

Utjecaj matične mliječi na višestruko rezistentne patogene gram negativne bakterije

Kosec, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:500486>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

UTJECAJ MATIČNE MLIJEČI NA VIŠESTRUKO
REZISTENTNE PATOGENE GRAM NEGATIVNE BAKTERIJE

DIPLOMSKI RAD

Monika Kosec

Zagreb, rujan, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Agroekologija – Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**UTJECAJ MATIČNE MLIJEČI NA VIŠESTRUKO
REZISTENTNE PATOGENE GRAM NEGATIVNE BAKTERIJE**

DIPLOMSKI RAD

Monika Kosec

Mentor:

Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka

Zagreb, rujan, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Monika Kosec**, JMBAG 0178116332, rođena 03.01.1999. u Varaždinu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**UTJECAJ MATIČNE MLIJEČI NA VIŠESTRUKO REZISTENTNE PATOGENE GRAM
NEGATIVNE BAKTERIJE**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Monike Kosec**, JMBAG 0178116332 , naslova

**UTJECAJ MATIČNE MLIJEČI NA VIŠESTRUKO REZISTENTNE PATOGENE GRAM
NEGATIVNE BAKTERIJE**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana

_____ .

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka mentor

2. Izv. prof. dr. sc. Lidija Svečnjak član

3. Prof. dr. sc. Marko Vinceković član

Zahvala

Ovime zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci koju su mi pružali tokom studiranja i pisanja diplomskog rada.

Veliko hvala prof. dr. sc. Mirni Mrkonjić Fuka na ukazanom povjerenju i mentorstvu. Posebno hvala Irini Tanuwidjaja, mag. ing agr., na vođenju kroz laboratorijski dio, nesebičnoj pomoći i savjetima pri pisanju ovoga rada, kao i Sandri Matijević, bacc. sanit. ing. koja je bila na raspolaganju kod pripreme svih reagensa potrebnih za provođenje ovog rada.

Također zahvaljujem se i Agenciji za plaćanje u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju koja je omogućila sredstva za ovaj rad u sklopu projekta „Detaljna analitička karakterizacija i antimikrobno djelovanje odabranih pčelinjih proizvoda na multirezistentne patogene bakterije“ (akronim: miCRObee).

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Hipoteza i ciljevi istraživanja.....	2
2. Pregled literature	3
2.1. Opće karakteristike <i>Klebsiella</i> spp. i <i>Acinetobacter</i> spp.	3
2.2. Antibiotička rezistencija bakterija.....	5
2.2.1. Antibiotička rezistencija <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
2.2.2. Antibiotička rezistencija <i>Acinetobacter baumannii</i>	7
2.3. Matična mliječ.....	9
2.3.1. Kemijska i fizikalna svojstva matične mliječi	9
2.3.2. Antimikrobno djelovanje matične mliječi	11
2.4. Metode određivanja antimikrobnog djelovanja	13
3. Materijali i metode.....	15
3.1. Kemikalije	15
3.2. Laboratorijski instrumenti.....	15
3.3. Pufferi, indikatorske otopine i hranjive podloge	16
3.4. Komplet za izolaciju genomske DNA.....	16
3.5. Molekularni reagensi, enzimi, markeri i početnice	17
3.6. Priprema uzoraka matične mliječi.....	17
3.7. Bakterijski sojevi.....	18
3.8. Izolacija genomske DNA <i>A. baumannii</i>	19
3.9. Genotipizacija izolata <i>A. baumannii</i> rep PCR metodom	20
3.10. Probir antimikrobne aktivnosti matične mliječi	21
3.11. Određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije matične mliječi	22

3.11.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije.....	22
3.11.2. Kontrola biomase.....	24
3.11.3. Validacija minimalne inhibitorne koncentracije i određivanje minimalne baktericidne koncentracije subkultivacijom.....	24
3.11.4. Statistička analiza podataka	25
4. Rezultati	26
4.1. Reprezentativni sojevi <i>A. baumannii</i>	26
4.2. Antibakterijsko djelovanje matične mliječi.....	27
4.3. MIK i MBK vrijednosti matične mliječi.....	32
5. Rasprava.....	37
6. Zaključci	39
7. Popis literature.....	40
8. Prilozi	47

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Monike Kosec**, naslova

UTJECAJ MATIČNE MLIJEČI NA VIŠESTRUKO REZISTENTNE PATOGENE GRAM NEGATIVNE BAKTERIJE

Cilj ovog rada je ispitati djelovanje matične mliječi prikupljene na području Republike Hrvatske prema višestruko rezistentnim sojevima *Klebsiella pneumoniae* i *Acinetobacter baumannii* izoliranim iz otpadnih voda. Metodom difuzije bunara u agaru kvalitativno je određena antibakterijska aktivnost matičnih mliječi te su mikrodilucijskom metodom određene minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije. Svi analizirani uzorci matičnih mliječi djeluju inhibitorno i baktericidno na sve ispitane sojeve, ali u različitim koncentracijama. Zone inhibicije rasta pokazuju da su sojevi *K. pneumoniae* otporniji na djelovanje matične mliječi od *A. baumannii* (*K. pneumoniae*: $11,8 \text{ mm} \pm 2,8 \text{ mm}$; *A. baumannii* $14,4 \text{ mm} \pm 3,8 \text{ mm}$, ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,001$). Koncentracija matične mliječi od $27,01 \text{ mg/mL} \pm 15,80 \text{ mg/mL}$ je djelovala baktericidno na sojeve *A. baumannii*, dok je za sojeve *K. pneumoniae* bila potrebna koncentracija od $120,44 \text{ mg/mL} \pm 98,34 \text{ mg/mL}$.

Ključne riječi: matična mliječ, antibakterijska aktivnost, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna baktericidna koncentracija (MBK)

Summary

Of the master's thesis – student **Monika Kosec**, entitled

THE INFLUENCE OF ROYAL JELLY ON MULTIRESTANT GRAM NEGATIVE PATHOGENIC BACTERIA

The aim of this work is to examine the action of royal jelly collected in the Republic of Croatia against multi-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* isolated from wastewater. The antibacterial activity of the royal jelly was qualitatively determined using the well diffusion method in agar, and the minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal (MBC) concentrations were determined using the microdilution method. All analyzed samples of royal jelly have an inhibitory and bactericidal effect on all tested strains, only in different concentrations. Zones of growth inhibition show that *K. pneumoniae* strains are more resistant to the action of royal jelly than *A. baumannii* (*K. pneumoniae*: 11,8 mm ± 2,8 mm; *A. baumannii* 14,4 mm ± 3,8 mm, ANOVA, Bonferroni test, $p < 0.001$). Concentration of royal jelly of 27,01 mg/mL ± 15,80 mg/mL had a bactericidal effect on *A. baumannii* strains, while *K. pneumoniae* strains required a concentration of 120,44 mg/mL ± 98,34 mg/mL.

Keywords: royal jelly, antibacterial activity, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

1. Uvod

Antibiotska rezistencija prisutna kod bakterija je ozbiljna prijetnja globalnom zdravlju. Najveći problem predstavljaju infekcije uzrokovane ESKAPE bakterijama. Akronim ESKAPE uključuje *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp., koje karakterizira virulentnost i otpornost na više klasa antibiotika, čime pripadaju u skupinu višestruko rezistentnih bakterija (engl. *Multi drug resistant bacteria* (MDR)) (Mulani i sur., 2019). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) uvrstila je ESKAPE patogene na popis bakterija za koje su hitno potrebni novi antibiotici. Na listu kritičnih prioriteta stavljeni su *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa* otporni na karbapeneme i β -laktame proširenog spektra, te *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter* spp. otporni na karbapeneme (Mancuso i sur., 2021). Broj višestruko rezistentnih bakterija rapidno se povećava kao posljedica zagađenja okoliša velikim količinama antibiotika koji se nekontrolirano ispuštaju iz proizvodnih pogona (Milaković, 2020) te prekomjerne upotrebe antibiotika u stočarstvu i medicini (López Romo i Quirós, 2019). Infekcije uzrokovane karbapenem rezistentnim *A. baumannii* i *K. pneumoniae* posebno su zabrinjavajuće jer karbapenemi predstavljaju zadnju liniju obrane za liječenje infekcija izazvanih *A. baumannii* i *K. pneumoniae* (CDC, 2019). Pojava i širenje karbapenemaza producirajućih enterobakterija (CPE; engl. *carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*) i acinetobaktera (CRA; engl. *carbapenem-resistant Acinetobacter*) značajno pridonosi povećanom oboljenju i smrtnosti pacijenata. (Glasner i sur., 2013). Zbog svega navedenog od izuzetne je važnosti pronaći alternativna rješenja za inhibiciju rasta ESKAPE patogena, kojima pripadaju karbapenem rezistentne Gram negativne bakterije *K. pneumoniae* i *A. baumannii*.

Matična mliječ je pčelinji proizvod poznat po korištenju u narodnoj i modernoj medicini te u kozmetici. Mliječ je izlučevina podždrijelne i prednjočeljusne žlijezde medonosnih pčela (*Apis mellifera* L.) koju one koriste za hranjenje matice i ličinki. Matična mliječ predstavlja potencijalni agens za suzbijanje rasta patogenih mikroorganizama te je dokazano njezino antibakterijsko djelovanje prema Gram negativnim i Gram pozitivnim bakterijama. Antibakterijsko djelovanje matične mliječi ponajviše se pripisuje peptidima Jelleine-I-III, proteinu rojalizinu, *trans*-10-hidroksi-2-dekanskoj kiselini i glavnim proteinima matične mliječi (MRJP; engl. *Major Royal Jelly Proteins*) te njihovom sinergističkom djelovanju (Oršolić 2013). Osim antibakterijskih svojstava, matičnu mliječ karakteriziraju snažna biološka svojstva i antitumorsko, protuupalno i antiseptičko djelovanje.

Istraživanja koja uključuju djelovanje matične mliječi na Gram negativne, karbapenem rezistentne *A. baumannii* i *K. pneumoniae* su nedostatna, a dosadašnja istraživanja ne uključuju antibakterijska svojstva matične mliječi s područja Republike Hrvatske. Stoga je u ovom radu ispitano *in vitro* djelovanje uzoraka matičnih mliječi sakupljenih s područja Republike Hrvatske na višestruko rezistentne patogene sojeve *K. pneumoniae* i *A. baumannii*

izolirane iz otpadnih voda. Za određivanje antibakterijskog djelovanja matičnih mliječi, provedena je metoda probira te je djelovanje kvantificirano mikrodilucijskom metodom pri čemu su određene minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK).

1.1. Hipoteza i ciljevi istraživanja

Hipoteza istraživanja:

Ispitivani uzorci matičnih mliječi djelovat će inhibitorno i baktericidno na sojeve patogenih, Gram negativnih karbapenem rezistentnih *K. pneumoniae* i *A. baumannii*, a učinak će ovisiti o vrsti bakterije i koncentraciji matične mliječi.

Opći cilj ovog istraživanja je ispitati antimikrobno djelovanje matičnih mliječi različitog botaničkog podrijetla, prikupljenih na području Republike Hrvatske, prema višestruko rezistentnim, Gram negativnim, patogenim sojevima *Klebsiella pneumoniae* i *Acinetobacter baumannii*, izoliranim iz otpadnih voda, te procijeniti potencijal matične mliječi za kontrolu bakterijskog rasta i suzbijanje uzročnika bolničkih infekcija. Lokacije uzorkovanja ispitivanih matičnih mliječi su: Konšćica, Zagrebačka županija (MM1, MM2); Petrovsko, Krapinsko-zagorska županija (MM3); Obrovac Sinjski, Splitsko-dalmatinska županija (MM4, MM5).

Specifični ciljevi rada:

1. Probir sojeva *A. baumannii* nakon izolacije DNA te određivanje unutarvrzne varijabilnosti rep-PCR metodom.
2. Kvalitativno utvrditi pokazuju li prikupljeni uzorci matičnih mliječi inhibitorno djelovanje prema višestruko rezistentnim bakterijama *K. pneumoniae* i *A. baumannii*.
3. Odrediti minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) uzoraka matične mliječi.

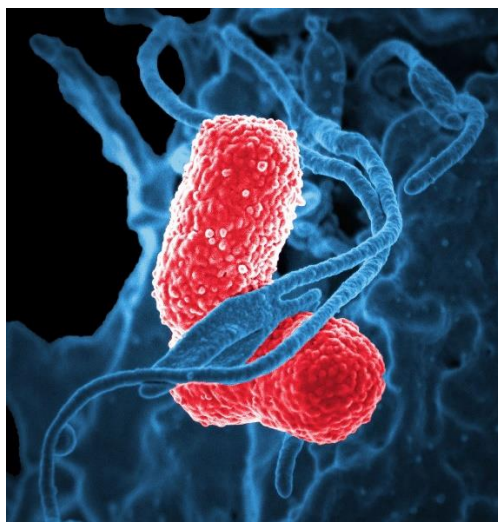
2. Pregled literature

2.1. Opće karakteristike *Klebsiella* spp. i *Acinetobacter* spp.

Rod *Klebsiella* spp. su nepokretne Gram negativne štapićaste bakterije prekrivene sluzavim polisaharidnim omotačem koji ih razlikuje od ostalih rodova iz porodice *Enterobacteriaceae*. Sojevi vrste *K. pneumoniae* su fakultativni anaerobi koji posjeduju respiracijski i fermentacijski metabolizam. Energiju dobivaju oksidacijsko-redukcijskim reakcijama kojima je donor elektrona organski spoj. Većina sojeva fermentacijom šećera proizvode kiseline i plin te su oksidaza-negativni i katalaza-pozitivni (Brenner i sur., 2015). *K. pneumoniae* može preživjeti na temperaturama od 5 - 45 °C te pH od 7 do 10 što ukazuje na tolerantnost alkalne sredine, ali ne i kisele (Ajayasree i Borkar, 2018).

K. pneumoniae (slika 2.1.1.) može formirati biofilm, polimer složene strukture građen od polisaharida, proteina i DNA. Biofilm inhibira blizinu antitijela i antimikrobnih tvari kao što su peptidi, te smanjuje učinke fagocitoze (Wang i sur., 2020). Martin i Bachman (2018) podijelili su sojeve *K. pneumoniae* u tri tipa: oportunistički, hipervirulentni i višestruko rezistentni. Do sad su identificirana četiri virulentna čimbenika; pili, kapsula, lipopolisaharidi (LPS) i ionofori (Shon i sur., 2013).

Sojevi *K. pneumoniae* su prirodno rasprostranjeni na površini sluznice kod životinja i u okolišu, kao što su voda i tlo. Kod ljudi, *K. pneumoniae* je prisutna u gastrointestinalnom traktu, ali ako uđe u krvotok ili druga tkiva može uzrokovati infekcije mokraćnog sustava, bakterijemiju, upalu pluća i/ili apsces jetre (Wang i sur., 2020). Infekcije koje uzrokuju karbapenemaza producirajuće *K. pneumoniae* imaju visoku stopu mortaliteta. Kliničari koji liječe infekcije uzrokovane ovim sojevima susreću se s brojnim poteškoćama, poput suženog izbora djelotvornih antibiotika, manjka podataka o djelotvornosti pojedinih antibiotika te rizika od mogućeg toksičnog učinka. Antibakterijska terapije za liječenje navedenih infekcija često je ograničena na polimiksine i tigeciklin, antibiotike koji imaju određena ograničenja (Bubonja-Šonje i Abram, 2014).



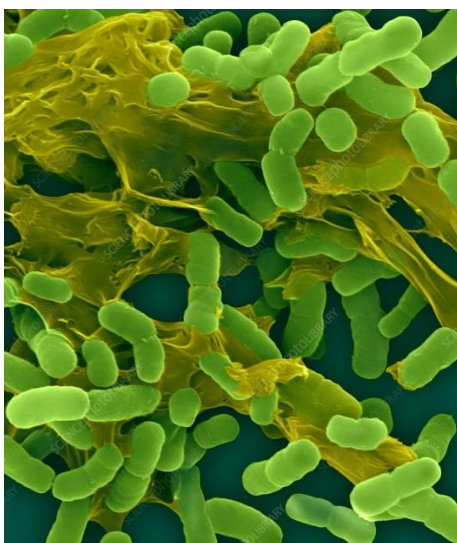
Slika 2.1.1. Izgled stanica *Klebsiella pneumoniae* dobivenih skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM).

Izvor: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=18170>

Acinetobacter spp. su Gram negativne bakterije iz porodice *Moraxellaceae*, sveprisutne u prirodi. *A. baumannii* je aeroban, nepokretan i kratak kokobacil, katalaza-pozitivan i oksidaza-negativan. Isto kao i *K. pneumoniae* ima sposobnost formiranja biofilma koji umanjuje djelovanje antimikrobnih tvari na samu bakteriju. Dobro raste na čvrstim podlogama koje se rutinski koriste u kliničkim mikrobiološkim laboratorijima, poput ovčjeg krvnoga agara ili TSA (triptični sojin agar), na temperaturi od 37°C. Na podlogama formiraju glatke, ponekad sluzave, sivkasto bijele kolonije (Rahal i Urban, 2000).

Prirodni izvori *A. baumannii* su tlo, povrće i vodeni ekosustavi (Turton i sur., 2006), dok je porijeklo višestruko rezistentnih sojeva bolničko okruženje (Rahal i Urban, 2000). Većina provedenih istraživanja pronašla je višestruko rezistentne sojeve na koži bolesnih ljudi, na koži medicinskog osoblja (Chu i sur., 1999., prema Peleg i sur., 2008) te u fecesu bolesnih životinja (Francey i sur., 2000).

Berlau i sur. (1999). su proveli istraživanje na povrću u Ujedinjenom Kraljevstvu i pronašli različite vrste roda *Acinetobacter*, uz *A. baumannii* kao dominantnu vrstu. Houang i sur. (2001) analizirali su tlo na području Hong Konga te su u 22 uzorka od njih 60 pronašli *A. baumannii*. *A. baumannii* (slika 2.1.2.) je rijetko dio normalne mikrobiote kože (Seifert i sur., 1997., prema Jain i sur., 2021.), ali ulaskom u ljudski organizam uzrokuje bakterijemiju, meningitis i upalu pluća (Howard i sur., 2012). Infekcije uzrokovane sojevima *A. baumannii* povezane su sa stopama smrtnosti od čak 52% u bolesnika s bakterijemijom i 23-73% u onih s upalom pluća (Jain i Danziger, 2004).



Slika 2.1.2. Izgled stanica *Acinetobacter baumannii* dobivenih skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM).

Izvor: <https://www.sciencephoto.com/media/799162/view>

2.2. Antibiotička rezistencija bakterija

Antibiotička rezistencija bakterija rezultat je dviju osnovnih rezistencija, intrinzične i stečene. Intrinzična ili urođena rezistencija uključuje vertikalni prijenos gena od roditelja na potomstvo te je zajednička unutar bakterijske vrste. Neovisna je o prethodnoj izloženosti antibioticima i nije povezana s horizontalnim prijenosom gena (Martinez, 2014). Stečena rezistencija predstavlja horizontalni prijenos gena između različitih vrsta mikroorganizama te mutacije unutar njih samih (Kristich i sur., 2014). Tri osnovna mehanizma u horizontalnom prijenosu gena kod bakterija uključuju transformaciju, transdukciju i konjugaciju (Yutin, 2013). Transformacija podrazumijeva unos slobodne DNA iz okoline kroz staničnu membranu u bakteriju, transdukcija se provodi pomoću bakteriofaga koji unosi stranu DNA u bakterijsku stanicu dok konjugacija podrazumijeva prijenos genetskih elemenata pomoću pili struktura između dvije susjedno locirane bakterije. Horizontalni prijenos gena, zajedno s mutacijama kontinuirano dovodi do novih bakterijskih genotipova (Thomas i Nielsen, 2005), stoga česta upotreba antibiotika, naročito širokog spektra, utječe na pojavu višestruko rezistentnih bakterija.

Višestruko rezistentne bakterije na antibiotike koriste nekoliko različitih mehanizama koji djeluju istovremeno. Među najvažnije mehanizme ubrajaju se proizvodnja enzima koji modificiraju antibiotik, smanjenje permeabilnosti vanjske membrane, sinteza ribonukleinske

kiseline (RNA), deoksiribonukleinske kiseline (DNA), proteina ili komponenata stanične stijenke koje zaobilaze antibiotik te posljednji mehanizam, aktivno izbacivanje antibiotika iz stanice poznato kao efluks pumpa (Wright, 2016).

2.2.1. Antibiotička rezistencija *Klebsiella pneumoniae*

Sojevi *K. pneumoniae* imaju širok spektar antibiotičke rezistencije od kojih su najvažnija otpornost na β -laktame, polimiksine, aminoglikozide, kinoline i tigeciklin (Magiorakos i sur. 2012., prema Aminul i sur., 2021).

β -laktamski antibiotici se klinički koriste od 1940-ih i predstavljaju glavnu skupinu antimikrobnih lijekova među koje pripadaju cefalosporini i cefamicini (cefemi), karbacefemi, penicilini, klavami, karbapenemi i monobaktami (Bush i Bradford, 2016). Najvažniji β -laktamski antibiotici širokog spektra su karbapenemi, tradicionalno smatrani prvom linijom obrane protiv najtežih infekcija uzrokovanih otpornim sojevima Gram negativnih bacila (Bubonja-Šonje i Abram, 2014). Od tada, različiti β -laktamaza patogeni su evoluirali u intestinalnom traktu, a broj je prilično alarmantan i raznolik (Bush, 2010). Antimikrobni učinak ostvaruju vezanjem na različite proteine koji vežu penicilin (engl. *penicillin binding protein*; PBP), sprječavajući tako sintezu peptidoglikana i dovodeći do lize bakterijske stanice. Najvažniji mehanizam otpornosti na β -laktamske antibiotike je proizvodnja enzima β -laktamaza proširenog spektra (engl. *extended spectrum β -lactamases*; ESBL). Sve veća učestalost infekcija uzrokovanih enterobakterijama koje proizvode ESBL dovela je do povećane upotrebe karbapenema kao antibiotika posljednje linije obrane u liječenju ovih infekcija (Bubonja-Šonje i Abram, 2014). Zabrinjava činjenica brzog širenja višestruko rezistentnih sojeva *K. pneumoniae* koji proizvode plazmidima kodirane karbapenemaze što pridonosi povećanoj smrtnosti pacijenata (Yigit i sur., 2001).

Polimiksin E (kolistin) i polimiksin B su kationski polipeptidni antibiotici koji prekidaju membrane bakterijske stanice. Polimiksini pokazuju *in vitro* djelotvornost protiv većine karbapenemaza producirajućih sojeva, s iznimkom prirodno otpornih vrsta, kao što su *Morganella*, *Providencia*, *Proteus* i *Serratia* (Bubonja-Šonje i Abram, 2014). Glavni mehanizam rezistencije na polimiksin *K. pneumoniae* je ciljana modifikacija kromosomskim mehanizmom, poznatom kao "LPS modifikacijski sustav". Sojevi s ovim sustavom mogu promijeniti strukturu LPS-a i uzrokovati redukciju negativnog iona utječući na vezanje polimiksina (Navon-Venezia i sur., 2017). U prošlosti je upotreba polimiksina bila ograničena, no pojava višestruko rezistentnih sojeva obnovila je interes za vraćanje polimiksina u kliničku upotrebu. Klinička učinkovitost polimiksina u liječenju pneumonija je nepredvidiva, što zbog rezistencije prisutne u *K. pneumoniae*, što zbog slabog prodora lijeka u tkivo pluća i različitih nuspojava. Najteža nuspojava je nefrotoksičnost koja se javlja u 10 – 15 % slučajeva i u većini je slučajeva prolazna.

Novija su istraživanja doprinijela poboljšanju farmakoloških osobina lijeka te su prilagođene doze koje se danas primjenjuju u terapiji čime je povećana djelotvornost i sigurnost primjene polimiksina (Falagas i Rafailidis, 2009). Dakako uz ova poboljšanja lijeka treba uzeti u obzir neprestani rast stope otpornosti na polimiksine koja se javlja u *K. pneumoniae* (Young-Mi i sur., 2014).

Aminoglikozidi mogu inhibirati sintezu proteina bakterija te su bili korišteni kao antibakterijska kemoterapija u razdoblju 1940. - 1980., sve dok ih nisu zamijenili karbapenemi, cefalosporini i fluorokinoloni (Krause i sur., 2016). Tijekom tog razdoblja, *K. pneumoniae* je postigla mehanizme antibiotske rezistencije, uključujući enzime koji modificiraju lijekove (adenilacija, acetilacija ili fosforilacija). Geni za otpornost *aac*, *aph* i *ant* posredovani plazmidom su pronađeni u *K. pneumoniae*. Smanjena upotreba aminoglikozida je usporila evoluciju novih rezistentnih gena sve dok se nije pojavila 16SrRNA metilaza, koja kodira enzim koji blokira vezanje aminoglikozidnih antibiotika na 16SrRNA (Doi i sur., 2016)

Kinolonski antibiotici djeluju na bakterijske topoizomerase kako bi inhibirali replikaciju DNA (Hooper i Jacoby, 2016). Ovi antibiotici se klinički primjenjuju od 1960-ih, ali najviše su bile primjenjivane prve klase fluorokinolona što je dovelo do antibiotske rezistencije među vrstama roda *Enterobacteriaceae* (Naeem i sur., 2016). Mehanizam rezistencije *K. pneumoniae* na fluorokinolone uglavnom uključuje mutaciju ciljnog gena, proizvodnju efluks pumpe te modifikaciju enzima i proteina. Za ciljanu zaštitu, PMQR gen smatra se jedinim genom u *K. pneumoniae*, koji je odgovoran za modifikaciju kinolona, a kodiran je plazmidom *K. pneumoniae* (Redgrave i sur., 2014).

Tigeciklin je prva generacija glicilciklina koji se koristi za liječenje infekcija *K. pneumoniae* (Livermore, 2005). Tigeciklin je obećavajući lijek s antibakterijskim djelovanjem širokog spektra, a učinkovit je i za sojeve koji posjeduju gene za proizvodnju β -laktamaza proširenog spektra djelovanja (Golan, 2015). Ubrzo nakon prve uporabe, izoliran je *K. pneumoniae* MDR soj smanjene osjetljivosti na tigeciklin (Ruzin i sur., 2005). Poznati mehanizmi tolerancije na tigeciklin su kromosomski kodirani, uključujući modifikacije 30S i 16S ciljne jedinice ribosoma, kao i promjene u permeabilnosti stanica.

2.2.2. Antibiotička rezistencija *Acinetobacter baumannii*

Rod *Acinetobacter* posjeduje širok raspon mehanizama otpornosti na antimikrobne tvari. Većina sojeva *A. baumannii* je otporna na peniciline, aminoglikozide, β -laktame i u novije vrijeme fluorokinolone (Jain i Danziger, 2004).

Rapidna pojava otpornosti kod *A. baumannii* na sve β -laktame, posebice karbapeneme ukazuje na potencijal ovog mikroorganizma da brzo reagira na promjene pritiska okoline. Podatci o genetskoj kompetenciji *A. baumannii* pokazuju visoku razinu kompetentnosti i rekombinantnosti (Bacher i sur., 2006).

Najčešći mehanizam β -laktamske rezistencije kod *A. baumannii* je enzimatska razgradnja β -laktamazama, ali kako je priroda ovog mikroorganizma složena višestruki mehanizmi često rade zajedno kako bi proizveli isti rezultat (Quale i sur., 2003). Sojevi *A. baumannii* sadrže kromosomski kodirane AmpC cefalosporinaze koje su zaslužne za otpornost na cefalosporine širokog spektra dok je cefepim stabilan kao odgovor na te enzime. Ključni čimbenik koji regulira prekomjernu ekspresiju ovog enzima u *A. baumannii* je prisutnost IS elementa poznatog kao ISAb1 (Ruiz i sur., 2007). Za otpornost *A. baumannii* na karbapeneme zaslužan je gen koji kodira karbapenemazu OXA-51-like, ali do smanjene osjetljivosti na karbapeneme dolazi samo u slučaju pojačane genske ekspresije (Bubonja-Šonje i Abram, 2014).

Rezistencija na β -laktame također se pripisuje neenzimskim mehanizmima, koje uključuju promjene u proteinima vanjske membrane, (Quale i sur., 2003) promjene u afinitetu ili ekspresiji proteina koji vežu penicilin ili promjene u radu efluks pumpe (Fernandez-Cuenca i sur., 2003).

Aminoglikozidi su baktericidni antibiotici. Vežu se za ribosom 30S i tako ometaju sintezu bakterijskih proteina. Djelotvorni su protiv većine Gram negativnih aerobnih bacila. Nedavno je opisana metilacija 16S rRNA za sojeve *A. baumannii* (*armA*) iz Japana, Koreje i SAD-a. Ovaj mehanizam otpornosti narušava vezanje aminoglikozida na njegovo ciljno mjesto i daje visoku razinu otpornosti na sve klinički korisne aminoglikozide, uključujući gentamicin, tobramicin i amikacin (Doi i sur., 2007).

Kinoloni pokazuju baktericidno djelovanje ovisno o koncentraciji koje inhibira aktivnost DNA giraze i topoizomeraze, enzima bitnih za umnožavanje bakterijske DNA (Hooper i Jacoby, 2016). Modifikacije DNA giraze ili topoizomeraze IV kroz mutacije u genima *gyrA* i *parC* opisane su za *A. baumannii*. Navedene mutacije ometaju vezanje ciljanog mjesta. Do sada za *A. baumannii* nije zabilježena rezistencija na kinolone posredovana plazmidom (Hamouda i Amyes, 2004).

Tetraciklini su bakteriostatski antibiotici koji se vežu za podjedinicu ribosoma 30S, te tako inhibiraju bakterijsku sintezu proteina (Chopra i Roberts, 2001). Otpornost na tetracikline i njihove derivate može biti posredovana efluks pumpom ili ribosomskom zaštitom. Efluksne pumpe specifične za tetraciklin uključuju one kodirane determinantama tet(A) do tet(E), koje se najčešće nalaze unutar Gram negativnih bakterija. Tigeciklin, koji je prvi u novoj klasi modificiranih tetraciklinskih antimikrobnih sredstava poznatih kao glicilciklini, također je supstrat za ovaj sustav efluks pumpi (Peleg i sur., 2007a).

Zabrinjavajuće je da se porast MIK- a za tigecikline brzo dogodio *in vitro*, što sugerira da se ekspresija ove efluksne pumpe može brzo povećati kao odgovor na selektivni pritisak. Rezultati istraživanja provedenih od strane Pelega i sur. (2007b) sugeriraju da treba biti oprezan pri razmatranju liječenja tigeciklinom za infekciju *A. baumannii* na mjestima gdje razine lijeka mogu biti suboptimalne, kao što je krvotok.

Otpornost *Acinetobacter* spp. na karbapeneme dovela je do potrebe za korištenjem starijih generacija antibiotika, kao što su polimiksini B i E (kolistin). Međutim, *in vitro* istraživanja pokazuju da uporaba ovih antibiotika uzrokuje povećanu rezistenciju i heterorezistenciju kod sojeva *A. baumannii*. Istraživanja pokazuju da se rezistencija na polimiksine razvija sporije u *A. baumannii* nego u *K. pneumoniae* (Bubonja-Šonje i Abram, 2014), ali mehanizam rezistencije kod *A. baumannii* ostaje nepoznat (Li i sur., 2006).

2.3. Matična mliječ

Matična mliječ smatra se jednim od najcjenjenijih pčelinjih proizvoda te se kao funkcionalna hrana ili dodatak prehrani može koristiti u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Matična mliječ je izlučevina podždrijelne (hipofaringealne) i prednjočeljusne (mandibularne) žlijezde medonosne pčele (*Apis mellifera* L.), a pčele ju koriste za hranjenje matice i ličinki. Postoje tri tipa mliječi: radilička mliječ, trutovska i matična. U matičnoj mliječi ima deset puta više pantotenske kiseline, neobiopterina i biopterina nego u radiličkoj i trutovskoj mliječi. Tijekom razvoja ličinki radilica i trutova mijenja se odnos glukoza/fruktoza od 0,1 do 0,7, a u matičnoj mliječi cijelo vrijeme ostaje isti i iznosi 1,2 do 2,5 (Oršolić, 2013). Dokazano je da dimorfizam jajašca u maticu ili radilicu ne ovisi o genetskim razlikama, nego isključivo o ishrani matičnom mliječi. Diferencijaciju pčelinje ličinke u maticu potiče protein rojalaktin sadržan u matičnoj mliječi (Kamakura, 2011).

Mogućnost uporabe matične mliječi temelji se na njenim biološkim karakteristikama. Njena konzumacija djeluje biostimulativno na izmjenu tvari, energiju i izdržljivost, stimulira parasimpatički centar, povećava otpornost organizma na stres i bolesti, pomaže u regeneraciji stanica i tkiva, pozitivno djeluje na krvožilni sustav, stimulira imunološki sustav, pozitivno djeluje na artritis, anemiju, mišićnu distrofiju i Parkinsonovu bolest te djeluje antimikrobno, antivirusno i protuupalno (Pasupuleti i sur., 2017). Istraživanja su pokazala da matična mliječ može imati i negativne učinke kod pojedinih ljudi, zbog prisutnosti različitih proteina, što zahtijeva oprez prilikom njene uporabe (Rosmilah i sur., 2008).

Izvanredne biološke značajke matične mliječi i njena uporaba u različitim sektorima, od farmaceutske i prehrambene industrije te proizvodnja kozmetičkih pripravaka, zahtijevaju standardizaciju matične mliječi i osiguranje stabilnosti njenih bioaktivnih sastojaka tijekom skladištenja i čuvanja (Oršolić, 2013).

2.3.1. Kemijska i fizikalna svojstva matične mliječi

Matična mliječ je bijele boje, želatinozno viskozne teksture, pH vrijednosti od 3,4 do 4,5 i specifična mirisa i okusa (Sabatini i sur., 2008). Sastav svježih matičnih mliječi prikazan je

u tablici 2.3.1.1. Usprkos visokom udjelu vode i aktivitetu vode (a_w) iznad 0,92, matična mliječ je mikrobiološki stabilna (Sabatini i sur., 2008). Proteini matične mliječi čine najvažniji dio suhe tvari te se većina antimikrobnih svojstava matične mliječi pripisuje proteinu rojalizinu i antimikrobnim peptidima Jelleine I – III. Od šećera najviše ima glukoze, fruktoze i sukroze, a u neznatnim količinama maltoze, trehaloze, melibioze, riboze i erloze. U lipide matične mliječi se ubrajaju slobodne masne kiseline, neutralne masti, steroli i ugljikovodici. Glavna masna kiselina je nezasićena *trans*-10-hidroksi-2-dekanska (10-HDA) kiselina, sa dokazanim antimikrobnim svojstvima (Melliou i Chinou, 2005) koja se koristi za procjenu kvalitete matične mliječi (Bogdanov, 2016).

Glavni elementi u matičnoj mliječi su K, P, S, Na, Ca, Al, Mg, Zn, Fe, Cu i Mn, dok se Ni, Cr, Sn, W, Sb, Ti i Bi nalaze u tragovima (0,01-1 mg/100 g). Od vitamina sadrži vitamine B kompleksa, od kojih se riboflavin, tiamin, niacin i folna kiselina nalaze u ujednačenim količinama. Prisutni su, ali s većim varijacijama, biotin, piridoksin, inozitol i pantotenska kiselina. Vitamin C je prisutan u tragovima, dok su vitamini topivi u mastima (A, D, E i K) odsutni (Schmidt i Buchmann, 1992). U mliječi se osim navedenog nalaze i različiti enzimi, neuroprijenosnici i spolni hormoni (Fratini, 2016).

Tablica 2.3.1.1. Kemijski sastav svježe matične mliječi

Svježa matična mliječ	Udio (%)
Voda	60 - 70
Proteini	9 - 18
Lipidi	3 - 8
10 – HDA	> 1,4
Fruktoza + glukoza + sukroza	7 - 18
Fruktoza	3 - 13
Glukoza	4 - 8
Sukroza	0,4 – 2,0
Pepeo	0,8 – 3,0

Izvor: Bogdanov, 2016.

2.3.2. Antimikrobno djelovanje matične mliječi

Masno tkivo i stanice kukaca stvaraju brojne antimikrobne peptide, koji su sadržani u njihovoj hemolimfi. Antimikrobni peptidi su relativno kratki polipeptidi različite duljine, građeni od 10 do 50 aminokiselina (Ebenhan i sur., 2014).

Proteini matične mliječi čine oko polovine suhe tvari i oni su većinski zaslužni za antimikrobno djelovanje mliječi. Više od 80 % proteina čini devet glavnih proteina matične mliječi (MRJPs, engl. *major royal jelly proteins*) (Simuth i sur., 2004). Park i sur. (2019) proveli su istraživanje o utjecaju MRJP 1 – 7 za koje se pretpostavlja da imaju antimikrobno djelovanje. Ispitivanje je provedeno na Gram negativnoj bakteriji *Escherichia coli* te je dokazano da MRJP 2 – 5 i MRJP 7 doprinose antimikrobnim svojstvima matične mliječi, dok MRJP 1 i 6 ne pokazuju značajna antimikrobna svojstva. Od devet MRJPs najviše ima rojalizina kojem se pripisuje antimikrobno djelovanje. Rojalizin je amfipatski protein građen od 51 aminokiseline, s neto nabojem +2. Struktura rojalizina je posebna zbog visokog sadržaja cisteina i tri disulfidna mosta koji daju kompaktnu strukturu karakteriziranu visokom stabilnošću pri visokoj temperaturi i niskom pH (Bilikova i sur., 2015).

Najvažnija masna kiselina u matičnoj mliječi je *trans*-10-hidroksi-2-dekanska kiselina (10-HDA), koja nije pronađena u drugim pčelinjim proizvodima. Yang i sur. (2014) istražili su mehanizam djelovanja 10-HDA na *E. coli*. 10-HDA je promijenila ionsku vodljivost stanične membrane i dovela do istjecanja K^+ , Ca^{2+} i Mg^{2+} iz bakterijskih stanica *E. coli*. Istjecanje navedenih kationa može dovesti do smrti bakterijskih stanica (Feng i sur., 2011).

Fontana i sur. (2004) izolirali su iz matične mliječi četiri antimikrobna peptida (engl. *Jelleine-I-IV*) uporabom obrnuto-faznog HPLC-a od kojih su Jelleine I-III pokazali antimikrobno djelovanje prema kvascima te Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama.

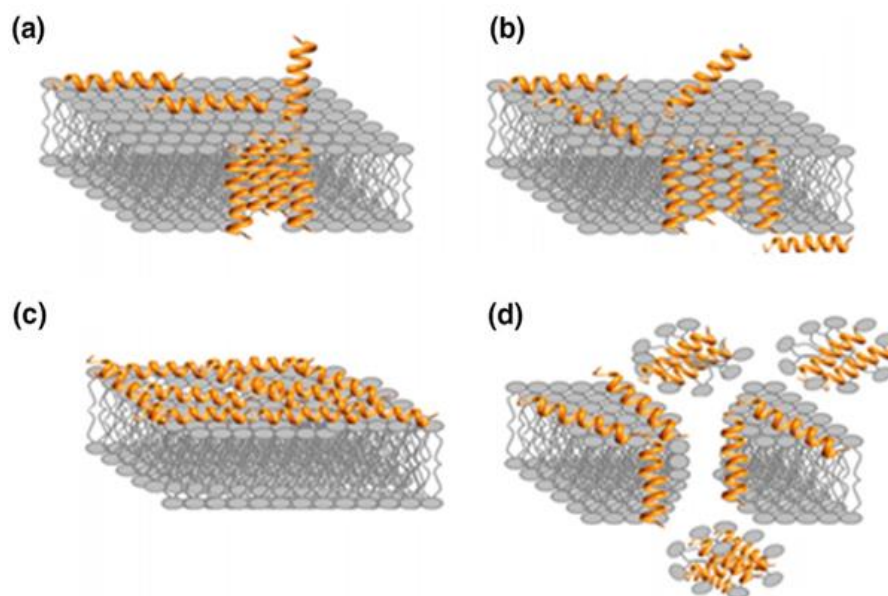
Han i sur. (2011) identificirali su apolipoforin III protein u matičnoj mliječi i smatraju da može pridonijeti dodatnim antimikrobnim svojstvima matične mliječi. Apolipoforin III je protein koji sudjeluje u transportu i metabolizmu lipida u hidrofilne sredine (Fujita i sur., 2012). U matičnoj mliječi detektiran je i enzim glukoza oksidaza (GOx) (Li i sur., 2008). GOx koja katalizira oksidaciju glukoze do vodikovog peroksida dokazana je u medu pri čemu je zabilježeno njeno visoko antimikrobno djelovanje (Sagona i sur., 2015).

Poznata su dva mehanizma djelovanja antimikrobnih peptida, a to su razgradnja stanične membrane i ulazak u stanicu preko membrane, ali bez njezine degradacije. Ulaskom u stanicu, antimikrobni peptid veže se za određenu molekulu čime utječe na vijabilnost stanice u kojoj se nalazi, ali ciljno mjesto antimikrobnog peptida može biti i sama bakterijska membrana (Pandey i sur., 2011).

Vanjska membrana Gram negativnih bakterija, odnosno lipopolisaharidni dio membrana stabiliziran je kalcijevim i magnezijevim ionima. Antimikrobni peptidi mogu proći kroz membranu tako da dopiju na mjesta na kojima se nalaze kalcijevi i magnezijevi kationi,

pri čemu stvaraju pukotine i permeabiliziraju vanjsku membranu (Nikaido, 2003). Prilikom interakcije peptida s membranom, nabijene skupine peptida reagirat će s polarnim glavama koje čine hidrofilni dio fosfolipidnog dvosloja, a hidrofobni dijelovi peptida reagirat će s ugljikovodičnim lancima fosfolipida koji su hidrofobni. Pri ulasku u stanicu, peptidi će inhibirati određene molekule i tako spriječiti bakterijsko djelovanje, a inhibirani mogu biti i procesi sinteze proteina ili polisaharida koji grade membranu, procesi vezani uz molekule DNA, RNA i enzima. Ovaj model podrazumijeva translokaciju antimikrobnih peptida preko vanjske membrane bakterija, bez razaranja membrane (Yang i Hinner, 2015).

Kumar i sur. (2018) u svom su radu opisali četiri modela djelovanja antimikrobnih peptida (slika 2.3.2.1.). Prema bačvastom modelu, antimikrobni peptidi ućahure se unutar fosfolipidnog dvosloja tako da se hidrofilni dijelovi peptida nalaze unutar same pore, a hidrofobni dijelovi su okrenuti prema dvosloju. Prema modelu toroidalne pore, dolazak peptida uzrokuje kontinuirano savijanje fosfolipida, tako da su njihove polarne glave okrenute prema peptidima koji trebaju proći kroz membranu, i formiranje kanala za prolazak tog peptida. Prema modelu tepiha, dolazak antimikrobnih peptida uzrokuje tenziju u bakterijskoj membrani pri čemu dolazi do cijepanja same membrane i formiranja micela. Kolaps dvoslojne membrane u micela poznat je kao deterdžent model. Ulaskom antimikrobnih peptida u bakteriju, može se inhibirati sinteza određenih proteina, enzima (proteaza), a može se aktivirati i protein autolizin koji će uzrokovati raspad cijele bakterije. (Cindrić, 2019).



Slika 2.3.2.1. Četiri modela djelovanja antimikrobnih peptida na staničnu membranu bakterije a) bačvasti model, b) toroidalni model, c) tepih model, d) deterdžent model (Izvor: Kumar i sur., 2018).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je baktericidno djelovanje matične mliječi izraženije kod Gram pozitivnih bakterija, a učinak je slabiji kod Gram negativnih bakterija, te se može okarakterizirati kao bakteriostatski. Shen i sur. (2012) izolirali su rekombinantni rojalizin eksprimiran u bakteriji *Escherichia coli* spajanjem vektora i cDNA *Apis cerana* koja kodira za različite oblike rojalizina. Izolirani rekombinantni rojalizini djelovali su antimikrobno na Gram pozitivne bakterije pri čemu su oštetili bakterijsku staničnu membranu, dok prema Gram negativnim bakterijama nisu pokazali antimikrobnu aktivnost.

Dundar i sur. (2022) su ispitivali antibakterijsko djelovanje svježe, liofilizirane i mikroenkapsulirane matične mliječi prema *A. baumannii* i *K. pneumoniae*. Vrijednosti MIK i MBK za sve uzorke matičnih mliječi su bile niže za *A. baumannii* od vrijednosti za *K. pneumoniae*.

Eshraghi (2005) je istraživao različita antibakterijska svojstva sirove matične mliječi, frakcije topive u eteru i frakcije netopive u eteru, prema različitim vrstama bakterija. Rezultati su pokazali jak inhibitorski učinak sirove matične mliječi. Sojevi vrste *Staphylococcus aureus* bili su osjetljiviji u odnosu na *Streptomyces griseus* i *E. coli*. Dio matične mliječi topivi u eteru koji sadrži 10-HDA pokazao je jača antimikrobna svojstva nego sirova matična mliječ, dok je dio matične mliječi netopiv u eteru, onaj koji sadrži rojalizin, bio manje učinkovit.

Garcia i sur. (2013) istraživali su antimikrobnu aktivnost uzoraka matičnih mliječi s područja Argentine, 10-HDA, dijelova topivih u eteru i matične mliječi bez lipida. Svaki od uzoraka matične mliječi imao je različito djelovanje na različite vrste. Rezultati su pokazali da su svi uzorci matičnih mliječi i 10-HDA manje inhibirali Gram negativne bakterije kao što su *K. pneumoniae*, *E. coli* i *Pseudomonas aeruginosa* nego Gram pozitivne bakterije.

2.4. Metode određivanja antimikrobnog djelovanja

Jedan od načina provođenja probira djelovanja antimikrobnog agensa (eng. *Screening*) je Kirby - Bauerov postupak, odnosno metoda disk difuzije kojom se dokazuje inhibitorski učinak. Na Mueller-Hinton agar nacijepi se bakterijska kultura pomoću sterilnog vatenog štapića, a zatim se na površinu agara postavljaju diskovi impregnirani antimikrobnom tvari. Spomenuta tvar potom iz celuloznog diska difundira u hranjivu podlogu i ako je mikroorganizam osjetljiv, nakon inkubacije od 18 – 24 h, pojavljuje se zona inhibicije čiji se promjer očitava. Rezultati djelovanja antibiotika se izražavaju prema kriterijima koji su određeni od strane CLSI (engl. *Clinical and Laboratory Standard Institute*) (CLSI, 2012a). U ovom radu korištena je druga inačica ove metode, gdje se umjesto diskova izbuše bunari u agaru koji se potom ispune antimikrobnom tvari čije se djelovanje ispituje (Sabee i sur., 2020).

Makrodilucijska i mikrodilucijska metoda se provode za utvrđivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK). Makrodilucijska metoda se provodi u epruvetama minimalnog volumena od 2 mL. Podrazumijeva serijsko razrjeđenje antimikrobne

tvori u tekućem hranjivom mediju. Faktor razrjeđenja ovisi o rasponu koncentracija koje se žele ispitati. Poznata biomasa mikroorganizma se tretira odabranim koncentracijama djelatne tvari. Nakon 24 h inkubacije, očitava se rast kultura (Garcia i sur., 2010).

Mikrodilucijska metoda podrazumijeva isti postupak serijskog razrjeđenja antimikrobne tvari, ali se testiranje provodi s manjim volumenima od onih korištenih u makrodilucijskoj metodi. Umjesto epruveta koriste se mikrotitarske ploče s 96 jažica. Najmanja vrijednost pri kojoj nema vidljivog rasta se naziva MIK odnosno minimalna inhibitorna koncentracija Minimalna baktericidna koncentracija (MBK) se određuje precjepljivanjem tretiranog mikroorganizma na kruti Mueller-Hinton agar i koncentracija pri kojoj rast u potpunosti izostaje predstavlja vrijednost MBK (CLSI 2012b).

3. Materijali i metode

3.1. Kemikalije

- Agarozna, SeaKem® (Lonza, SAD)
- Etanol (96%, Gram mol, Hrvatska)
- Natrij klorid, (NaCl, Merck, Njemačka)
- Dimetil sulfoksid 10% ((CH₃)₂SO, Sigma-Aldrich, SAD)
- Propanol (VWR Chemicals, Belgija)
- Resazurin natrijeva sol (C₁₂H₆NO₄·Na, Santa Cruz Biotechnology, SAD)

3.2. Laboratorijski instrumenti

- Brojač kolonija, Colony star (Funke Gerber, Njemačka)
- Centrifuga 54145R (Eppendorf AG, Njemačka)
- Densitometar, DEN-1 Densitometer (Biosan, Latvija)
- Inkubator, Sanyo incubator MIR-153 (Sanyo Electronic CO. Ltd., Japan)
- Kadica za izradu gela (Thermoscientific, SAD)
- Laboratorijska vaga, TE3102S (Santarius AG, Njemačka)
- Orbitalna treskalica/inkubator, Orbital shaker – Incubator ES-20 (Biosan, Latvija)
- Sustav za horizontalnu elektroforezu, Owl A1 (Thermo Scientific, SAD)
- Uređaj za PCR, ProFlex PCS System (Applied Biosystem, Life Technologies, SAD)
- Uređaj za spektrofotometrijsko mjerenje DNA koncentracije i čistoće, NanoPhotometer P300 (Implen, Njemačka)
- Uređaj za vizualizaciju agaroznih gelova, UVIDOC HD6 (Uvitec, Velika Britanija)
- Vodena kupelj, WB7 (Mettler, Njemačka)
- Vorteks mješalica, Vorteks V-1-plus (Biosan, Latvija)

3.3. Puferi, indikatorske otopine i hranjive podloge

- Za pripremu fiziološke otopine (0,85%) korišten je NaCl (VWR CHEMICALS, Belgija). Fiziološka otopina pripremljena je otapanjem 8,5 g NaCl u 1000 mL destilirane vode te je ovako pripremljena otopina sterilizirana na temperaturi od 121 °C kroz 15 minuta. Sterilna fiziološka otopina je korištena za pripremu bakterijske biomase korištene za probir antimikrobne aktivnosti matične mliječi, serijsko razrjeđenje potrebno za kontrolu biomase, MIK i MBK vrijednosti.
- Indikatorska otopina resazurina (0,02%) pripremljena je otapanjem 0,02 g resazurin natrijeve soli (Santa Cruz Biotechnology, SAD) u 100 ml sterilne destilirane vode. Ovako pripremljena otopina sterilno je filtrirana kroz membranski filter promjera pora 0,22 µm (VWR International, Belgija) i korištena je za određivanje MIK vrijednosti.
- Kruta BHI podloga (engl. *Brain Heart Infusion Agar*, BHI, Biolife, Italija) pripremljena je otapanjem 52,0 g podloge u 1000 mL destilirane vode. Podloga je zatim sterilizirana na temperaturi od 121 °C kroz 15 minuta. Nakon sterilizacije podloga je ohlađena na 45 do 50 °C. Po 20 mL podloge otpipetirano je u Petrijeve zdjelice i ostavljeno da polimerizira na sobnoj temperaturi. Ovako pripremljena podloga korištena je za iscrpljivanje ispitivanih sojeva i provjeru MIK i MBK vrijednosti matičnih mliječi subkultivacijom.
- Tekuća BHI podloga (engl. *Brain Heart Infusion*, BHI, Biolife, Italija) pripremljena je otapanjem 37,0 g podloge u 1000 mL destilirane vode nakon čega je sterilizirana na 121 °C kroz 15 min. Ovako pripremljena podloga korištena je za uzgoj biomase potrebne za izolaciju genomske DNA sojeva *A. baumannii*.
- Mueller-Hinton bujon (MH, Biolife, Italija) pripremljen je otapanjem 22,0 g dehidrirane podloge u 1000 mL destilirane vode te potom steriliziran na temperaturi od 121 °C kroz 15 minuta. Ovako pripremljen bujon korišten je za određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) matične mliječi.

3.4. Komplet za izolaciju genomske DNA

- Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, SAD)

3.5. Molekularni reagensi, enzimi, markeri i početnice

- Boja za elektroforezu, 6x LD (Thermo Scientific, SAD)
- Deoksinukleozid trifosfati, dNTP, 10 mM (Thermo Scientific, SAD)
- Etidij bromid otopina (Promega, SAD)
- Liofilizirana početnica GTG5 (Metabion, International AG, Njemačka)
- Molekularni biljeg, *Gene Ruler* 1 kb (Thermo Scientific, SAD)
- Polimeraza, *DreamTaq polimerase*, 5U/ μ L (Thermo Scientific, SAD)
- Pufer za polimerazu s 20 mM MgCl₂, *DreamTaq Buffer*, 10x (Thermo Scientific, SAD)

3.6. Priprema uzoraka matične mliječi

U ovom istraživanju ispitano je antimikrobno djelovanje matičnih mliječi (MM1, MM2, MM3, MM4 i MM5) prikupljenih na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima na području Republike Hrvatske (slika 3.6.1.) tijekom 2022. godine. Matične mliječi čuvane su na -20 °C do analiza.

Radne otopine (1 g/mL) pripravljene su neposredno prije izvođenje analiza otapanjem 8 g matične mliječi u 8 mL sterilne destilirane vode. S obzirom na to da je matična mliječ osjetljiva na svjetlost, radne otopine pripravljene su u mraku i zaštićene aluminijskom folijom.



Slika 3.6.1. Obiteljska gospodarstva na kojima su prikupljeni uzorci matičnih mliječi. Plava oznaka - Konjšćica, Zagrebačka županija (MM1 i MM2); crvena oznaka – Petrovsko, Krapinsko-zagorska županija (MM3); žuta oznaka – Obrovac Sinjski, Splitsko-dalmatinska županija (MM4 i MM5).

3.7. Bakterijski sojevi

U ovom istraživanju ispitana je osjetljivost višestruko rezistentnih Gram negativnih patogena izoliranih iz otpadnih komunalnih voda i bolnica. U tablici 3.7.1. prikazani su ispitivani bakterijski sojevi *Klebsiella pneumoniae* i *Acinetobacter baumannii* (n=10). Sojevi *K. pneumoniae* su ustupljeni od strane Instituta „Ruđer Bošković“ (IRB) i detaljno molekularno okarakterizirani i genotipizirani u prijašnjim istraživanjima (Repinec, 2021), a *A. baumannii* od strane Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ (KFM) i genotipizirani su u ovom istraživanju (poglavlje 3.9). Svi sojevi rezistentni su na karbapeneme.

Tablica 3.7.1. Višestruko rezistentni Gram negativni sojevi korišteni u ovom istraživanju.

Soj	Vrsta
SE_SC_COL_46	<i>K. pneumoniae</i> ^{IRB}
SE_SC_COL_68	<i>K. pneumoniae</i> ^{IRB}
SE_SC_COL_96	<i>K. pneumoniae</i> ^{IRB}
SE_SC_COL_173	<i>K. pneumoniae</i> ^{IRB}
H2_COL_79	<i>K. pneumoniae</i> ^{IRB}
AB_6	<i>A. baumannii</i> ^{KFM}
AB_7	<i>A. baumannii</i> ^{KFM}
AB_8	<i>A. baumannii</i> ^{KFM}
AB_9	<i>A. baumannii</i> ^{KFM}
AB_10	<i>A. baumannii</i> ^{KFM}

3.8. Izolacija genomske DNA *A. baumannii*

Genomska DNA je izolirana iz sojeva *A. baumannii* (n = 10). Prikupljeni sojevi prvo su pročišćeni do monokultura na krutim BHI podlogama. Pojedinačne kolonije svakog soja sterilno su precijepljene u 1,5 mL tekuće BHI podloge koje su zatim inkubirane na 37 °C preko noći. Nakon inkubacije bakterijske stanice su odvojene od hranjive podloge centrifugiranjem (16000 *xg*/3 min). Genomska DNA je izolirana iz staničnog peleta pomoću kompleta Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, SAD) prema uputama proizvođača.

Stanični pelet je u potpunosti resuspendiran pipetiranjem u 600 µL pufera za lizu (engl. *Nuclei Lysis Solution*). Ovako pripremljena suspenzija stanica je inkubirana na 80 °C kroz 5 min u vodenoj kupelji. U ovom koraku bakterijske stanice su u potpunosti lizirane. Uzorci su zatim ohlađeni na sobnu temperaturu, dodano im je 3 µL otopine RNaze (engl. *RNase Solution*), pažljivo su promiješani preokretanjem mikrotubica dva do pet puta i inkubirani na 37 °C/45 min. Pod djelovanjem enzima RNaza u uzorcima je razgrađena RNA. Uzorci su zatim ohlađeni na sobnu temperaturu. Taloženje proteina postignuto je dodavanjem 200 µL otopine za precipitaciju proteina (engl. *Protein Precipitation Solution*), kratkim vorteksiranjem i

inkubacijom na ledu kroz 5 min. Stanični proteini su odvojeni od proteina centrifugiranjem (16000 $xg/3$ min). Supernatant koji sadrži DNA prebačen je u nove mikrotubice s 600 μL izopropanola sobne temperature. Uzorci su promiješani preokretanjem mikrotubica do stvaranja vidljivih niti DNA. Izopropanol je uklonjen centrifugiranjem (16000 $xg/2$ min). Preostali talog ispran je s 600 μL etanola (70%) sobne temperature. Etanol je uklonjen centrifugiranjem (16000 $xg/2$ min), a zaostali etanol je uklonjen sušenjem na zraku kroz 10 - 15 min. Ovako dobivena genomska DNA je rehidrirana u puferu za rehidrataciju (engl. *DNA Rehydration Solution*) na sobnoj temperaturi preko noći.

Koncentracija i čistoća genomske DNA izmjerene su spektrofotometrijski pomoću uređaja NanoPhotometer P300 (Implen, Njemačka). Sva genomska DNA razrijeđena je na koncentraciju od 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ u puferu za rehidrataciju (10 mM Tris-HCl, pH 7,4/1 mM EDTA, pH 8,0; Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, USA). Ovako razrijeđena DNA korištena je za genotipizaciju sojeva *A. baumannii*.

3.9. Genotipizacija izolata *A. baumannii* rep PCR metodom

Ukupno 10 sojeva *A. baumannii* je genotipizirano pomoću rep-PCR metode (Domig i sur., 2014). Za genotipizaciju korištena je početnica GTG5 nukleotidnog slijeda 5' GTG GTG GTG GTG GTG 3' (Švec i sur., 2005). Ukupni volumen pojedinačne rep-PCR reakcijske smjese iznosio je 25 μL . Sastav reakcijske smjese s volumenima te početnim i završnim koncentracijama pojedinačnih reagensa prikazan je u tablici 3.9.1.

Tablica 3.9.1. Sastav rep-PCR reakcijske smjese.

Reagens	Početna koncentracija	Završna koncentracija	Volumen [μL]
<i>DreamTaq</i> pufer s MgCl_2	10x pufer/20 mM MgCl_2	1x pufer/2 mM MgCl_2	2,5
dNTP	10 mM	0,4 mM	1,0
GTG5	100 pmol/ μL	2 pmol/ μL	0,5
<i>DreamTaq</i> polimeraza	5 U/ μL	0,08 U/ μL	0,4
DNA	20 ng/ μL	0,8 ng/ μL	1,0
H_2O	/		19,6
Ukupan volumen			25,0

Rep-PCR reakcija je provedena u PCR uređaju ProFlex PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, SAD). Uvjeti reakcije prikazani su u tablici 3.9.2.

Tablica 3.9.2. Temperaturni profili rep-PCR reakcije.

PCR korak	Temperatura/vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95 °C/7 min	1
Denaturacija	90 °C/30 s	
Sparivanje početnica	40 °C/1 min	30
Produljivanje lanaca	65 °C/8 min	
Završno produljivanje lanaca	65 °C/16 min	1

Rep-PCR produkti (5 µL) su pomiješani s 2 µL 6x LD boje i dodani u agarozni gel (2%). Uz uzorke, u gel je dodano i 5 µL molekularnog biljega, *Gene Ruler* 1 kb (Thermo Scientific, SAD). Uzorci su razdvojeni horizontalnom gel elektroforezom (Owl A1, Thermo Scientific, SAD) na 90 V kroz 110 min. Po završetku elektroforeze, gel je bojan 30 min u otopini etidij bromida (0,2%) te vizualiziran i fotografiran pomoću uređaja UVIDOC HD6 (Uvitec, Velika Britanija).

Dobiveni rep-PCR profili analizirani su pomoću programa BioNumerics verzija 7.6.1 (Applied Maths, Belgija). Sličnost između sojeva *A. baumannii* izračunata je na temelju Dice koeficijenta, a grupirani su pomoću UPGMA (engl. *Unweight Paired Group Arithmetic Average*) algoritma. Za konstrukciju dendrograma korišteni su sljedeći parametri: razina tolerancije = 1% i optimizacija = 0,5%. U daljnjim analizama ispitana je osjetljivost sojeva reprezentativnih za svaku grupu na matičnu mliječ.

3.10. Probir antimikrobne aktivnosti matične mliječi

U ovom istraživanju probir (engl. *screening*) antimikrobnog djelovanja matične mliječi (MM1, MM2, MM3, MM4, MM5) na sojeve *K. pneumoniae* i *A. baumannii* ispitan je modificiranom Kirby - Bauer disk difuzijskom metodom (Bauer i sur., 1959), točnije metodom difuzije iz bunara (Sabee i sur., 2020).

Tijekom ove analize svi uvjeti moraju biti konstantni, što podrazumijeva korištenje hranjivih podloga istog volumena, iste koncentracije matične mliječi i biomase ispitivanih sojeva te isti uvjeti inkubacije. Bakterijske biomase su pripravljene iz čistih prekonocnih kultura. Nakon iscrpljivanja sojeva na krutim BHI podlogama, sojevi su inkubirani na 37 °C u trajanju od 24 sata (Sanyo MIR-153, Japan). Bakterijske suspenzije su pripravljene tako da su u 5 mL sterilne fiziološke otopine dodane kolonija po kolonija odgovarajućeg soja do dobivanja

bakterijske suspenzije čiji turbiditet odgovara turbiditetu 0,5 McFarland standarda. Turbiditet je izmjeren pomoću denzitometra (DEN – 1 Densitometar, Biosan, Latvija). Tako dobivena biomasa ispitivanog uzorka iznosi otprilike $1,5 \times 10^8$ stanica/mL.

Na pripremljene krute BHI podloge ($V = 20$ ml) su zatim sterilnim štapićem razmazane bakterijske suspenzije ispitivanih sojeva nakon čega su sterilnim nastavkom za mikropipete (promjer = 9 mm) izbušena četiri bunara u agaru te je u svaki bunar stavljeno 0,2 mL uzorka matične mliječi (1 g/ml) u duplikatima. Uz matičnu mliječ za svaki soj ispitano je i djelovanje DMSO (0,5%). S obzirom na to da DMSO u koncentracijama $< 1\%$ ne utječe na bakterijski rast, DMSO je služio kao negativna kontrola. Tako pripremljene ploče su zatim inkubirane na $37\text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 24 sata nakon čega je izmjerena zona inhibicije rasta. Zone inhibicije uključuju i promjer bunara, a prikazane su u milimetrima (mm).

3.11. Određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije matične mliječi

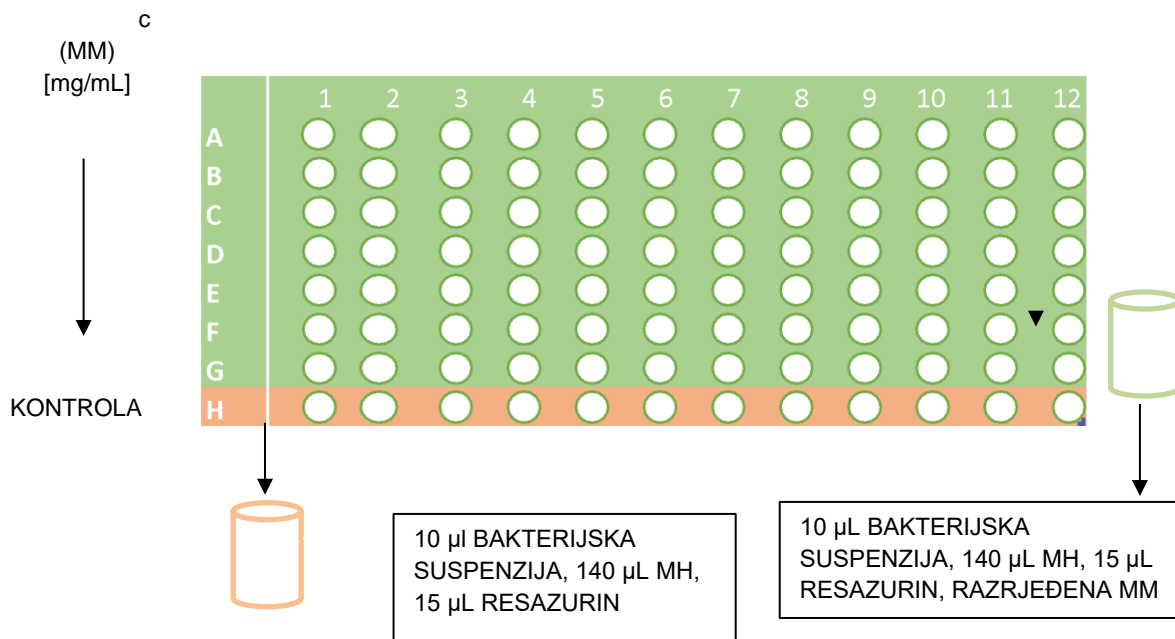
3.11.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Minimalne inhibitorne koncentracije matične mliječi određene su metodom mikrodilucije uz dodatak resazurina (engl. *resazurin microplate assay*, REMA; CLSI 2012; Coban, 2012). Mikrodilucijska metoda podrazumijeva serijsko razrjeđenje matične mliječi u omjeru 1:2 u tekućem Mueller-Hinton mediju. Testiranje je provedeno u mikrotitarskim pločama s 96 jažica.

U sve jažice u redovima A-H je dodano 140 μL tekuće Mueller-Hinton podloge. Jažicama u redu A dodano je 140 μL radne otopine matične mliječi (1 g/mL). Matična mliječ je dalje razrijeđena u omjeru 1:2. Ukratko, po 140 μL iz jažica u redu A prebačeno je u jažice u redu B pomoću multikanalne pipete. Potom je 140 μL iz jažica u redu B prebačeno u jažice u redu C. Postupak je ponovljen do reda G odakle je uklonjeno suvišnih 140 μL . Jažice u redu H sadržavale su samo 140 μL tekuće Mueller-Hinton podloge i služile su za kontrolu rasta ispitivanih sojeva. Na kraju u svim jažicama je ostalo 140 μL . Ovako je dobiven raspon koncentracije matične mliječi 7,81 – 500 mg/ml.

Korištena biomasa pripremljena je na isti način kao što je opisano u poglavlju 3.10. Potom su ovako pripremljene bakterijske suspenzije razrijeđene u omjeru 1:10 u sterilnoj fiziološkoj otopini do koncentracije oko $1,5 \times 10^6$ CFU/mL.

Po 10 μL suspenzije svakog soja biomase $1,5 \times 10^6$ CFU/mL dodano je u sve jažice u redove A-G (slika 3.11.1.1.). Konačna bakterijska koncentracija u mikrotitarskoj ploči iznosila je $1,5 \times 10^5$ CFU/mL. Nakon dodavanja bakterijske suspenzije u svaku jažicu dodano je po 15 μL resazurina (0,02 % otopina) koji je korišten kao indikator bakterijskog rasta.



Slika 3.11.1.1. Shematski prikaz mikrodilucijske metode za određivanje MIK vrijednosti u mikrotitarskoj ploči (autorska slika).

Mikrotitarske ploče inkubirane su na temperaturi od 37 °C, uz stalno miješanje pri 90 okretaja/min u orbitalnoj treskalici/inkubatoru ES-20 (Biosan, Latvija) tijekom 24 h.

Nakon 24 h, bakterijski rast je detektiran vizualno. Žive stanice reduciraju plavo obojeni resazurin u ružičasto obojani resofurin, pa promjena boje iz plave u ružičasto se smatra indikatorom rasta. Najmanja vrijednost pri kojoj je izostala promjena boje, tj. nema vidljivog rasta smatra se MIK odnosno minimalnom inhibitornom koncentracijom.

3.11.2. Kontrola biomase

Kontrola biomase je provedena kako bi se provjerila biomasa korištena za određivanje MIK vrijednosti te validirale MIK i MBK vrijednosti određene REMA metodom.

U redove B-H u mikrotitarskoj ploči dodano je po 180 μ L sterilne fiziološke otopine. U red A je otpipetirano po 180 μ L odgovarajuće bakterijske suspenzije biomase $1,5 \times 10^6$ CFU/mL. Bakterijske suspenzije su razrijeđene u omjeru 1:10, prebacivanjem po 20 μ L iz jažica u redu A u jažice u redu B. Postupak je ponavljan do reda H. Na krutu BHI ploču prebačeno je po 5 μ L svih razrjeđenja svakog soja u četiri ponavljanja. Ploče su inkubirane pri 37 °C kroz 24 h. Nakon inkubacije prebrojane su kolonije i izračunat je broj bakterija prema formuli (1).

$$\text{Brojnost bakterija } \left[\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Broj kolonija}}{V(\text{nacijepljeni uzorak})[\text{ml}]} \times \text{recipročno razrjeđenje uzorka}$$

(1)

Broj bakterija prisutan u biomasi izražen je kao jedinice koje formiraju kolonije/mL (CFU/mL).

3.11.3. Validacija minimalne inhibitorne koncentracije i određivanje minimalne baktericidne koncentracije subkultivacijom

Nakon vizualnog određivanja MIK vrijednosti dodatno su provjerene MIK vrijednosti subkultivacijom sadržaja mikrotitarske ploče (poglavlje 3.11.1) na krutim BHI podlogama. Pomoću multikanalne pipete nacijepljeno je po 5 μ L sadržaja svih jažica u duplikatima. Tako pripremljene ploče su potom inkubirane na 37 °C/24 sata. Nakon inkubacije prebrojane su izrasle kolonije te je izračunat CFU prema formuli (1).

Postotak (%) preživjelih bakterija izračunat je prema formuli (2).

$$\text{Umrle bakterijske stanice } [\%] = \left(1 - \frac{\text{CFU}_2}{\text{CFU}_1} \right) \times 100$$

(2)

gdje je:

CFU1 – broj bakterija korišten za određivanje MIK vrijednosti matične mliječi

CFU2 – broj preživjelih bakterija nakon tretmana matičnom mliječi

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je koncentracija kod koje je postotak umrlih bakterija > 99,5%, a minimalna baktericidna (MBK) koncentracija kod koje je postotak umrlih bakterija > 99,9%.

3.11.4. Statistička analiza podataka

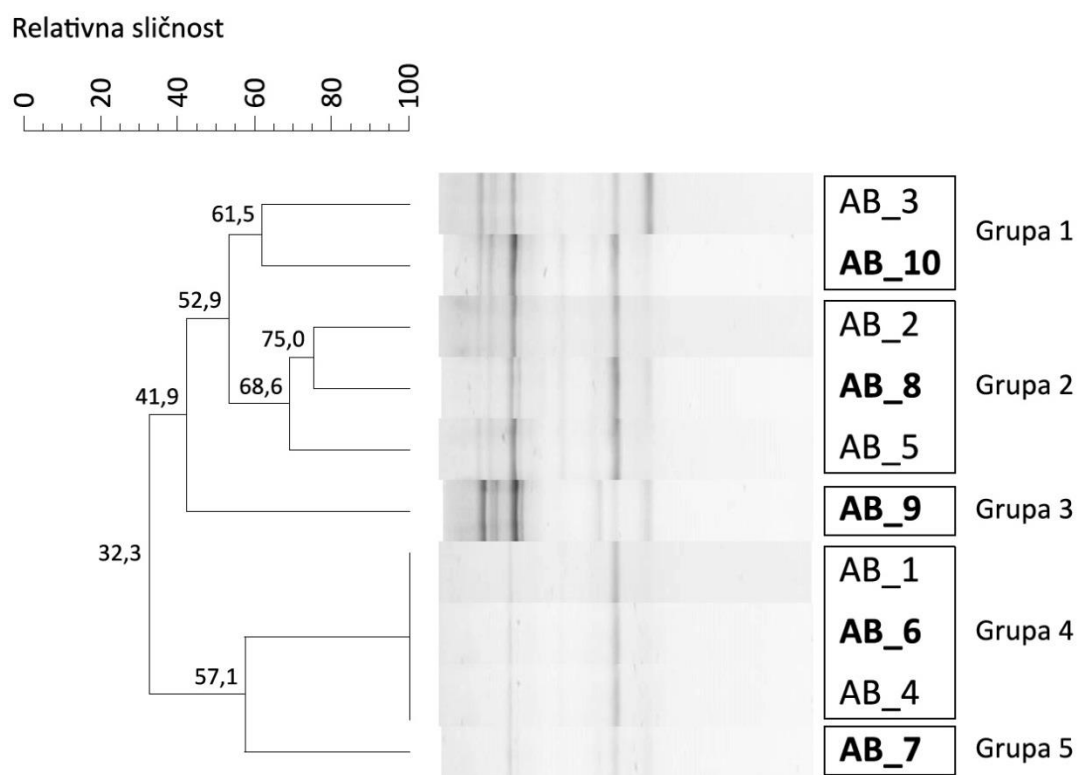
Svi podaci u ovom istraživanju prikazani su kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajne razlike određene su jednosmjernom analizom varijance ANOVA (engl. *one-way ANOVA*), a srednje vrijednosti su međusobno višestruko uspoređene *post-hoc* Bonferroni testom. Razlike se smatraju značajnima ako je $p < 0,05$. Svi podatci i statističke analize provedene su u računalnom programu Microsoft Excel 2016 uz pomoć dodatka Analiza podataka (engl. *Analysis ToolPak*).

4. Rezultati

4.1. Reprezentativni sojevi *A. baumannii*

Kako bi se smanjio broj sojeva čiju je osjetljivost na matičnu mliječ potrebno ispitati, sojevi *A. baumannii* su grupirani na temelju rep-PCR profila dobivenih amplifikacijom s GTG5 početnicom.

Na temelju 50% sličnosti ispitivani sojevi su grupirani u 5 grupa. U grupe 3 i 5 svrstan je samo jedan predstavnik, u grupu 1 dva predstavnika (61,5% sličnosti), a u grupu 2 tri predstavnika (68,6% sličnosti). Samo 3 soja (AB_1, AB_4 i AB_6, grupa 4) pokazuju 100% sličnost, dok kod ostalih sojeva sličnost varira od 32,3 do 75,0%, što sve zajedno ukazuje na izrazitu varijabilnost sojeva *A. baumannii* (slika 4.1.1.).



Slika 4.1.1. Dendrogram sojeva *A. baumannii* grupiranih na temelju rep-PCR profila dobivenih amplifikacijom s početnicom GTG5. Grupe dobivene na temelju 50% sličnosti su uokvirene i označene 1-5, a reprezentativni sojevi su deblje otisnuti.

Reprezentativni sojevi (n = 5) odabrani na temelju rep-PCR profila korišteni su dalje u ispitivanju antibakterijskog djelovanja matične mliječi.

4.2. Antibakterijsko djelovanje matične mliječi

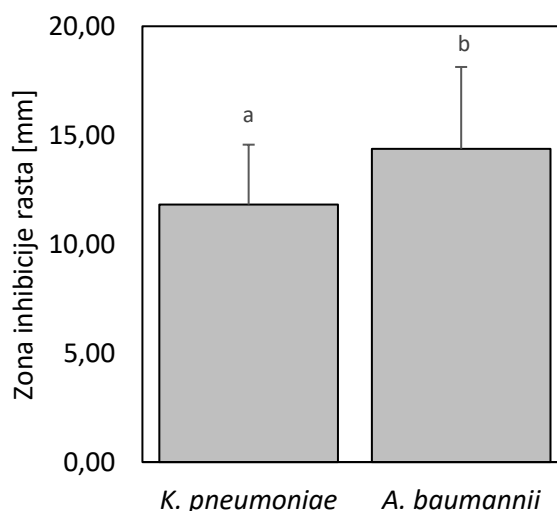
U ovom istraživanju prvo je ispitano djeluje li matična mliječ antibakterijski na sojeve *K. pneumoniae* i *A. baumannii* kao što je opisano u poglavlju 3.10. Osjetljivost svakog soja i antibakterijsko djelovanje svake matične mliječi ispitani su u dva ponavljanja. Antibakterijsko djelovanje vidljivo je kao zona inhibicije rasta oko bunara. Što je zona inhibicije rasta veća to je soj osjetljiviji na djelovanje matične mliječi (slika 4.2.1.).



Slika 4.2.1. Antibakterijsko djelovanje matičnih mliječi (1 g/mL) na Gram negativne sojeve. A) *A. baumannii*; B) *K. pneumoniae*

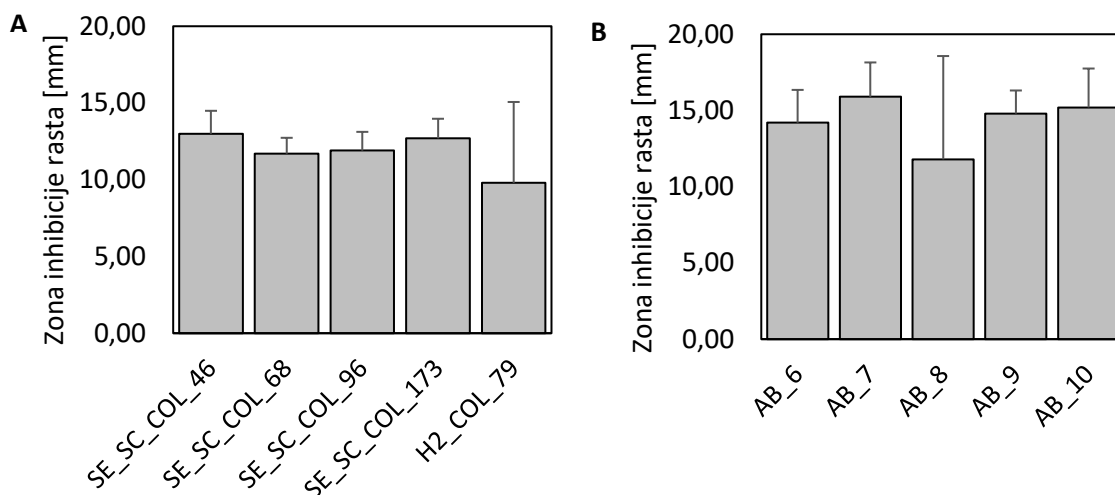
Rezultati probira su prikazani u tablici 4.2.1. kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama.

Općenito, vrsta *A. baumannii* ($14,4 \text{ mm} \pm 3,8 \text{ mm}$) je značajno osjetljivija na djelovanje matične mliječi od vrste *K. pneumoniae* ($11,8 \text{ mm} \pm 2,8 \text{ mm}$; ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,001$) (graf 4.2.1.).



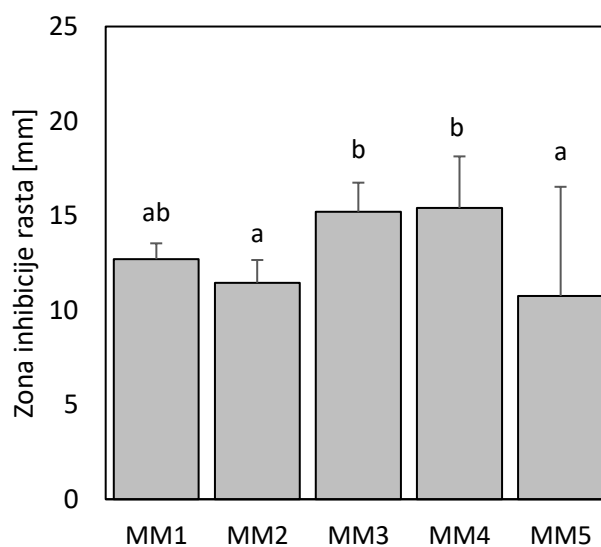
Graf 4.2.1. Osjetljivost vrsta *K. pneumoniae* i *A. baumannii* na djelovanje matične mliječi. Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama. Slovima a-b su označene statistički značajne razlike (ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,05$).

Na razini soja, jedan soj *K. pneumoniae* (H2_COL_79) i jedan soj *A. baumannii* (AB_8) u potpunosti su otporni na djelovanje matične mliječi MM5. Među *K. pneumoniae* soj SE_SC_COL_46 (13,0 mm \pm 1,5 mm) se pokazao kao najosjetljiviji, a soj SE_SC_COL_79 (9,8 mm \pm 5,3 mm) kao najotporniji. Kod *A. baumannii* najosjetljiviji soj je AB_7 (15,9 mm \pm 2,5 mm), a najotporniji soj AB_8 (11,8 mm \pm 6,8 mm). Unatoč tome, sojevi *K. pneumoniae* i sojevi *A. baumannii* pokazuju sličnu osjetljivost na sve ispitivane matične mliječi, tj. unutar sojeva iste vrste nisu detektirane značajne razlike u osjetljivosti (graf 4.2.2.).



Graf 4.2.2. Osjetljivost sojeva vrsta *K. pneumoniae* (A) i *A. baumannii* (B) na matičnu mliječ. Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama.

Značajno najslabije antibakterijsko djelovanje pokazuje MM5 (10,8 mm ± 5,8 mm; ANOVA, $p < 0,001$), a najjače MM3 (15,2 mm ± 1,5 mm) i MM4 (15,4 mm ± 2,7 mm) (graf 4.2.3).



Graf 4.2.3. Antibakterijsko djelovanje matične mliječi (MM1 – MM5). Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama. Slovim a- b su označene statistički značajne razlike (ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,05$).

Antibakterijsko djelovanje matične mliječi na sojeve unutar vrste *K. pneumoniae* odnosno *A. baumannii* je također pokazalo isti opći trend, tj. MM5 je pokazao najslabije, a MM3 i MM4 najjače inhibitorno djelovanje. Manje razlike u inhibitornom djelovanju detektirane su između MM3 i MM4. Na primjer, MM3 je jače inhibirao sojeve *K. pneumoniae*, a slabije sojeve *A. baumannii*, dok je obrnuto zapaženo kod MM4. Također, na razini sojeva detektirano je više značajnih razlika u antibakterijskom djelovanju matičnih mliječi (tablica 4.2.1.).

S obzirom na to da MM5 uopće nije inhibirala rast sojeva H2_COL_79 i AB_8, nisu određene minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije prema spomenutim sojevima.

Tablica 4.2.1. Antibakterijsko djelovanje matične mliječi (MM1-MM5) na sojeve *K. pneumoniae* i *A. baumannii*. Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama.

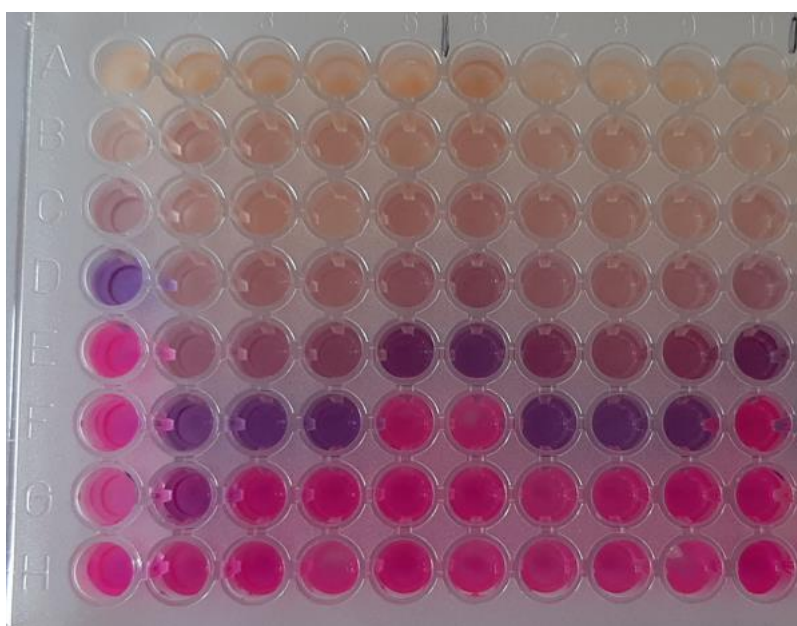
Sojevi	Vrsta	Zona inhibicije rasta [mm]				
		MM1	MM2	MM3	MM4	MM5
SE_SC_COL_46	<i>K. pneumoniae</i>	13,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0	14,0 ± 0,0	11,0 ± 0,0
SE_SC_COL_68	<i>K. pneumoniae</i>	12,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	13,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	11,5 ± 0,0
SE_SC_COL_96	<i>K. pneumoniae</i>	12,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	13,5 ± 0,0	12,5 ± 0,0	11,5 ± 0,0
SE_SC_COL_173	<i>K. pneumoniae</i>	11,5 ± 0,0	11,0 ± 0,0	14,0 ± 0,0	13,5 ± 0,0	13,5 ± 0,0
H2_COL_79	<i>K. pneumoniae</i>	12,5 ± 0,0	10,5 ± 0,0	13,5 ± 0,0	12,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	$\bar{x} \pm sd$ (MM)	12,2 ± 0,5^{ac}	10,7 ± 0,8^{ac}	13,8 ± 0,7^{ab}	12,9 ± 0,8^{ab}	9,5 ± 5,1^c
AB-6	<i>A. baumannii</i>	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	16,0 ± 0,0	17,0 ± 0,0	14,0 ± 0,0
AB-7	<i>A. baumannii</i>	13,0 ± 0,0	13,5 ± 0,0	17,0 ± 0,0	19,5 ± 0,0	16,5 ± 0,0
AB-8	<i>A. baumannii</i>	14,0 ± 0,0	10,5 ± 0,0	16,5 ± 0,0	18,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
AB-9	<i>A. baumannii</i>	14,0 ± 0,0	13,0 ± 0,0	16,5 ± 0,0	16,5 ± 0,0	14,0 ± 0,0
AB-10	<i>A. baumannii</i>	13,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	17,0 ± 0,0	18,5 ± 0,0	15,5 ± 0,0
	$\bar{x} \pm sd$ (MM)	13,2 ± 0,8^{abc}	12,2 ± 1,1^{ab}	16,6 ± 0,4^{cd}	17,9 ± 1,1^d	12,0 ± 6,4^a

$\bar{x} \pm sd$ (MM) - srednja vrijednost zone inhibicije rasta izračunata na temelju izostanka rasta svih sojeva iste vrste uzrokovanog antibakterijskim djelovanjem jedne matične mliječi s pripadajućom standardnom devijacijom

^{a-d}srednje vrijednosti zone inhibicije rasta unutar istog reda označene s različitim slovima predstavljaju statistički značajne razlike (ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,05$)

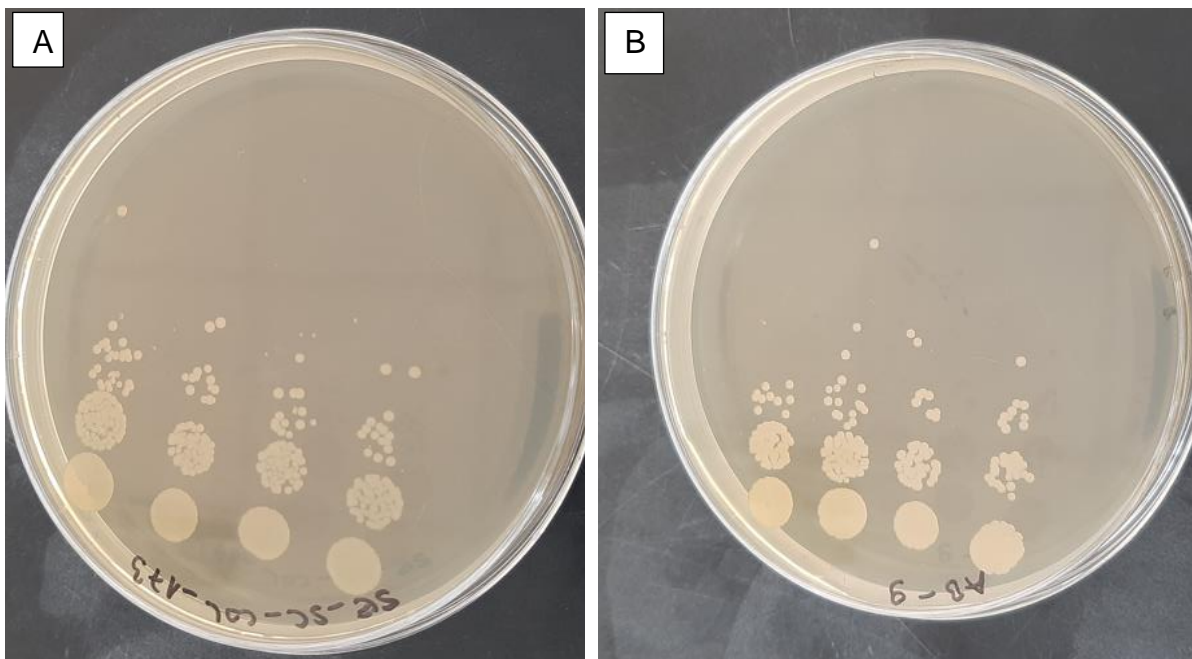
4.3. MIK i MBK vrijednosti matične mliječi

MIK vrijednosti određene su vizualno mikrodilucijskom metodom uz dodatak resazurina (slika 4.3.1). U pojedinim slučajevima nije bila jasno vidljiva promjena plave boje u ružičastu zbog reakcije resazurina s matičnom mliječi stoga nije bilo moguće sa sigurnošću odrediti MIK vizualno.



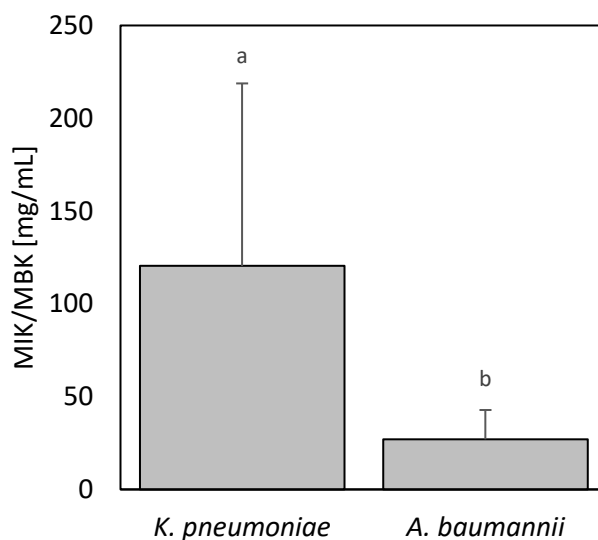
Slika 4.3.1. Prikaz inkubirane mikrotitarske ploče za određivanje MIK vrijednosti mikrodilucijskom metodom uz dodatak resazurina na primjeru matičnih mliječi MM3 i MM4 na sojeve *A. baumannii*. Stupci 1-5 - MM3; stupci 6-10 - MM4. Koncentracije matičnih mliječi smanjuju su iz reda u red dva puta. Koncentracija matične mliječi u jažicama u redu A iznosi 500 mg/mL, a u jažicama u redu G 7,81 mg/mL. Jažicama u redu H nije dodana matična mliječ i služile su za kontrolu bakterijskog rasta. U svaki stupac je inokuliran jedan soj, stupci 1 i 6 – soj AB_6; stupci 2 i 7 AB_7 – soj; stupci 3 i 8 – soj AB_8; stupci 4 i 9 –AB_9; stupci 5 i 10 – soj AB_10.

Nakon vizualnog očitavanja, MIK vrijednosti su dodatno provjerene subkultivacijom. Također, subkultivacijom su određene i MBK vrijednosti. U tablici 4.3.1. prikazane su MIK i MBK vrijednosti pri kojima matične mliječi inhibiraju i djeluju baktericidno na ispitivane sojeve. Za sve matične mliječi MIK vrijednosti su jednake MBK vrijednostima.



Slika 4.3.2. Provjera MIK subkultivacijom na krutim BHI podlogama: A) Utjecaj MM3 na soj SE_SC_COL_173; B) Utjecaj MM4 na soj AB_9.

Kao i iz rezultata probira, za MIK/MBK vrijednosti vidljivo je da je *A. baumannii* osjetljiviji na djelovanje matične mliječi od *K. pneumoniae*. Matična mliječ djeluje inhibitory i baktericidno na *A. baumannii* ($27,01 \text{ mg/mL} \pm 15,80 \text{ mg/mL}$) pri značajno nižim koncentracijama (ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,001$) nego na *K. pneumoniae* ($120,44 \text{ mg/mL} \pm 98,34 \text{ mg/mL}$) (graf 4.3.1.).

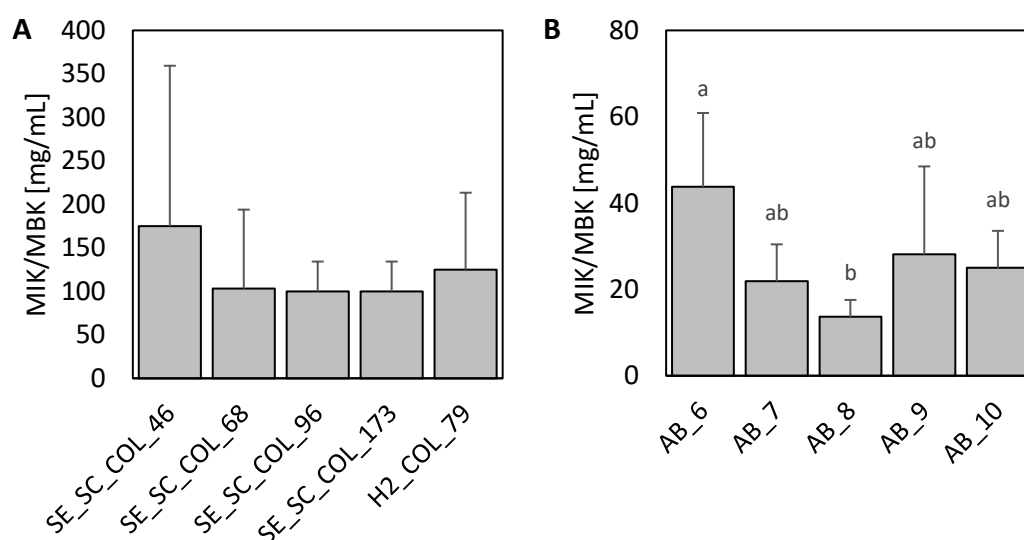


Graf 4.3.1. MIK i MBK vrijednosti matične mliječi prema vrstama *K. pneumoniae* i *A. baumannii*. Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama. Slovicima a-b su označene statistički značajne razlike (ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,05$).

Raspon koncentracija uzoraka matične mliječi koji djeluje inhibitorno/baktericidno na sojeve *K. pneumoniae* je vrlo širok i varira između 15,63 mg/mL i 500 mg/mL, dok je taj raspon za sojeve *A. baumannii* uži (7,81 mg/mL do 62,59 mg/mL) (tablica 4.3.1.).

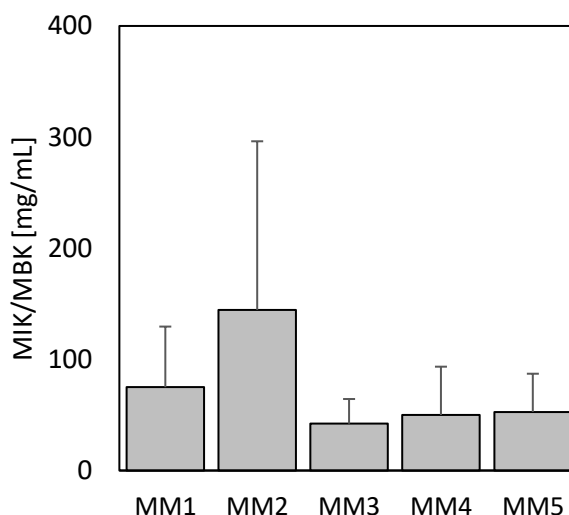
Najniže koncentracije matične mliječi su inhibirale odnosno djelovale baktericidno na sojeve *K. pneumoniae* SE_SC_COL_68 (103,12 mg/mL \pm 90,85 mg/mL), SE_SC_COL_96 (100,00 mg/mL \pm 34,23 mg/mL) i SE_SC_COL_173 (100,00 mg/mL \pm 34,23 mg/mL), dok je, iznenađujuće, rast soja SE_SC_COL_46 inhibiran tek pri koncentraciji od 175 mg/mL \pm 184,35 mg/mL (graf 4.3.2.A). Međutim, razlike nisu bile značajne.

Matična mliječ inhibira odnosno djeluje baktericidno na soj *A. baumannii* AB_6 pri koncentraciji od 43,75 mg/mL što ga čini najotpornijim sojem, dok je soj AB_8 najosjetljiviji na djelovanje matične mliječi (MIK/MBK = 13,66 mg/mL \pm 3,9 mg/mL) što se razlikuje od rezultata probira. Samo sojevi AB_6 i AB_8 se međusobno značajno razlikuju u osjetljivosti (Bonferroni test, $p = 0,036$) (graf 4.3.2.B).



Graf 4.3.2. MIK i MBK vrijednosti uzoraka matične mliječi prema sojevima *K. pneumoniae* (A) i *A. baumannii* (B). Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama. Slovicima a-b su označene statistički značajne razlike (ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,05$).

Općenito, slične koncentracije matične mliječi inhibiraju i djeluju baktericidno na sve ispitivane sojeve. Najniže MIK/MBK vrijednosti detektirane su za matične mliječi MM3 (42,19 mg/mL \pm 22,16 mg/mL) i MM4 (50,00 mg/mL \pm 43,46 mg/mL), a najviše za MM2 (144,53 mg/mL \pm 151,73 mg/mL). Međutim, razlike nisu bile značajne (graf 4.3.3.).



Graf 4.3.3. MIK/MBK vrijednosti uzoraka matične mliječi (MM1-MM5) na sve istraživane sojeve *K. pneumoniae* i *A. baumannii*. Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama.

Uzorci matične mliječi koje su inhibirale odnosno djelovale baktericidno na sojeve *K. pneumoniae* pri najnižim koncentracijama su MM3 (62,50 mg/mL \pm 0,00 mg/mL), MM4 (78,12 mg/mL \pm 46,88 mg/mL) i MM5 (78,12 mg/mL \pm 31,25 mg/mL), dok je najslabije djelovanje pokazao uzorak MM2 (250,00 mg/mL \pm 153,09 mg/mL). MIK/MBK vrijednosti MM2 se značajno razlikuju od svih matičnih mliječi (Bonferroni test, $p < 0,05$) s iznimkom MM1 (tablica 5).

S druge strane, matična mliječ je pri sličnim koncentracijama inhibirala odnosno djelovala baktericidno na sojeve *A. baumannii*, tj. MIK/MBK vrijednosti su se kretale u rasponu od 21,87 mg/mL \pm 8,56 mg/mL (MM3 i MM4) do 39,06 mg/mL \pm 23,43 mg/mL (MM2). MIK/MBK vrijednosti prema sojevima *A. baumannii* nisu se značajno razlikovale (tablica 4.3.1.).

Tablica 4.3.1. Inhibitorne (MIK) i baktericidne (MBK) koncentracije matičnih mliječi (MM1-MM5).

Sojevi	MIK/MBK [mg/mL]				
	MM1	MM2	MM3	MM4	MM5
<i>K. pneumoniae</i>					
SE_SC_COL_46	125,00*	500,00*	62,50*	125,00*	62,50*
SE_SC_COL_68	125,00*	250,00*	62,50*	15,63*	62,50*
SE_SC_COL_96	125,00*	125,00*	62,50*	62,50*	125,00*
SE_SC_COL_173	125,00*	125,00*	62,50*	125,00*	62,50*
H2_COL_79	125,00*	250,00*	62,50*	62,50*	n.a.
$\bar{x} \pm sd$ (MM)	125,00 ± 0,00	250,00 ± 153,09	62,50 ± 0,00	78,12 ± 46,88	78,12 ± 31,25
<i>A. baumannii</i>					
AB_	62,50*	62,50*	31,25*	31,25*	31,25*
AB_7	15,63*	31,25*	15,63*	15,63*	31,25*
AB_8	15,63*	7,81*	15,63*	15,63*	n.a.
AB_9	15,63*	62,50*	15,63*	15,63*	31,25*
AB_10	15,63*	31,25*	31,25*	31,25*	15,63*
$\bar{x} \pm sd$ (MM)	24,98 ± 20,97	39,06 ± 23,43	21,87 ± 8,56	21,87 ± 8,56	27,34 ± 7,81

*MIK = MBK

n.a. - nije analizirano; ukoliko matična mliječ tijekom probira nije pokazala antibakterijski učinak na ispitivani soj, nisu određene MIK i MBK za taj soj.

5. Rasprava

Različita istraživanja dokazala su antimikrobna svojstva matične mliječi koja se primarno pripisuju antimikrobnim peptidima Jelleine I – III, rojalizinu, MRJPs i 10-HDA (Fontana i sur., 2004; Garcia i sur., 2013; Yang i sur., 2018). Osim navedenih sastavnica, antimikrobnom učinku doprinose i fenoli, enzimi i proteini te sinergizam svih aktivnih sastavnica matične mliječi. (Fujita i sur., 2012).

U ovom je radu ispitano antibakterijsko djelovanje matičnih mliječi (MM1-MM5; n=5) uzorkovanih na tri različite lokacije na području Republike Hrvatske na višestruko rezistentne patogene sojeve *K. pneumoniae* (n=5) i *A. baumannii* (n=5) izolirane iz otpadnih voda. Svi uzorci matične mliječi su tijekom probira slabije djelovali na karbapenem rezistentne sojeve *K. pneumoniae* (promjer zone inhibicije: 11,8 mm ± 2,8 mm), u usporedbi s karbapenem rezistentnim sojevima *A. baumannii* čiji promjer zone inhibicije iznosi 14,4 mm ± 3,8 mm. Po jedan soj *K. pneumoniae* (H2_COL_79) i *A. baumannii* (AB_8) je pokazao potpunu otpornost na djelovanje matične mliječi MM5. Unatoč tome, između sojeva iste vrste nisu detektirane značajne razlike u osjetljivosti. Potrebno je naglasiti da MM5, čije je djelovanje bilo najslabije (promjer zone inhibicije: 10,8 mm ± 5,8 mm), potječe iz istog područja kao i uzorak matične mliječi MM4 (promjer zone inhibicije: 15,4 mm ± 2,7 mm), koja je uz MM3 (promjer zone inhibicije: 15,2 mm ± 1,5 mm) imala najjači inhibitorni učinak na ispitivane sojeve. Razlike u djelovanju matičnih mliječi uzorkovanih s istog geografskog područja, pripisuju se genetskim razlikama između pčelinjih zajednica koje su je proizvele (Bachanova i sur., 2002).

S obzirom na to da se metodom probira samo utvrdilo djeluje li matična mliječ antibakterijski, provela se mikrodilucijska metoda u koncentracijama matične mliječi od 7,8 do 500,0 mg/mL, kojom su određene minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije za svaki ispitivani soj. Vrijednosti MIK jednake su vrijednostima MBK za sve ispitivane sojeve. Kao i kod probira, sojevi *A. baumannii* su se pokazali osjetljivijima na djelovanje matične mliječi. Raspon MIK i MBK vrijednosti za *K. pneumoniae* kreće se od 15,63 mg/mL do 500 mg/mL s prosjekom 120,44 mg/mL ± 98,34 mg/mL. Raspon MIK i MBK vrijednosti kod *A. baumannii* je znatno uži, od 7,81 mg/mL do 62,59 mg/mL s prosjekom 27,01 mg/mL ± 15,80 mg/mL. Razlike osjetljivosti između sojeva iste vrste nisu značajne za *K. pneumoniae*, dok se kod *A. baumannii* samo sojevi AB_6 i AB_8 međusobno značajno razlikuju u osjetljivosti. Uzorci matične mliječi MM3 i MM4 su pokazali najsnažnije djelovanje, te su najniže MIK i MBK vrijednosti zabilježene za njih, dok su najviše MIK i MBK vrijednosti zabilježene za MM2 koja se značajno razlikuje od ostalih uzoraka matične mliječi, osim od MM1 s kojom dijeli isto geografsko podrijetlo.

Relativno malo istraživanja je provedeno o utjecaju matične mliječi na karbapenem rezistentne *K. pneumoniae* i *A. baumannii*. Dundar i sur. (2022) su ispitali antibakterijsko djelovanje različitih oblika matične mliječi na karbapenem rezistentan *A. baumannii* izoliran iz

ljudske krvi, koji je uzrokovao epidemiju u Francuskoj 2001. godine, te na β -laktamaza producirajuću *K. pneumoniae*. *A. baumannii* je bio osjetljiviji pri nižim koncentracijama matične mliječi u odnosu na *K. pneumoniae*. MIK i MBK su odredili razrjeđenjem matične mliječi u tekućoj MH hranjivoj podlozi u rasponu razrjeđenja 0,98 – 500 mg/mL. Raspon MIK i MBK vrijednosti za *K. pneumoniae* je iznosio 62,5 – 125 mg/mL dok su MIK vrijednosti za *A. baumannii* iznosile 31,2 – 62,5 mg/ml, a MBK 62,5 – 125 mg/ml. Garcia i sur. (2010) su ispitali djelovanje dva uzorka matične mliječi s područja Argentine na Gram negativne i Gram pozitivne bakterije, uključujući i soj *K. pneumoniae* izoliran iz gnojiva peradi. MIK i MBK su određeni razrjeđenjem matične mliječi u tekućoj hranjivoj podlozi u rasponu razrjeđenja 1,95 – 250 mg/mL, te je rast mikroorganizama detektiran prema promjeni turbiditeta. Oba uzorka matičnih mliječi su inhibirala rast *K. pneumoniae* u koncentraciji od 8 mg/mL, dok je za baktericidno djelovanje bilo potrebno 125 odnosno 250 mg/mL matične mliječi.

Korištenje sojeva različitih rezistentnosti, različitih uzoraka matične mliječi te metodologije, ne daje mogućnost potpune usporedbe navedenih istraživanja s ovim istraživanjem, no sva istraživanja potvrđuju osjetljivost *K. pneumoniae* i *A. baumannii* na matičnu mliječ te veću osjetljivost *A. baumannii* u odnosu na *K. pneumoniae*. Bakterijske vrste ispitivane u ovom radu međusobno su slične građe i obje stvaraju biofilmove, stoga njihova različita osjetljivost prema matičnoj mliječi zahtijeva dodatna istraživanja. Prema Ratajczak i sur. (2021), različite koncentracije matičnih mliječi potrebnih za inhibiciju različitih bakterijskih vrsta se mogu djelomično pripisati različitom udjelu pojedinačnih peptida i 10-HDA u uzorcima matičnih mliječi, međutim, to i dalje ne objašnjava različito djelovanje istih uzoraka na različite vrste ili sojeve patogenih bakterija.

Kako bi se u potpunosti stekao uvid u antibakterijski potencijal matične mliječi, potrebne su daljnje analize, posebice na višestruko rezistentnim patogenima. U konačnici, rezultati ovog istraživanja ukazuju na potencijal korištenja matične mliječi s područja Republike Hrvatske za kontrolu rasta karbapenem rezistentnih *K. pneumoniae* i *A. baumannii* budući da su matične mliječi ispitivane u ovom istraživanju djelovale inhibitorno i baktericidno na ispitivane Gram negativne višestruko rezistentne patogene.

6. Zaključci

1. Izolacijom DNA te određivanjem unutarvrzne varijabilnosti rep-PCR metodom uspješno je proveden probir sojeva *A. baumannii*.
2. Svi analizirani uzorci matičnih mliječi (n=5) pokazuju inhibitorno djelovanje prema višestruko rezistentnim sojevima *K. pneumoniae* (n=5) i *A.baumannii* (n=5).
3. *A. baumannii* je značajno osjetljiviji na djelovanje matične mliječi u usporedbi s vrstom *K. pneumoniae* (*A. baumannii*: 14,4 mm ± 3,8 mm; *K. pneumoniae*: 11,8 mm± 2,8 mm; ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,05$).
4. Najučinkovitije antibakterijsko djelovanje pokazuje uzorak matične mliječi MM3 s najnižom MIK/MBK vrijednošću od 42,19 mg/mL ± 22,16 mg/mL, dok najslabije djelovanje pokazuje uzorak MM2 s vrijednošću od 144,53 mg/mL ± 151,73 mg/mL.
5. Minimalna inhibitorna i minimalna baktericidna koncentracija matične mliječi kreće se u rasponu od 15,63 do 500 mg/mL za *Klebsiella pneumoniae*.
6. Minimalna inhibitorna i minimalna baktericidna koncentracija matične mliječi za *Acinetobacter baumannii* kreće se u rasponu od 7,81 do 62,59 mg/mL.

7. Popis literature

1. Ah Y.M., Kim A.J., Lee J.Y. (2014). Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. International Journal of Antimicrobial Agents. 44(1): 8-15
2. Ajayasree T. S., Borkar S. G. (2018). Survival of *Klebsiella pneumoniae* strain borkar in pomegranate orchard soil and its tolerance to temperature and pH. Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering. 5(5): 299-301
3. Aminul P., Anwar S., Molla M.A., Miah R.A. (2021). Evaluation of antibiotic resistance patterns in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Bangladesh. Biosafety and Health. 3(6): 301-306
4. Bachanova K., Kludiny J., Kopernicky J., Šimuth J. (2002). Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae* through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. Apidologie. 33: 259-269
5. Bacher J. M., Metzga D., de Crécy-Lagard V. (2006). Rapid evolution of diminished transformability in *Acinetobacter baylyi*. Journal of bacteriology. 188(24): 8534-8542
6. Bauer A. W., Perry D. M. i Kirby W. M. M. (1959). Single disc antibiotic sensitivity testing of Staphylococci. Journal of the American Medical Association. Archives of internal medicine. 104: 208–216
7. Berlau J., Aucken H.M., Houang E., Pitt T.L. (1999). Isolation of *Acinetobacter* spp., including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. Journal of Hospital Infection. 42: 201-204
8. Bilikova K., Huang S.C., Lin I.P., Šimuth J., Peng C.C. (2015). Structure and antimicrobial activity relationship of royalisin, an antimicrobial peptide from royal jelly of *Apis mellifera*. Peptides. 68: 190-6
9. Bogdanov S. (2016). Royal jelly and bee brood: Harvest, composition, quality. The Royal Jelly Book. Bee Product Science. Muethlethurnen. Switzerland
10. Brenner J., Don, Krieg R., Noel, Staley T., James. (2015). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer. Njemačka
11. Bush K. (2010). Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. Critical Care. 14: 224
12. Bush K., Bradford P.A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 6(8)
13. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States. (2019). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. CDC
14. Chopra I., Roberts M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65(2): 232-60
15. Cindrić D. (2019). Antimikrobni peptidi kao terapeutici. Završni rad. Prirodoslovno – matematički fakultet. Zagreb

16. CLSI (1999). Method for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. CLSI document M26-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute
17. CLSI (2012a). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
18. CLSI (2012b). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
19. Coban A. Y. (2012). Rapid determination of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* clinical isolates by colorimetric methods. *Journal of clinical microbiology*. 50(7): 2191-2193
20. Doi Y., Adams J. M., Yamane K., Paterson D. L. (2007). Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 51(11): 4209-4210
21. Doi Y., Wachino J.I., Arakawa Y. (2016). Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infectious Disease Clinics of North America*. 30: 523–537
22. Domig K.J., Kiss H., Petričević L., Viernstein H., Unger F., Kneifel W. (2014). Strategies for the evaluation and selection of potential vaginal probiotics from human sources: an exemplary study. *Beneficial Microbes*. 5(3): 263-272
23. Dundar A.N., Cinar A., Altuntas S., Ulubayram N., Taner G., Dagdelen A.F., Demircan H. Ora, R.A. (2022). The role of microencapsulation in maintaining biological activity of royal jelly: comparison with biological activity and bioaccessibility of microencapsulated, fresh and lyophilized forms during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*
24. Ebenhan T., Gheysens O., Kruger H.G., Zeevaart J.R., Sathekge M.M. (2014). Antimicrobial Peptides: Their Role as Infection-Selective Tracers for Molecular Imaging. *Biomed Research International*
25. Eshraghi, S. (2005). An evaluation of the potent inhibitory effects of royal jelly fractions against *Streptomyces bacteria*. *Pak. Journal of Medical Science*. 21(1): 63-68
26. Falagas M., Rafailidis P. (2009) Nephrotoxicity of colistin: new insight into an old antibiotic. *Clinical Infectious Disease*. 48: 1729–31
27. Feng H., Guo L., Gao H., Li X.A. (2011). Deficiency of calcium and magnesium induces apoptosis via scavenger receptor BI. *Life Science*. 88(13-14): 606-12
28. Fernández-Cuenca F., Martínez-Martínez L., Conejo M. C., Ayala J. A., Perea E. J., Pascual A. (2003). Relationship between β -lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51(3): 565-574

29. Fernandez-Cuenca F., Martinez-Martinez L., Conejo M.C., Ayala J.A., Perea E.J., Pascual A. (2003). Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicilin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 565 – 574
30. Fontana R., Mendes M.A., De Souza B.M., Konno K., Cesar L.M., Malaspina O., Palma M.S. (2004). Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*. 25: 919-28
31. Fournier P. E., Vallenet D., Barbe V., Audic S., Ogata H., Poirel L., Claverie, J. M. (2006). Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLOS genetics*. 2(1): 7
32. Francey T., Gaschen F., Nicolet J., Burnens A. P. (2000). The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 14(2): 177-183
33. Fratini F., Cilia G., Mancini S., Felicioli A. (2016). Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiological Research*. 192: 130-141
34. Fujita T., Kozuka-Hata H., Ao-Kondo H., Kunieda T., Oyama M., Kubo T. (2012). Proteomic Analysis of the Royal jelly and Characterization of the Functions of its Derivation Glands in the Honeybee. *Journal of Proteome Research*. 12(1): 404–11
35. Garcia M. C., Finola M. S., Marioli J. M. (2010). Antibacterial activity of Royal Jelly against bacteria capable of infecting cutaneous wounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 2(3): 93-99
36. Garcia M.C., Finola M.S., Marioli J.M. (2013). Bioassay directed identification of royal jelly's active compounds against the growth of bacteria capable of infecting cutaneous wounds. *Advances in Microbiology*. 3: 138-44
37. Glasner C., Albiger B., Buist G., Tambic Andrasevic A., Canton R., Carmeli Y., Friedrich A.W., Giske C.G., Glupczynski Y., Gniadkowski, M., Livermore D.M., Nordmann P., Poirel L., Rossolini G.M., Seifert H., Vatopoulos T., Woodford N., Donker T., Monnet D.L., Grundmann H. (2013). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries. 18
38. Golan Y. (2015). Empiric therapy for hospital-acquired, Gram-negative complicated intra-abdominal infection and complicated urinary tract infections: A systematic literature review of current and emerging treatment options. *BMC Infectious Disease*. 15: 313
39. Hamouda A., Amyes S.G. (2004). Novel gyrA and parC point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54: 695–696
40. Han B., Li C., Zhang L., Fang Y., Feng M., Li J. (2011). Novel RoyalJelly Proteins Identified by Gel-Based and Gel-free Proteomics. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 59(18): 10346-55

41. Hooper D.C., Jacoby G.A. (2016). Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 6(9)
42. Houang E. T., Chu Y. W., Leung C. M., Chu K. Y., Berlau J., Ng K. C., Cheng A. F. B. (2001). Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. Journal of Clinical Microbiology. 39(1): 228-234
43. Howard A., O'Donoghue M., Feeney A., Sleator R.D. (2012). *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. Virulence. 3(3): 243-50
44. Jain N., Jansone I., Obidenova T., Simanis R., Meisters J., Straupmane D., Reinis A. (2021). Antimicrobial Resistance in Nosocomial Isolates of Gram-Negative Bacteria: Public Health Implications in the Latvian Context. Antibiotics (Basel). 10(7): 791
45. Jain R., Danziger L.H. (2004). Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. Annals of Pharmacotherapy. 38(9): 1449-59
46. Jimenez-Castellanos J.C., Wan Nur Ismah W.A.K., Takebayashi Y., Findlay, J., Schneiders T., Heesom K.J., Avison M.B. (2018). Envelope proteome changes driven by RamA overproduction in *Klebsiella pneumoniae* that enhance acquired beta-lactam resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 73: 88–94
47. Kamakura M. (2011). Royalactin induces queen differentiation in honeybees. Nature. 473: 478-83
48. Krause K.M., Serio A.W., Kane T.R., Connolly L.E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 6
49. Kristich C. J., Rice L. B., Arias C. A. (2014). Enterococcal infection - Treatment and antibiotic resistance. U: Gilmore M. S., Clewell D. B., Ike Y., Shankar N.: *Enterococci*: from commensals to leading causes of drug resistant infection. Boston: Massachusetts. Eye and Ear Infirmary
50. Kumar P., Kizhakkedathu J., Straus S. (2018). Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. Biomolecules. 8: 4
51. Li J., Rayner C. R., Nation R. L., Owen R. J., Spelman D., Tan K. E., Liolios L. (2006). Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 50(9): 2946-2950
52. Li J.K., Feng M., Zhang L., Zhang Z.H., Pan Y.H. (2008). Proteomics analysis of Major Royal Jelly Protein changes under different storage conditions. Journal of Proteome Research. 7: 3339-53
53. Livermore D.M. (2005). Tigecycline: What is it, and where should it be used? Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 56: 611–614
54. López Romo A., Quirós R. (2019). Appropriate use of antibiotics: an unmet need. Therapeutic Advances in Urology
55. Mancuso G., Midiri A., Gerace E., Biondo C. (2021). Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. Pathogens. 10(10): 1310

56. Martin R.M., Bachman M.A. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 8: 4
57. Martinez J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*. 11: 33-39
58. Melliou E., Chinou I. (2005). Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 8987-8992
59. Mierzejewski M. (2014). The antimicrobial effects of royal jelly, propolis and honey against bacteria of clinical significance in comparison to three antibiotics. College of Arts and Sciences/Biology. University of New Haven
60. Milaković M. (2020). Utjecaj otpadnih voda farmaceutskih industrija na razvoj i širenje otpornosti na antibiotike. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet
61. Mulani Mansura S., Kamble Ekta E., Kumkar Shital N., Tawre Madhumita S., Pardesi Karishma R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology*. 10
62. Naeem A., Badshah S.L., Muska M., Ahmad N., Khan K. (2016). The Current Case of Quinolones: Synthetic and Antibacterial Activity. *Molecules*. 21: 268
63. Navon-Venezia S., Kondratyeva K., Carattoli A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 41: 252–275
64. Nikaido H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(4): 593-656
65. Oršolić N. (2013). Učinkovitost biološki aktivnih sastavnica matične mliječi: analiza i standardizacija. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Zagreb
66. Pandey B.K., Srivastava S., Singh M., Ghosh J.K. (2011). Inducing toxicity by introducing a leucinezipper - like motif in frog antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemical Journal*. 436(3): 609 –20
67. Park H. G., Kim B. Y., Park M. J., Deng Y., Choi Y. S., Lee K. S., Jin B. R. (2019). Antibacterial activity of major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 22(3): 737-741
68. Pasupuleti V.R., Sammugam L., Ramesh N., Gan S.H. (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*
69. Peleg A. Y., Adams J., Paterson D. L. (2007a). Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(6): 2065-2069
70. Peleg A. Y., Potoski B. A., Rea R., Adams J., Sethi J., Capitano B., Paterson D. L. (2007b). *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59(1): 128-131

71. Peleg A.Y., Seifert H., Paterson D.L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 21(3):5 38-82
72. Poirel L., Jayol A., Nordmann P. (2017). Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*. 30(2): 557-596
73. Quale J., Bratu S., Landman D., Heddurshetti R. (2003). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clinical Infectious Diseases*. 37(2): 214-220
74. Rahal, J. J., Urban C. (2000). *Acinetobacter*. *Semin. Respir. Crit. Care Med*. 21: 341-348
75. Ratajczak M., Kaminska D., Matuszewska E., Holderna-Kedzia, E. Rogacki J., Marysiak J. (2021). Promising Antimicrobial properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Molecules*. 26(4007)
76. Redgrave L.S., Sutton S.B., Webber M.A., Piddock L.J. (2014). Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*. 22: 438–445
77. Repinec D. (2021). Utjecaj ozona na vrste *Klebsiella pneumoniae* rezistentne na karbapenem i kolistin. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet. citirano: 31.05.2022
78. Rosmilah M., Shahnaz M., Patel G., Lock J., Rahman D., Masita A., Noormalin A. (2008). Characterization of major allergens of royal jelly *Apis mellifera*. *Tropical Biomedicine*. 25: 243-51
79. Ruiz M., Marti S., Fernandez-Cuenca F., Pascual A., Vila J. (2007). Prevalence of IS *Aba1* in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *FEMS Microbiology Letters*. 274(1): 63-66
80. Ruzin A., Visalli M.A., Keeney D., Bradford P.A. (2005). Influence of transcriptional activator RamA on expression of multidrug efflux pump AcrAB and tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49: 1017–1022
81. Sabatini A. G., Marcazzan G. L., Caboni M. F., Bogdanov S., Almeida-Muradian L. B. D. (2009). Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 1(1): 1-6
82. Sabee M. M., Awang M. S., Bustami Y., Hamid Z. A. (2020). Gentamicin loaded PLA microspheres susceptibility against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by Kirby-Bauer and micro-dilution methods. *AIP Conference Proceedings*. 2267: 020032
83. Sagona S., Turchi B., Fratini F., Giusti M., Torracca B., Nuvoloni R., Cerri D., Felicioli A. (2015). Preliminary evaluation of glucose oxidase and its products in vitro antimicrobial activities on *Paenibacillus larvae* ATCC9545 vegetative form. *Bull Insect*. 68(2): 233-7
84. Schmidt J. O. Buchmann S. L. (1992). Other products of the hive. In: *The Hive and the Honey Bee*. 927-988

85. Shen L., Liu D., Li M., Jin F., Din M., Parnell L.D., Lai C.Q. (2012). Mechanism of action of recombinant Acc-Royalisin from royal jelly of Asian honeybee against Gram-positive bacteria. *PLOS ONE*. 7:10
86. Shon A.S., Bajwa R.P., Russo T.A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence*. 4: 107–118
87. Simuth J., Bilikova K., Kovacova E., Kuzmova Z., Schroder W. (2004). Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF-alpha release is a regular component of honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 2154-8
88. Švec P., Vancanneyt M., Seman M., Snauwaert C., Lefebvre K., Sedláček I., Swings J. (2005). Evaluation of (GTG) 5-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiology Letters*. 247(1): 59-63
89. Tamura S., Kono T., Harada C., Yamaguchi K., Moriyama T. (2009). Estimation and characterisation of major royal jelly proteins obtained from the honeybee *Apis mellifera*. *Food Chemistry*. 114: 1491-7
90. Thomas C., Nielsen K. (2005). Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Natur Reviews Microbiology*. 3: 711–721
91. Turton J.F., Kaufmann M.E., Gill M.J., Pike R., Scott P.T., Fishbain J., Craft D., Deye G., Riddell S., Lindler L.E., Pitt T.L. (2006). Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(7): 2630-4
92. Wang G., Zhao G., Chao X., Xie L., Wang H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research Public Health*. 17(17): 6278
93. Wright GD. 2016. Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance. *Trends in Microbiology*. 24:862–871
94. Yang N.J., Hinner M.J. (2015). Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. *Methods in Molecular Biology*. 1266: 29-53
95. Yang X., Wang T., Wang R. (2014). Antibacterial Activity and Mechanism of Action of 10-HDA against *Escherichia coli*. In: *Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012)*. Springer. Berlin. 585-595
96. Yang Y.C., Chou W.M., Widowati D. A., Lin I.P., Peng C.C. (2018). 10-hydroxy-2-decenoic acid of royal jelly exhibits bactericide and anti-inflammatory activity in human colon cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 18(1): 202
97. Yigit H., Queenan A., Anderson G., Domenech-Sanchez A., Biddle J., Steward C., Alberti S., Bush K., Tenover F.C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45: 1151–61
98. Yutin N. (2013). Horizontal Gene Transfer. Editor(s): Stanley Maloy, Kelly Hughes, *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*. Academic Press. 530-53

8. Prilozi

POPIS KRATICA

%	postotak
°C	stupanj celzijusa
μl	mikrolitar
μm	mikrometar
10-HDA	<i>trans</i> -10-hidroksi-2-dekanska kiselina
Ag	srebro
Al	aluminij
As	arsen
Au	zlato
a_w	aktivitet vode
BHI	Brain Heart Infusion Agar
Bi	bizmut
Ca	kalcij
CDC	Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CFU	jedinice koje formiraju kolonije (engl. <i>Colony-forming unit</i>)
CLSI	Institut za kliničko-laboratorijske standarde (engl. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
CPE	karbapenemaza producirajućih enterobakterija (engl. <i>carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i>)
Cr	krom
CRA	karbapenemaza producirajući acinetobakteri (engl. <i>carbapenem-resistant acinetobacter</i>)
Cu	bakar
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina, (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ESBL	β-laktamaza proširenog spektra (engl. <i>Extended spectrum β-lactamase</i>)
Fe	željezo
g	gram
GOx	glukoza oksidaza
h	sat
H ₂ O	voda
IRB	Institut „Ruđer Bošković“
K	kalij
kB	kilobaza
KFM	Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“

LPS	lipopolisaharidi
MBK	minimalna baktericidna koncentracija
MDR	višestruko otporne bakterije (engl. <i>Multi drug resistant bacteria</i>)
Mg	magnezij
mg	miligram
MH	Mueller-Hinton agar
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
min	minuta
mL	mililitar
mm	milimetar
mM	miliMol
Mn	mangan
MRJPs	glavni proteini matične mliječi (engl. <i>Major royal jelly proteins</i>)
n	brojnost jedinki
Na	natrij
NaCl	natrijev klorid
ng	nanogram
Ni	nikal
P	fosfor
pH	negativni logaritam množinske koncentracije vodikovih iona u otopini
REMA	metoda mikrodilucije uz dodatak resazurina (engl. <i>Resazurin Microplate Assay</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
S	sumpor
Sb	antimon
Sn	kositar
SEM	skenirajući elektronski mikroskop
spp.	vrste
Ti	titanij
UPGMA	neponderirani aritmetički prosjek uparene grupe (engl. <i>Unweight Paired Group Arithmetic Average</i>)
xg	relativna centrifugalna snaga
Zn	cink
W	volfram
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organisation</i>)

Životopis

Monika Kosec rođena je 03.01.1999. godine u Varaždinu. Djetinjstvo je provela na selu pokraj Varaždina. Završivši osnovnu školu Petra Zrinski u Jalžabetu, upisala je Graditeljsku, prirodoslovnu i rudarsku srednju školu u Varaždinu, smjera prehrambeni tehničar koju je pohađala od 2013. – 2017. Nakon srednje škole odlučila je upisati Agronomski fakultet u Zagrebu, studij Ekološka poljoprivreda. Završni rad na temu „Zaštita povrtnjaka od štetnika sadnjom repelentnih i insekticidnih biljnih vrsta“ obranila je 2020. godine i stekla titulu Sveučilišne prvostupnice inženjerke ekološke poljoprivrede. Iste te godine upisala je diplomski studij Agroekologije usmjerenja Mikrobne biotehnologije u poljoprivredi. Tijekom studija sudjeluje u natječaju i osvaja Rektorovu nagradu za znanstveni rad u akademskoj godini 2021/2022. s naslovom rada "Djelovanje medljikovca na karbapenem rezistentne *Klebsiella pneumoniae* i vankomicin rezistentne *Enterococcus faecium* sojeve" pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirne Mrkonjić Fuka. Stručnu praksu je odradila u laboratoriju Agronomskog fakulteta na Zavodu za mikrobiologiju. Od stranih jezika tečno govori engleski. Do sad ima završena dva tečaja, na temu Proračunske tablice – Excel i Upoznavanje sa sintaksom jezika R i njegova primjena. Slobodno vrijeme uživa čitajući romane i aktivnostima na otvorenom poput planinarenja, bicikliranja, penjanja i scuba ronjenja.