM-a (37, 38, 40, 42). U ovom istraživanju majke koje su

rodile carskim rezom imale su kraće trajanje gestacije te su njihovi uzorci bili duže pohranjeni u BHM-u prije izolacije DNA (Tablica 13.) u odnosu na darivateljice koje su rodile vaginalno. Vjerojatno i zbog ranijeg poroda, a ne samo CS-a, u uzorcima tih darivateljica uočena je veća zastupljenost roda *Staphylococcus*, a manja rodova *Streptococcus* i *Rothia* (Tablica 13.).

Na sastav HMM-a može utjecati trajanje gestacije, iako su rezultati dosadašnjih istraživanja oprečni. Prema Khodayar-Pardo i suradnicima nađeno je više relativne i apsolutne zastupljenosti roda *Bifidobacterium* kod žena koje su rodile u terminu, dok drugo istraživanje nije našlo poveznicu s gestacijskom dobi (36, 37). U rezultatima dobivenim ovim istraživanjem darivateljice koje su rodile u kasnijim tjednima gestacije imale su više bakterija iz rodova *Streptococcus* i *Rothia*, a manje *Staphylococcus*, te se u više rezultata, odnosno usporedbom skupina uzoraka po različitim obilježjima, to pokazalo kao statistički značajno (Tablice 10., 12.-15.).

Dosadašnjim istraživanjima potvrđena je povezanost prehrane majki i sastava HMM-a, primjerice konzumacija više fermentirane hrane s više *L. fermentum* u uzorcima mlijeka ili više *Rhizobiuma* koji je simbiot s mahunarkama u području gdje se one više konzumiraju (122, 123). S obzirom na retrospektivni dizajn istraživanja, nije bilo moguće ispitati i prehrambene navike darivateljica.

Probiotike je kao suplemente uzimala jedna darivateljica koja ima najveću količinu NGS-om dokazane relativne zastupljenosti laktobacila. Za druge darivateljice, odnosno uzorke DHM-a s više od 1 % zastupljenosti roda *Lactobacillus* ne postoji anamnestički podatak iz upitnika za darivateljice, procjene sigurnosti ili prijave za darivanje o uzimanju probiotika. Ono što ovim istraživanjem nije ispitivano je prehrana darivateljica.

Sljedeći specifični cilj bio je ispitati povezanost sastava bakterijske mikrobiote darovanog mlijeka s obilježjima djece darivateljica.

Spol djece može imati utjecaj na sastav HMM-a, primjerice u velikoj studiji na gotovo 400 ispitanica u mlijeku majki dječaka nađene su manja raznolikost i bogatstvo HMM-a (42). U drugom istraživanju majke dječaka imale su u mlijeku više roda *Streptococcus*, a manje *Staphylococcus* (43). Treća studija nije našla poveznicu spola i HMM-a (37). U ovom istraživanju razlike među skupinama koje su statistički značajne su bila veća koncentracija izolirane DNA iz mlijeka majki djevojčica i više roda *Propionibacterium* u mlijeku majki dječaka.

U djece koja su prvorodena opisana je manja raznolikost, ali ne i razlika u sastavu HMM-a u usporedbi s onima s jednim ili više braće odnosno sestara (42, 43). U ovom istraživanju kod prvorodjenih ili ranije rođenih bilo je više bakterija iz roda *Rhizobium* (Tablica 16.).

Istraživanja su jednoglasna oko činjenice da se tijekom razdoblja laktacije prehrambeni sastav humanog mlijeka mijenja i prilagođava potrebama novorođenčeta odnosno dojenčeta (124). Po pitanju promjena u sastavu HMM-a tijekom laktacije, istraživanja su vrlo različitih zaključaka (8, 34, 37, 38, 43). U prvih 10 dana nakon poroda u mlijeku je nađeno više rodova *Streptococcus*, *Staphylococcus* i *Enterococcus*, a nakon prvih 10 dana laktacije u mlijeku je više rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Rothia*, *Veillonella* i drugih (36, 117, 123, 125). Prema Dragu i suradnicima, više je anaerobnih bakterija u zrelom mlijeku nego u kolostrumu (126). U ispitivanim uzorcima DHM-a, u ranijim tjednima laktacije bilo je statistički značajno više roda *Staphylococcus*, a u kasnijim tjednima više rodova *Lactobacillus*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Acidithiobacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Leifsonia* i drugih manje zastupljenih rodova, za izdvojiti su rodovi *Veillonella* i *Gemella* što odgovara nekim od prethodno citiranih rodova (Tablica 18.).

Zrelo mlijeko izgledno je sastavom HMM-a bogatije probiotičkim bakterijama, ali prehrambena vrijednost u prvim danima i tjednima optimalna je za prijevremeno rođenu djecu, posebno po količini proteina (124).

Idealan način hranjenja majčinim mlijekom je dojenje, jer je fiziološki nastavak gestacije i praktičnije je od drugih metoda. Dojenje nije uvijek moguće, naročito u prijevremeno rođene djece koja tek razvijaju akt sisanja i gutanja te ga usklađuju s disanjem. U prijevremeno rođene djece je barem u početku potrebno hranjenje izdojenim mlijekom te je kroz neko vrijeme potrebna i kombinacija dojenja i izdajanja. Od darivateljica u ovom istraživanju, njih 25 % je isključivo izdajalo mlijeko i na taj način hranilo vlastitu djecu (Tablica 4.). U prve 4 godine rada banke 18,6 % darivateljica na taj je način hranilo vlastitu djecu. Neke majke se i nakon novorođenačkog razdoblja hranjenja izdojenim mlijekom odluču tako nastaviti, među njima i nekolicina darivateljica s velikom količinom viška mlijeka. Prema Moossavi i suradnicima, način hranjenja je ključna odrednica sastava HMM-a (42). Majčino mlijeko izdajano posredstvom izdajalice je manje raznolikosti, a ima veću zastupljenost potencijalnih patogena i manju zastupljenost bifidobakterija (42). Skupina darivateljica u ovom istraživanju koja je isključivo izdajala imala je kraće trajanje gestacije, što je očekivano,

jer majke koje su rodile prije termina teško mogu odmah uspostaviti dojenje. U skupini isključivog izdavanja također su niže temperature zamrzivača u odnosu na druge dvije skupine, što je za pretpostaviti i zbog pohrane veće količine mlijeka. Skupina uzoraka isključivo izdavanog mlijeka imala je najkraću pohranu u BHM-u između stvaranja mješavine i izolacije DNA. Mlijeko djece koja su hranjena isključivo izdojenim mlijekom imalo je statistički značajno više rodova *Staphylococcus*, *Enterococcus* i *Corynebacterium* u odnosu na druge dvije skupine (Tablica 17.). Mlijeka neposredno dojene djece imala su veću zastupljenost rodova *Streptococcus*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Leifsonia*, *Rothia*, *Escherichia*, a od manje zastupljenih rodova u dojenih je bilo statistički značajno više *Bacillus*, *Ochrobactrum*, *Sphingomonas*, *Leclercia*, *Gemella* i *Pantoea* (Tablica 17.). Rodovi *Streptococcus*, *Rothia* i *Gemella* su bakterije oralne mikrobiote djeteta i obilježje HMM dojene djece (25). Vrlo zanimljivo istraživanje kolega iz Italije na uzorcima majčinog mlijeka i fecesa kasne pretermanske novorođenčadi odnosno dojenčadi, čija se HMM i fekalna mikrobiota mijenjaju kako postepeno prelaze s hranjenja izdojenim mlijekom na direktno dojenje, također govori u prilog rodova *Streptococcus* i *Rothia* kao tipične oralne mikrobiote majčinog mlijeka dojene djece (127). To se dokazalo i u ovom istraživanju te su skupine uzoraka mlijeka darivateljica s duljom gestacijom, koje nisu primale antibiotike ili su primile samo profilaksu i koje su dojile, imale više tipično oralne mikrobiote u DHM-u (Tablice 10., 12.-15., 17.).

U istraživanju su pronađene i razlike u  $\alpha$ -raznolikosti među skupinama uzoraka podijeljenim prema načinu hranjenja (Tablica 28.). Uzorci DHM-a darivateljica koje su neposredno dojile imali su veću  $\alpha$ -raznolikost mjerama Faith PD i Observed features (Tablica 28., Slike 25. i 26.). Dojenje kao zlatni standard treba poticati kad god je to moguće, čime se regulira količina viška mlijeka, majka je manje ovisna o izdavanju, a utječe se i na mikrobiotu mlijeka. Djelokrug rada hrvatske BHM je i podrška laktaciji i dojenju, a ovaj rad i tome doprinosi.

Treći specifični cilj bio je ispitati povezanost sastava bakterijske mikrobiote darovanog mlijeka s obilježjima mlijeka.

Prema talijanskoj pilot studiji, postoje razlike između mikrobiote pretermanskog MM-a i DHM-a, autori pretpostavljaju zbog prijevremenog poroda i pasterizacije (40). Porod prije termina ne znači nužno i darivanje pretermanskog mlijeka, rijetke su majke koje uspiju uspostaviti laktaciju sa suviškom mlijeka nakon preuranjenog poroda. Pretermansko mlijeko je dragocjeno i po svom sastavu bliže potrebama najčešćih

primatelja mlijeka. U ovo istraživanje uključeno je 7 uzoraka preterminskog mlijeka te je među njima i skupinom terminskog mlijeka nađena statistički značajna razlika u zastupljenosti pojedinih rodova bakterija. Preterminsko mlijeko imalo je veću zastupljenost bakterija iz rodova *Staphylococcus* i *Enterococcus*, a manju zastupljenost rodova *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Rothia*, *Elizabethkingia*, *Pantoea* i *Citrobacter* (Tablica 20.). Bakterije iz roda *Enterococcus* su novi potencijalni probiotici pa je utoliko nalaz ovog istraživanja zanimljiviji (35, 51).

Darivateljice izdaju višak mlijeka na način koji njima odgovara, BHM ne uvjetuje način izdavanja ili vrstu izdajalice, ako se koristi, nego samo održavanje higijene i pridržavanje uputa koje dobiju prije početka darivanja. Ako nemaju vlastitu, od BHM-a mogu na trajno korištenje dobiti mehaničku izdajalicu.

U do sada objavljenim istraživanjima način izdavanja nije posebno istican kao mogući utjecaj na sastav HMM-a. Darivateljice BHM-a izdajale su uglavnom posredstvom izdajalice, električne ili mehaničke, njih ukupno 87,5 % (Tablica 5.). U manjem broju (12,5 %) su izdajale ručnom tehnikom – bez posredstva izdajalice, odnosno pasivnim prikupljanjem u kolektor (Tablica 5.). Skupine uzoraka mlijeka podijeljene prema načinu izdavanja razlikovale su se u trajanju gestacije i pohrani u Banci nakon stvaranja mješavine. Uzorci mlijeka koje je izdajano ručno bili su od majki koje su rodile u terminu, odnosno kasnijim tjednima gestacije te su se razlikovali po većoj zastupljenosti rodova *Ralstonia*, *Rothia*, *Ochrobactrum*, *Gemella* i *Pantoea* od uzoraka skupljenih drugim metodama (Tablica 17.). Za pretpostaviti je da je zastupljenost bakterijskih rodova koji su tipičniji za zrelo i terminsko mlijeko veća među ručno izdojenim uzorcima zbog tjedana gestacije na porodu, tjedana laktacije i neposrednog dojenja. Sve darivateljice koje su ručno izdajale ujedno su i dojile vlastitu djecu. Ručno izdavanje je najekološkiji i najlakši način prikupljanja viška mlijeka te ima bolje mikrobiološke kriterije kvalitete (102, 128). Uzorci DHM-a izdojeni ručnom tehnikom izdavanja imali su i veću  $\alpha$ -raznolikost mjerom Faith PD (Tablica 28., Slike 27. i 28.).

U ovom istraživanju skupine uzoraka mlijeka podijeljene na pohranu u bočicama i vrećicama razlikovale su se po tjednima gestacije, tjednima laktacije i količini proteina. Darivateljice koje su rodile u ranijim tjednima gestacije i imale su viška mlijeka ubrzo nakon poroda, počele su ga odmah izdajati i zamrzavati za vlastite potrebe u vrećice koje su imale na raspolaganju i to je mlijeko imalo više proteina (Tablica 21.). Skupine uzoraka mlijeka razlikuju se po zastupljenosti bakterija, u vrećicama je više roda *Staphylococcus*, a manje rodova *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Ralstonia*, *Leifsonia* i



*Rothia* u odnosu na bočice (Tablica 21.). Vrsta spremnika u literaturi nije do sada objavljena kao čimbenik utjecaja na sastav HMM-a, pretpostavljamo da razlike koje su nađene ovim istraživanjem možemo pripisati kraćem trajanju gestacije i ranijoj dobi u vrijeme laktacije.

Duljina i temperatura pohrane mlijeka opisivani su u literaturi kao čimbenici koji mogu utjecati na sastav i vijabilnost HMM-a, sa zaključcima o najboljoj očuvanosti mikrobioma na temperaturama od -80 °C, kada izolacija iz svježih uzoraka mlijeka nije moguća (128, 129). Uobičajena pohrana u kućnim uvjetima podrazumijeva temperature od -20 °C, dok je u bolničkim uvjetima to -30 °C. Tijekom ovog istraživanja nije bilo uvjeta za pohranu mlijeka na -80 °C, iako bi ona bila idealna i dugotrajnije bi se moglo očuvati mlijeko u odnosu na mikrobiom i prehrambene vrijednosti (129, 130). Istražuju se i aditivne otopine za prezervaciju HMM-a i bakterijske DNA u uzorcima (131). U ovom istraživanju dobiveno je više statistički značajnih rezultata koji se odnose na duljinu i uvjete pohrane.

Darovano mlijeko koje je dulje bilo čuvano u kućnim uvjetima imalo je veću zastupljenost rodova *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* i *Leifsonia* i drugih manje zastupljenih rodova, a manju zastupljenost roda *Enterococcus* (Tablica 22.). Temperatura pohrane u kućnim uvjetima u domu darivateljice bila je poznata za 66 uzoraka, za gotovo svo DHM u vrećicama nemamo podatak o prosječnoj temperaturi pohrane (Tablica 20., 21.). Što je temperatura kućnog zamrzivača bila niža, veća je zastupljenost rodova *Comamonas*, *Leclercia* i *Elizabethkingia* (Tablica 22.). Darovano mlijeko koje je dulje bilo pohranjeno u BHM-u do izrade mješavine, odnosno pasterizacije, imalo je veću zastupljenost bakterija iz rodova *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Leifsonia* i nekih manje zastupljenih rodova, a manje roda *Citrobacter* (Tablica 23.). Kraća pohrana na -30 °C nakon stvaranja mješavine značila je u uzorcima DHM-a veću zastupljenost rodova *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* i drugih, a dulja pohrana korelirala je pozitivno sa zastupljenošću rodova *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Rothia* i drugih (Tablica 23.). Koncentracija DNA bila je statistički značajno veća u uzorcima koji su dulje bili pohranjeni u BHM-u (Tablica 23.), što se može objasniti i lizom stanica tijekom pohrane (129).

Osim mikrobiološke kontrole kvalitete svake mješavine mlijeka, određuje se i prehrambena vrijednost mlijeka, što neonatolozima i drugim pedijatrima olakšava računanje kalorijskog unosa i potreba u primatelja mlijeka. Prema studiji kolega iz Španjolske, koncentracija laktoze u majčinom mlijeku negativno je korelirala sa

zastupljenošću rodova *Enterobacter* i *Actinomyces*, a koncentracija masti pozitivno sa zastupljenošću *Staphylococcus* (8). U uzorcima DHM-a koji su imali veću količinu masti, proteina i veće kalorijske vrijednosti, bilo je također više roda *Staphylococcus* (Tablice 24. i 25.). Mlijeko s manjom razinom proteina imalo je veću zastupljenost rodova *Lactobacillus*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Acidithiobacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Leifsonia* i *Rhizobium*. Uzorci DHM-a od darivateljica s kraćim trajanjem gestacije imali su više masti i proteina, veću kalorijsku vrijednost te više roda *Staphylococcus* (Tablica 15.).

Usporedbom nalaza mikrobioloških kultura sirovog mlijeka s nalazom izoliranih rodova bakterija metodom NGS dobiveni su zanimljivi i djelomično neočekivani rezultati (Tablica 27.). NGS je skupa metoda i nije dostupna ni primjenjiva u svakodnevnom radu. Nasađivanje na KA je rutinska metoda koja se koristi u kontroli nalaza mlijeka prije i poslije pasterizacije. Selektivne kulture TOS i MRS su dostupnije od NGS-a i mogu doprinijeti saznanju o vijabilnosti BMK-a, odnosno potencijalno probiotičkih bakterija u uzorcima mlijeka. U ovom istraživanju uzorci DHM-a s većim brojem bakterijskih kolonija poraslih na KA-u imali su i veću zastupljenost roda *Staphylococcus*, a manju zastupljenost rodova *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Rothia* i drugih. Pozitivna anaerobna kultura na selektivnoj podlozi TOS očekivano je pozitivno korelirala sa zastupljenošću roda *Bifidobacterium*, dok je pozitivna kultura na podlozi MRS neočekivano negativno korelirala sa zastupljenošću roda *Lactobacillus*.

Posljednji cilj istraživanja bio je identificirati mlijeko koje bi prema zastupljenosti bakterija iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* bolje odgovaralo prijevremeno rođenoj djeci s ciljem personalizacije prehrane.

Prema prethodno objavljenim istraživanjima, u 40 % uzoraka majčinog mlijeka nalaze se bakterije iz roda *Bifidobacterium*, a taj rod je najzastupljenija bakterija u crijevima dojenčadi (132, 133). Rod *Bifidobacterium* nalazimo u fekalnoj mikrobioti dojene djece u većem broju nego u djece hranjene dojenačkim mliječnim pripravkom (24). U ovom istraživanju NGS metodom su u 62 (70 %) uzorka (Tablica 9.) detektirane bakterije roda *Bifidobacterium*, a u 27 (30,7 %) uzoraka (Slika 14.) zabilježen je porast bifidobakterija na selektivnoj podlozi. NGS-om se detektiraju i bakterije koje nisu vijabilne i kao takve mogu djelovati korisno na probavni i imunološki sustav primatelja mlijeka (105,106). U istraživanju Hermansson i suradnika, mjesec dana nakon intraportalne primjene antibiotika u mlijeku majki nisu pronađene bifidobakterije (45). U ovom istraživanju i među darivateljicama koje su primale antibiotike i kao profilaksu

i kao terapiju i darivale u prva 4 tjedna nakon poroda, detektirane su bifidobakterije. Pozitivna selektivna kultura za bifidobakterije, TOS agar, korelirala je pozitivno i sa zastupljenošću roda *Bifidobacterium* te bi mogla poslužiti kao povoljnija predikcija zastupljenosti tih BMK u mlijeku. Prema istraživanjima, bifidobakterije su češće nađene u mlijeku žena nakon vaginalnog poroda i u svim fazama laktacije nakon terminskog poroda, a broj im raste kroz razdoblje laktacije (36). U ovom istraživanju nije nađena povezanost tjedana gestacije ni laktacije sa zastupljenošću bifidobakterija. Do sada objavljene studije pokazale su proturječne rezultate u pogledu povezanosti načina poroda i zastupljenosti rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (35, 38-41). U ovom istraživanju nisu pronađene razlike u zastupljenosti rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* u odnosu na način poroda ni izloženost antibioticima među skupinama uzoraka DHM-a (Tablice 10., 13., 31.). Također, nije pronađena statistički značajna razlika u  $\alpha$  i  $\beta$ -raznolikosti bakterijske mikrobiote između skupina uzoraka ovisno o izloženosti antibioticima (Tablica 28., Slike 23., 24. i 29.). Ovi rezultati su ohrabrujući, jer su mnoge darivateljice, ali i majke nedonoščadi, iz različitih razloga izložene antibioticima. Prijevremeni porodi često završavaju carskim rezom što je samo po sebi „rizik“ za antibiotsku terapiju. Usporedbom terminskog i pretermanskog mlijeka po sastavu bakterija iz roda *Lactobacillus*, u ovoj su studiji vrijednosti blizu granice statističke značajnosti (Tablica 20.) u korist terminskog mlijeka.

U regresijskom modelu za pripadnost skupini uzoraka koji imaju oba probiotička roda bakterija u sastavu, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, kao značajni prediktori nađeni su način hranjenja i dani pohrane u BHM-u od stvaranja mješavine do izolacije DNA (Tablica 31.). Vrijeme pohrane značajan je prediktor i u druga dva regresijska modela, za predikciju pripadanja skupini koja ima zastupljen rod *Lactobacillus* odnosno samo *Bifidobacterium* (Tablica 32., 33.). Neočekivan prediktor u slučaju bifidobakterija je i dulja hrana u kućnim uvjetima (Tablica 32.). Kao prediktor za laktobacile statistički je značajna temperatura kućnog zamrzivača, za koju darivateljice dobivaju povratnu informaciju od djelatnika Banke ukoliko je potrebno i moguće podesiti na niže (Tablica 33.). Nalaz mlijeka prije pasterizacije također je značajan prediktor za pripadnost skupini s laktobacilima (Tablica 33.), a na taj se nalaz može donekle i utjecati pravovremenom edukacijom i po potrebi ponovnom edukacijom darivateljica o higijeni ruku, dojki i izdajalice.

Osnivanjem prve hrvatske BHM postignut je veliki napredak u skrbi za najugroženiju skupinu novorođenčadi. Darivateljice su plemenite žene koje izdvajaju svoje slobodno

vrijeme i daju najbolje od sebe kako bi pomogle drugima. Proces darivanja nije jednostavan i puno je čimbenika koji mogu utjecati na kvalitetu mlijeka i na zastupljenost HMM-a. Darivateljice u svojim domovima pohranjuju sirovo mlijeko i čine jako važnu kariku u lancu djelovanja BHM. Njihova dobra volja i višak mlijeka su temelj rada banke mlijeka.

Osnovna razlika između darovanog i majčinog vlastitog mlijeka je u obradi i načinu primjene. Istraživanje je provedeno na uzorcima sirovog DHM-a, prije pasterizacije, zbog učinka Holder pasterizacije na vijabilnost bakterija. Bilo bi zanimljivo usporediti uzorke DHM-a prije i nakon pasterizacije, kao što je učinjeno u nekim istraživanjima (107, 108). Također, bilo bi dobro vidjeti i mikrobiotu fecesa djece hranjene MM-om odnosno DHM-om. Darivateljice tijekom nekoliko dana ili tjedana prikupljaju višak mlijeka koji se spaja u mješavinu u BHM-u. Većina dosadašnjih studija o mikrobioti ljudskog mlijeka izolirala je bakterijsku DNA iz pojedinačno izdojenog MM-a, uključujući i majke darivateljice, a ne iz mješavine mlijeka napravljene u BHM-u.

Ovim se istraživanjem ispitivalo postoji li povezanost između obilježja darivateljica, djece i mlijeka i zastupljenosti bakterijske mikrobiote u DHM-u. Postoje obilježja na koja se ne može utjecati, kao što su dob majke, tjedni gestacije na porodu, način poroda, itd. Na dob djeteta u vrijeme izdavanja može se donekle utjecati, u smislu da se provodi aktivnija promidžba za što raniji početak darivanja. Obilježja na koja se donekle može utjecati, a ispitivana su u ovom istraživanju, su duljina i temperatura pohrane, primjena lijekova te nalaz mikrobiološke kulture prije pasterizacije. Na brojna obilježja se ne može utjecati, ali može se pretpostaviti da postoji veća vjerojatnost da neko mlijeko ima zastupljene pojedine rodove bakterija s obzirom na poznata obilježja. Svakako bi bilo dobro ponoviti istraživanje na većem broju uzoraka.

U budućnosti bi se također mogla planirati prospektivna studija ispitivanja povezanosti BMK-a u uzorcima DHM-a s konzumacijom pojedinih namirnica, primjerice fermentirane hrane.

Ako bi htjeli definirati „idealno mlijeko“ koje će imati i zadovoljavajuću prehrambenu vrijednost i bakterijsku mikrobiotu, to bi prema rezultatima ovoga istraživanja bila kombinacija mlijeka izdojenog u prva 4 tjedna nakon poroda ili pretermanskog mlijeka s terminskim mlijekom majke koja svoje dijete neposredno doji, izdaja ručno, ima manje bakterija u kulturi prije pasterizacije i koje je bilo kraće pohranjeno u Banci nakon stvaranja mješavine.

Proučavanje sastava bakterijske mikrobiote darovanog humanog mlijeka NGS metodom može imati važnost u osiguravanju zdravlja, poboljšanju prakse banaka mlijeka i unapređenju znanja o ulozi mikrobiote u ranom razvoju i zdravstvenim ishodima primatelja.

U Europi i svijetu broj i aktivnosti banaka mlijeka rastu zbog saznanja da prijevremeno rođena djeca pokazuju bolji napredak ako su hranjena humanim mlijekom umjesto dojenačkim mliječnim pripravkom (92). Djeca hranjena DHM-om imaju niži rizik za razvoj NEK-a i bolje podnose enteralno hranjenje (134). Vrlo je važno istaknuti da su, tamo gdje su ustanovljene BHM, veće stope dojenja, odnosno hranjenja MM-om na otpustu iz bolnica (135, 136). Hranjenje darovanim humanim mlijekom treba biti, ako je moguće, samo privremena opcija koja će premostiti nedostatak MM-a, a uloga BHM-a je i poticati neposredno dojenje.

Glavno ograničenje istraživanja je veličina uzorka. Zbog raspodjele podataka uglavnom su korišteni neparametrijski testovi koji su manje precizni. Sekvencirana je regija V1-V3, što otežava usporedbu sa studijama koje koriste druge hipervarijabilne regije gena 16s rRNA za sekvenciranje. Ograničenje metode neovisne o kulturi kao što je NGS je nepoznavanje vijabilnosti izoliranih bakterija.

## 7. ZAKLJUČAK

1. Nisu pronađene razlike u zastupljenosti rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* u odnosu na način poroda ni izloženost antibioticima među skupinama uzoraka DHM-a.
2. Obilježja majki koja su utjecala na sastav HMM-a darovanog mlijeka su dob, ITM i termin poroda. Zemljopisno područje stanovanja darivateljice, izloženost antibioticima i način poroda utjecali su na zastupljenost pojedinih rodova, ali pretpostavljamo zbog razlika skupina prema tjednima gestacije na porodu. U mlijeku majki koje su rodile u ranijim tjednima gestacije bilo je više bakterija iz roda *Staphylococcus*, a manje rodova *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Rothia* i drugih.
3. Obilježja djece koja su utjecala na sastav HMM-a su dob tijekom izdavanja i način hranjenja. Darovano mlijeko izdajano u ranijim tjednima laktacije imalo je statistički značajno više roda *Staphylococcus*, a u kasnijim tjednima više rodova *Lactobacillus*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Leifsonia*, *Veillonella*, *Gemella* i drugih. Mlijeko darivateljica koje su svoju djecu neposredno dojile imalo je veću  $\alpha$ -raznolikost mikrobiote te se razlikovalo prema sastavu HMM-a.
4. Obilježja mlijeka za koja je dokazana razlika u sastavu HMM-a su način izdavanja, duljina i temperatura pohrane te mikrobiološke kulture sirovog mlijeka. Uzorci mlijeka koje je izdajano ručno razlikovali su se od uzoraka prikupljenih drugim načinom po većoj zastupljenosti rodova *Ralstonia*, *Rothia*, *Ochrobactrum*, *Gemella* i *Pantoea* te većoj  $\alpha$ -raznolikosti. Kraća pohrana uzoraka mlijeka na  $-30$  °C povezana je s poželjnijim sastavom HMM-a. Uzorci DHM-a s većim brojem bakterijskih kolonija poraslih na KA imali su i veću zastupljenost roda *Staphylococcus*, a manju zastupljenost rodova *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Rothia* i drugih. Pozitivna anaerobna kultura na selektivnoj podlozi TOS pozitivno je korelirala sa zastupljenošću roda *Bifidobacterium*.
5. U regresijskom modelu za pripadnost skupini uzoraka koji imaju oba probiotička roda bakterija u sastavu – *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, kao značajni prediktori nađeni su način hranjenja i dani pohrane u BHM-u od stvaranja mješavine do izolacije DNA.

## 8. SAŽETAK

**Uvod:** Istraživanja su pokazala utjecaj različitih obilježja na sastav bakterijske mikrobiote humanog mlijeka (HMM), no nisu provedena na uzorcima iz mješavina darovanog humanog mlijeka (DHM).

**Cilj:** Cilj istraživanja bio je identificirati sastav bakterijske mikrobiote DHM-a te istražiti postoje li obilježja koja mogu utjecati na zastupljenost rodova pojedinih bakterija.

**Ispitanice i metode:** Iz arhivskih uzoraka mješavina DHM-a izolirana je bakterijska deoksiribonukleinska kiselina. Sekvenciranjem nove generacije određena je zastupljenost operativnih taksonomskih jedinica bakterija i uspoređena s poznatim obilježjima darivateljica, njihove djece i darovanog mlijeka.

**Rezultati:** U istraživanje je uključeno 88 uzoraka DHM-a od 88 darivateljica. U zastupljenosti bakterijskih rodova između skupina uzoraka podijeljenih prema načinu poroda i izloženosti antibioticima nije bilo značajnih razlika. Razlike su nađene s obzirom na tjedne gestacije na porodu i tjedne laktacije, način hranjenja majčinim mlijekom, način izdavanja viška mlijeka, broj bakterija kultiviranih u mlijeku prije pasterizacije te duljinu trajanja i temperaturu pohrane.

**Zaključak:** Dojenje djece te kraća pohrana na -30 °C u Banci ovim su se istraživanjem pokazali kao pozitivni prediktori za zastupljenost rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* kao dio bakterijske HMM-e u uzorcima mlijeka.

**Ključne riječi:** bakterija, mikrobiota, humano mlijeko, sekvenciranje nove generacije, dojenje, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*

## 9. SUMMARY

### **Composition of the bacterial microbiota of donated human milk Jurjana Novoselac, 2025.**

**Introduction:** Studies have shown the influence of different characteristics on the composition of the bacterial microbiota of human milk (HMM), they were not conducted on samples from pools of donated human milk (DHM).

**Aim:** The aim of the research was to identify the composition of the bacterial microbiota of DHM and to investigate whether there are characteristics that can influence the representation of certain bacterial genera.

**Subjects and methods:** Bacterial deoxyribonucleic acid was isolated from archival samples from pools of DHM. Using next generation sequencing, the representation of operational taxonomic units of bacteria was determined and compared with the known characteristics of donors, their children and DHM.

**Results:** 88 DHM samples were included in the research. There were no significant differences in the representation of bacterial genera between sample groups divided according to the mode of delivery and exposure to antibiotics. Differences were found regarding weeks of gestation at delivery and weeks of lactation, the method of feeding with breast milk, the method of expressing surplus milk, the number of bacterial colonies cultivated in milk before pasteurization, and the length of time and temperature of storage.

**Conclusion:** Breastfeeding of children and shorter storage at -30 °C in the human milk bank have been shown as positive predictors for the presence of the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* as part of bacterial HMM in milk samples.

**Key words:** bacteria, microbiota, human milk, next generation sequencing, breastfeeding, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*



## 10. POPIS LITERATURE

1. Mardešić D i sur. Pedijatrija. 7. izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 2003. str 241.
2. Kramer MS, Kakuma R. Optimal duration of exclusive breastfeeding. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2012, Issue 8. Art. No.: CD003517. Pristupljeno: 22.01.2024.
3. Chantry CJ, Eglash A, and Labbok M. ABM Position on Breastfeeding - Revised 2015. Breastfeeding Medicine. 2015.407-411.
4. WHO Guideline: Protecting, Promoting and Supporting Breastfeeding in Facilities Providing Maternity and Newborn Services. Geneva: World Health Organization; 2017. Executive summary. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK487814/>
5. Lawrence RA, Lawrence RM, Noble L, Rosen-Carole C, Stuebe AM. Breastfeeding A guide for the medical profession, 9. izdanje. Philadelphia: Elsevier; 2020.
6. Civardi E, Garofoli F, Tzialla C, Paolillo P, Bollani L, Stronati M. Microorganisms in human milk: lights and shadows. J Matern Fetal Neonatal Med. 2013;26:30-4.
7. Heikkilä MP, Saris PE. Inhibition of Staphylococcus aureus by the commensal bacteria of human milk. J Appl Microbiol. 2003;95:471-8.
8. Boix-Amorós A, Collado MC, Mira A. Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Macronutrients, and Human Cells during Lactation. Front Microbiol. 2016;7:492.
9. Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R i sur. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. Pharmacol Res. 2013;69:1-10.
10. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J i sur. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. Microbiol Mol Biol Rev. 2017;81:152.
11. Togo A, Dufour JC, Lagier JC, Dubourg G, Raoult D, Million M. Repertoire of human breast and milk microbiota: a systematic review. Future Microbiol. 2019;14:623-641.

12. Jiménez E, Fernández L, Maldonado A, Martín R, Olivares M, Xaus J i sur. Oral administration of lactobacilli strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Aug;74:4650-5.
13. West PA, Hewitt JH, Murphy OM. The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J Appl Bacteriol.* 1979;46:269–77..
14. Ruiz L, Bacigalupe R, García-Carral C, Boix-Amoros A, Argüello H, Silva CB i sur. Microbiota of human precolostrum and its potential role as a source of bacteria to the infant mouth. *Sci Rep.* 2019;9:8435.
15. Ramsey DT, Kent JC, Owens RA, Hartmann PE. Ultrasound imaging of milk ejection in the breast of lactating women. *Pediatrics.* 2004;113:361-367.
16. Rodríguez JM. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv Nutr.* 2014 Nov 14;5:779-84.
17. Lichtman SM. Bacterial translocation in humans. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001 Jul;33:1-10.
18. Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C. Vertical motherneonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ Microbiol.* 2014;16:2891-2904.
19. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012;486:207-14.
20. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med* 2016;8:51.
21. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C i sur. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464:59-65.
22. Antal I, Jelić M, Sila S, Kolaček S, Tambić Andrašević A. Ljudska mikrobiota i mikrobiom. *Acta Med Croatica.* 2019;73:3-11.
23. Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UM, Beck DL, Abdo Z i sur. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One.* 2011;6:e21313.
24. Zimmermann P, Curtis N. Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *J Infect.* 2020;81:17-47.

25. Stinson, LF, Sindi A, Cheema AS, Lai CT, Mühlhäusler BS, E Wlodek M i sur. The human milk microbiome: Who, what, when, where, why, and how? *Nutr. Rev.* 2020, 79, 529-543.
26. Kim D, Hofstaedter CE, Zhao C, Mattei L, Tanes C, Clarke E i sur. Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research. *Microbiome.* 2017;5:52.
27. Gupta V, Paul S, Dutta C. Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Front. Microbiol.* 2017;8:1162.
28. Banić, M. Potencijalne terapijske biomolekule probiotičkih sojeva autohtonih bakterija mliječne kiseline, doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb; 2021.
29. Biagi E, Quercia S, Aceti A, Beghetti I, Rampelli S, Turrone S i sur. The Bacterial Ecosystem of Mother's Milk and Infant's Mouth and Gut. *Front Microbiol.* 2017;8:1214.
30. Lackey KA, Williams JE, Meehan CL, Zachek JA, Benda ED, Price WJ i sur. What's Normal? Microbiomes in Human Milk and Infant Feces Are Related to Each Other but Vary Geographically: The INSPIRE Study. *Front Nutr.* 2019;6:45.
31. Fitzstevens JL, Smith KC, Hagadorn JI, Caimano MJ, Matson AP, Brownell EA. Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutr Clin Pract.* 2017;32:354-364.
32. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF i sur. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 2014;12:87.
33. Douglas CA, Ivey KL, Papanicolas LE, Best KP, Muhlhausler BS, Rogers GB. DNA extraction approaches substantially influence the assessment of the human breast milk microbiome. *Sci Rep.* 2020;10:123.
34. Sakwinska O, Moine D, Delley M, Combremont S, Rezzonico E, Descombes P i sur. Microbiota in Breast Milk of Chinese Lactating Mothers. *PLoS One.* 2016;11(8):e0160856.
35. Lyons KE, Ryan CA, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C. Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients.* 2020;12:1039.

36. Khodayar-Pardo P, Mira-Pascual L, Collado MC, Martínez-Costa C. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *J Perinatol.* 2014;34:599-605.
37. Urbaniak C, Angelini M, Gloor GB, Reid G. Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome.* 2016;4:1.
38. Li SW, Watanabe K, Hsu CC, Chao SH, Yang ZH, Lin YJ i sur. Bacterial Composition and Diversity in Breast Milk Samples from Mothers Living in Taiwan and Mainland China. *Front Microbiol.* 2017;8:965.
39. Cabrera-Rubio R, Mira-Pascual L, Mira A, Collado MC. Impact of mode of delivery on the milk microbiota composition of healthy women. *J Dev Orig Health Dis.* 2016;7:54-60.
40. Toscano M, De Grandi R, Peroni DG, Grossi E, Facchin V, Comberiat P i sur. Impact of delivery mode on the colostrum microbiota composition. *BMC Microbiol.* 2017;17:205.
41. Damaceno QS, Souza JP, Nicoli JR, Paula RL, Assis GB, Figueiredo HC i sur. Evaluation of Potential Probiotics Isolated from Human Milk and Colostrum. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2017;9:371-379.
42. Moossavi S, Sepehri S, Robertson, Bode L, Goruk S, Field CJ i sur. Composition and Variation of the Human Milk Microbiota Are Influenced by Maternal and Early-Life Factors. *Cell Host Microbe.* 2019;25:324-335.
43. Williams JE, Carrothers JM, Lackey KA, Beatty NF, York MA, Brooker SL i sur. Human Milk Microbial Community Structure Is Relatively Stable and Related to Variations in Macronutrient and Micronutrient Intakes in Healthy Lactating Women. *J Nutr.* 2017;147:1739-1748.
44. Solís G, de Los Reyes-Gavilan CG, Fernández N, Margolles A, Gueimonde M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe.* 2010;16:307-10.
45. Hermansson H, Kumar H, Collado MC, Salminen S, Isolauri E, Rautava S. Breast Milk Microbiota Is Shaped by Mode of Delivery and Intrapartum Antibiotic Exposure. *Front Nutr.* 2019;6:4.
46. Soto A, Martín V, Jiménez E, Mader I, Rodríguez JM, Fernández, L. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: Influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;59:78.

47. Thomas DW, Greer FR; American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition; American Academy of Pediatrics Section on Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics*. 2010;126:1217-31.
48. Martín V, Maldonado-Barragán A, Moles L, Rodríguez-Baños M, Campo RD, Fernández L i sur. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Hum Lact*. 2012;28:36-44.
49. Collins JK, Thornton G, O'Sullivan GO. Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal* 1998;8:487–90.
50. Notarbartolo V, Giuffrè M, Montante C, Corsello G, Carta M. Composition of Human Breast Milk Microbiota and Its Role in Children's Health. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2022;25:194-210.
51. Moubareck CA. Human Milk Microbiota and Oligosaccharides: A Glimpse into Benefits, Diversity, and Correlations. *Nutrients*. 2021;13:1123.
52. Turróni F, Milani C, Duranti S, Ferrario C, Lugli GA, Mancabelli L i sur. Bifidobacteria and the infant gut: an example of co-evolution and natural selection. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75:103-118.
53. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P i sur. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe*. 2015;17:690-703.
54. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG i sur. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;30:61-7.
55. Vatanen T, Franzosa EA, Schwager R, Tripathi S, Arthur TD, Vehik K i sur. The human gut microbiome in early-onset type 1 diabetes from the TEDDY study. *Nature*. 2018;562:589-594.
56. Arboleya S, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Solís G, Salminen S, de Los Reyes-Gavilán CG i sur. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast-milk. *Int J Food Microbiol*. 2011;149:28-36.
57. Henrick BM, Hutton AA, Palumbo MC, Casaburi G, Mitchell RD, Underwood MA i sur. Elevated Fecal pH Indicates a Profound Change in the Breastfed Infant

- Gut Microbiome Due to Reduction of Bifidobacterium over the Past Century. *mSphere*. 2018;3:e00041-18.
58. Taft D, Ho S, Tancredi D, Stephensen C, Hinde K, von Mutius E i sur. Population duration of breastfeeding and prevalence of Bifidobacterium longum subspecies infantis (OR01-01-19). *Curr Dev Nutr*. 2019;3.
  59. Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. 2012;22:1147-62.
  60. Morgan RL, Preidis GA, Kashyap PC, Weizman AV, Sadeghirad B; McMaster Probiotic, Prebiotic, and Synbiotic Work Group. Probiotics Reduce Mortality and Morbidity in Preterm, Low-Birth-Weight Infants: A Systematic Review and Network Meta-analysis of Randomized Trials. *Gastroenterology*. 2020;159:467-480.
  61. Blevins SM, Bronze MS. Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. *Int J Infect Dis*. 2010;14:e744-51.
  62. Hiergeist A, Gläsner J, Reischl U, Gessner A. Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing. *ILAR J*. 2015;56:228-40.
  63. Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, Fournier PE, La Scola B, Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28:237-64.
  64. Prescott LM, Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. 5ème edition. De Boeck Supérieur; Louvain-la-Neuve: 2018. Microbiologie.
  65. Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, Khelaifia S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect*. 2019;34:100622.
  66. Sandle, T. "History and development of microbiological culture media." *J Inst Sci Technol* (2011): 10-14.
  67. Collins CH, Lyne PM. 3rd ed. Arnold; London: 1970. Microbiological methods.
  68. De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar. *Progress in Industrial Microbiology*. 2003;37:511-513.
  69. Bunesova V, Musilova S, Geigerova M, Pechar R, Rada V. Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements. *J Microbiol Methods*. 2015;109:106-9.

70. Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *Br. J. Nutr.* 2013;110:1253–1262.
71. Sakwinska O, Bosco N. Host microbe interactions in the lactating mammary gland. *Front Microbiol.* 2019;10:18631876.
72. Wade W. Unculturable bacteria- the uncharacterized organisms that cause oral infections. *J R Soc Med.* 2002;95:81-3.
73. Browne HP, Forster SC, Anonye BO, Kumar N, Neville BA i sur. Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature.* 2016;533:543-546.
74. Sarangi AN, Goel A, Aggarwal R. Methods for Studying Gut Microbiota: A Primer for Physicians. *J Clin Exp Hepatol.* 2019;9:62-73.
75. Lopez Leyva L, Brereton NJB, Koski KG. Emerging frontiers in human milk microbiome research and suggested primers for 16S rRNA gene analysis. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020;19:121-133.
76. Chen XF, Hou X, Xiao M, Zhang L, Cheng JW, Zhou ML. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Analysis for the Identification of Pathogenic Microorganisms: A Review. *Microorganisms.* 2021;9:1536.
77. Jang KS, Kim YH. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. *J Microbiol.* 2018;56:209-216.
78. Payer-Pal M, Mareković I, Tambić Andrašević A. Smjernice za uzimanje, obradu i interpretaciju rezultata hemokultura. HDKM. 2021; <https://www.hdkm.hr/wp-content/uploads/2021/11/PRIJEDLOG-HDKM-smjernica-hemokulture.pdf>
79. Garner O, Mochon A, Branda J, Burnham CA, Bythrow M, Ferraro M i sur. Multi-centre evaluation of mass spectrometric identification of anaerobic bacteria using the VITEK(R) MS system. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014;20:335–339.
80. Štimac I, Martinković F. Uvod u tehnologije sekvenciranja novih generacija. *Hrvatski veterinarski vjesnik.* 2021;29(3).
81. MR DNA laboratory website [Internet]. What is 16s rRNA? [pristupljeno 07.03.2024.] <https://www.mrdnalab.com/what-is-16s-rna.html>
82. Martinez-Porchas M, Villalpando-Canchola E, Ortiz Suarez LE, Vargas-Albores F. How conserved are the conserved 16S-rRNA regions? *PeerJ.* 2017;5:e3036.

83. Martínez-Porchas M, Villalpando-Canchola E, Vargas-Albores F. Significant loss of sensitivity and specificity in the taxonomic classification occurs when short 16S rRNA gene sequences are used. *Heliyon*. 2016;2:e00170.
84. Jiménez E, de Andrés J, Manrique M, Pareja-Tobes P, Tobes R, Martínez-Blanch JF i sur. Metagenomic Analysis of Milk of Healthy and Mastitis-Suffering Women. *J Hum Lact*. 2015;31:406-15.
85. Asnicar F, Manara S, Zolfo M, Truong DT, Scholz M, Armanini F i sur. Studying Vertical Microbiome Transmission from Mothers to Infants by Strain-Level Metagenomic Profiling. *mSystems*. 2017;2:e00164-16.
86. Escobar-Zepeda A, Godoy-Lozano EE, Raggi L, Segovia L, Merino E, Gutiérrez-Rios RM i sur. Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics. *Sci Rep*. 2018;8:12034.
87. Hillmann B, Al-Ghalith GA, Shields-Cutler RR, Zhu Q, Gohl DM, Beckman KB i sur. Evaluating the Information Content of Shallow Shotgun Metagenomics. *mSystems*. 2018;3:e00069-18.
88. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M i sur. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(1):e1.
89. Jeurink PV, van Bergenhengouwen J, Jiménez E, Knippels LM, Fernández L, Garssen J i sur. Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microbes*. 2013;4:17-30.
90. National Cancer Institute website [Internet]. Bioinformatics Training and Education Program [pristupljeno 21.04.2024.]  
<https://bioinformatics.ccr.cancer.gov/docs/qiime2/Lesson5/>
91. Metagenomics Wiki website [Internet]. Alpha and Diversity [pristupljeno 23.06.2024.]  
<https://www.metagenomics.wiki/pdf/taxonomy/alpha-beta-diversity>
92. Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application, 5.izd., Europska uprava za kvalitetu lijekova i zdravstvenu skrb, EDQM, Strassbourg, 2022.
93. Mayerhofer E, Přibram E. Ernährungsversuche bei Neugeborenen mit konservierter Frauenmilch. *Wiener klin. Wochenschr*. 1909;22:26.
94. Kim J, Unger S. Human milk banking. *Paediatr Child Health*. 2010;15:595-602



95. WHO (World Health Organization)/UNICEF. Global strategy for infant and young child feeding. Report. Geneva: World Health Organization; 2003.
96. European Milk Bank Association (2024), internetska stranica: <https://europeanmilkbanking.com/>, [pristupljeno 10.03.2024].
97. Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano, internetska stranica: <https://rblh.fiocruz.br/rblh-em-numeros>, [pristupljeno 10.03.2024].
98. Human Milk Bank Association of North America (HMBANA), internetska stranica: <https://www.hmbana.org/find-a-milk-bank/overview.html>, [pristupljeno 10.03.2024].
99. Golubić Čepulić B, Novoselac J, Pavičić Bošnjak A, Leskovar I, Gojčeta K, Rimac V. Banka humanog mlijeka u Hrvatskoj: prva iskustva. Paediatr Croat. 2020;64:101-108.
100. Zakon o primjeni ljudskih tkiva i stanica. Narodne novine. 2012;144. <https://www.zakon.hr/z/555/Zakon-o-primjeni-ljudskih-tkiva-i-stanica>
101. Weaver G, Bertino E, Gebauer C, Grovslie A, Mileusnic-Milenovic R, Arslanoglu S i sur. Recommendations for the Establishment and Operation of Human Milk Banks in Europe: A Consensus Statement From the European Milk Bank Association (EMBA). Front Pediatr. 2019;7:53.
102. Novoselac J, Golubić Čepulić B, Kalenić B, Pavičić Bošnjak A. Influence of donor characteristics on the milk donation volume and microbiological quality of donated human milk in first 3 years of work of the Croatian human milk bank-retrospective observational study. J Perinat Med. 2024;52:351-359.
103. Schreiner C, Müller A, Dresbach T. Microbiological Screening of Donor Human Milk. Breastfeed Med. 2023;18:901-907.
104. Consales A, Cerasani J, Sorrentino G, Morniroli D, Colombo L, Mosca F i sur. The hidden universe of human milk microbiome: origin, composition, determinants, role, and future perspectives. Eur J Pediatr. 2022;181:1811-1820.
105. Deshpande G, Athalye-Jape G, Patole S. Para-probiotics for Preterm Neonates-The Next Frontier. Nutrients. 2018;10:871.
106. Stinson LF, Trevenen ML, Geddes DT. Effect of Cold Storage on the Viable and Total Bacterial Populations in Human Milk. Nutrients. 2022;14:1875.

107. García-González I, Corona-Cervantes K, Hernández-Quiroz F, Villalobos-Flores LE, Galván-Rodríguez F, Romano MC i sur. The Influence of Holder Pasteurization on the Diversity of the Human Milk Bacterial Microbiota Using High-Throughput DNA Sequencing. *J Hum Lact.* 2022;38:118-130.
108. Beghetti I, Barone M, De Fazio L, Laderchi E, Biagi E, Turrone S i sur. A Pilot Study on Donor Human Milk Microbiota: A Comparison with Preterm Human Milk Microbiota and the Effect of Pasteurization. *Nutrients.* 2022;14:2483.
109. Mallardi D, Tabasso C, Piemontese P, Morandi S, Silvetti T, Biscarini F i sur. Inoculation of mother's own milk could personalize pasteurized donor human milk used for feeding preterm infants. *J Transl Med.* 2021 Oct 9;19(1):420.
110. Stinson LF, Ma J, Lai CT, Rea A, Perrella SL, Geddes DT. Milk microbiome transplantation: recolonizing donor milk with mother's own milk microbiota. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2024;108:74.
111. Walker WA, Meng D. Breast Milk and Microbiota in the Premature Gut: A Method of Preventing Necrotizing Enterocolitis. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2020;94:103-112.
112. Davis JA, Baumgartel K, Morowitz MJ, Giangrasso V, Demirci JR. The Role of Human Milk in Decreasing Necrotizing Enterocolitis Through Modulation of the Infant Gut Microbiome: A Scoping Review. *J Hum Lact.* 2020;36:647-656.
113. Ganguli K, Walker WA. Probiotics in the prevention of necrotizing enterocolitis. *J Clin Gastroenterol.* 2011;45:S133-8.
114. Sharif S, Meader N, Oddie SJ, Rojas-Reyes MX, McGuire W. Probiotics to prevent necrotising enterocolitis in very preterm or very low birth weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2023, Issue 7. [Pristupljeno 23.06.2024.]  
[https://www.cochrane.org/CD005496/NEONATAL\\_probiotics-prevention-necrotising-enterocolitis-very-preterm-or-very-low-birth-weight-infants](https://www.cochrane.org/CD005496/NEONATAL_probiotics-prevention-necrotising-enterocolitis-very-preterm-or-very-low-birth-weight-infants)
115. Selma-Royo M, Calvo-Lerma J, Bäuerl C, Esteban-Torres M, Cabrera-Rubio R, Collado MC. Human milk microbiota: what did we learn in the last 20 years? *Microbiome Res Rep.* 2022;1:19.
116. Smith DM, Snow DE, Rees E, Zischkau AM, Hanson JD, Wolcott RD i sur. Evaluation of the bacterial diversity of pressure ulcers using bTEFAP pyrosequencing. *BMC Med Genomics.* 2010;3:41.

117. Argov-Argaman N, Mandel D, Lubetzky R, Hausman Kedem M, Cohen BC, Berkovitz Z i sur. Human milk fatty acids composition is affected by maternal age. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017;30:34-37.
118. Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr.* 2012;96:544-51.
119. Ding M, Qi C, Yang Z, Jiang S, Bi Y, Lai J i sur. Geographical location specific composition of cultured microbiota and *Lactobacillus* occurrence in human breast milk in China. *Food Funct.* 2019;10:554-564.
120. Bai J, Hu Y, Bruner DW. Composition of gut microbiota and its association with body mass index and lifestyle factors in a cohort of 7-18 years old children from the American Gut Project. *Pediatr Obes.* 2019;14:e12480.
121. Wang Y, Wang J, Yu D, Zou J, Zhang C, Yan H, Ye X, Chen Y. Microbial Community Structure of Colostrum in Women with Antibiotic Exposure Immediately After Delivery. *Breastfeed Med.* 2022;17:940-946.
122. Albesharat R, Ehrmann MA, Korakli M, Yazaji S, Vogel RF. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Syst Appl Microbiol* 2011;34:148–155.
123. Simpson MR, Avershina E, Storrø O, Johnsen R, Rudi K, Øien T. Breastfeeding-associated microbiota in human milk following supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* La-5, and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12. *J Dairy Sci.* 2018;101:889-899.
124. Gidrewicz DA, Fenton TR. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC Pediatr.* 2014;14:216.
125. Moles L, Escribano E, de Andrés J, Montes MT, Rodríguez JM, Jiménez E i sur. Administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two strains isolated from human milk, to very low and extremely low birth weight preterm infants: a pilot study. *J Immunol Res.* 2015;2015:538171.
126. Drago L, Toscano M, De Grandi R, Grossi E, Padovani EM, Peroni DG. Microbiota network and mathematic microbe mutualism in colostrum and mature milk collected in two different geographic areas: Italy versus Burundi. *ISME J.* 2017;11:875-884.

127. Biagi E, Aceti A, Quercia S, Beghetti I, Rampelli S, Turrone S i sur. Microbial Community Dynamics in Mother's Milk and Infant's Mouth and Gut in Moderately Preterm Infants. *Front Microbiol.* 2018;9:2512.
128. Jiménez E, Arroyo R, Cárdenas N, Marín M, Serrano P, Fernández L i sur. Mammary candidiasis: A medical condition without scientific evidence? *PLoS One.* 2017;12:e0181071.
129. Lyons KE, Fouhy F, O' Shea CA, Ryan CA, Dempsey EM, Ross RP i sur. Effect of storage, temperature, and extraction kit on the phylogenetic composition detected in the human milk microbiota. *Microbiologyopen.* 2021;10:e1127.
130. Stinson LF, Trevenen ML, Geddes DT. Effect of Cold Storage on the Viable and Total Bacterial Populations in Human Milk. *Nutrients.* 2022;14:1875.
131. Lackey KA, Williams JE, Price WJ, Carrothers JM, Brooker SL, Shafii B i sur. Comparison of commercially-available preservatives for maintaining the integrity of bacterial DNA in human milk. *J Microbiol Methods.* 2017;141:73-81.
132. Moossavi S, Azad MB. Origins of human milk microbiota: new evidence and arising questions. *Gut Microbes.* 2020;12:1667722.
133. Dalby MJ, Hall LJ. Recent advances in understanding the neonatal microbiome. *F1000Res.* 2020;9:F1000 Faculty Rev-422.
134. Quigley M, Embleton ND, McGuire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;7:CD002971.
135. Arslanoglu S, Moro GE, Bellù R, Turoli D, De Nisi G, Tonetto P i sur. Presence of human milk bank is associated with elevated rate of exclusive breastfeeding in VLBW infants. *J Perinat Med.* 2013;41:129-31.
136. Marinelli KA, Lussier MM, Brownell E, Herson VC, Hagadorn JI. The Effect of a Donor Milk Policy on the Diet of Very Low Birth Weight Infants. *J Hum Lact.* 2014;30:310-316.

## 11. ŽIVOTOPIS

Jurjana Novoselac rođena je 8. prosinca 1983. u Zagrebu. Osnovnu školu i Klasičnu gimnaziju pohađala je i završila u Zagrebu. Medicinski fakultet u Zagrebu upisuje 2002. te završava 2008. godine.

Od 2009. do 2011. godine radi kao znanstveni novak u Dječjoj bolnici Srebrnjak, kada upisuje poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo. Godine 2011. započinje specijalističko usavršavanje iz transfuzijske medicine u Kliničkom bolničkom centru Zagreb gdje 2015. godine postaje specijalist transfuzijske medicine i ostaje raditi u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju KBC-a Zagreb. Od osnivanja 2019. godine radi u Banci humanog mlijeka. Voditelj je Banke humanog mlijeka od 2024.

Godine 2018. pohađa i završava Međunarodni tečaj tkivnog bankarstva i naprednih terapija, a 2019. tečaj Suvremena saznanja o laktaciji i dojenju. Godine 2020. polaže ispit za Međunarodno certificiranog savjetnika za dojenje (IBCLC), a 2022. i 2023. godine pohađa i polaže tečaj iz ultrazvuka dojke.

Autor je nekoliko sažetaka, stručnih i znanstvenih članaka te je aktivno sudjelovala na brojnim stručnim i znanstvenim skupovima u zemlji i inozemstvu.

Članica je Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za transfuzijsku medicinu, Akademije medicine dojenja i Hrvatskog i europskog udruženja savjetnica za dojenje.

Svojim radom aktivno promiče dojenje i hranjenje humanim mlijekom kao hranom i lijekom.