

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Katarina D. Novović

Regulacija genske ekspresije i diverzitet CarO i
Omp33-36 porina roda *Acinetobacter* spp.

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Katarina D. Novović

Regulation of gene expression and diversity of
CarO and Omp33-36 porins in *Acinetobacter*
spp.

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018

Mentor: dr **Branko Jovčić**, Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Biološki fakultet, Beograd

Članovi komisije: dr **Milan Kojić**, Naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za
molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd
dr **Jelena Lozo**, Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Biološki fakultet, Beograd

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

Ovom prilikom želim da se zahvalim:

prof. dr Branku Jovčiću na nepresušnoj kreativnosti u eksperimentalnom radu, kao i na izuzetnoj pomoći tokom izrade i pisanja doktorske disertacije. Hvala na ukazanom poverenju, bezgraničnom optimizmu, strpljenju i upornosti;

dr Milanu Kojiću na dobronamernim savetima, nesebičnoj pomoći i usmeravanju tokom eksperimentalnog rada, kao i na kritičkoj oceni samog rada;

prof. dr Jeleni Lozo na korisnim sugestijama koje su unapredile ovu disertaciju, kao i na kritičkoj oceni rada.

Posebnu zahvalnost dugujem dragim dr Sanji Mihajlović, dr Zorici Vasiljević i dr Miroslavu Diniću, mom drugaru i saborcu, koji su dali izuzetan doprinos realizaciji ove disertacija.

Hvala dragoj Mariji što mi je priskakala u pomoć kad god je trebalo, kao i na komšijskim ćaskanjima koja su uvek odlično išla uz rad.

Veliko hvala Milkici, Ceci, Emici i Duletu na svim divnim trenucima.

Zahvalnost za divne saradnje i lepe trenutke u laboratoriji dugujem i Amareli, Đorđu, Nataši, Ivani, Jeleni B., Kaći, Maji, Mici, Dušanki, Brankici, Nemanji M., Jeleni Đ., Jovanki, Goranu, Nemanji S., Nikoli, Mini, kao i bivšem članu naše laboratorije, Goci.

Hvala i dragim masterašima Jovani, Borisu, Banetu i Tijani, sa kojim je bilo zadovoljstvo sarađivati.

Naročitu zahvalnost dugujem mojim roditeljima i Teki, kao i kumićima i drugarima na bezgraničnom strpljenju i podršci, ali i na svim prelepim trenucima koji su ovaj period učinili prijatnijim.

Regulacija genske ekspresije i diverzitet CarO i Omp33-36 porina roda *Acinetobacter* spp.

REZIME

Vrste roda *Acinetobacter*, pre svih *Acinetobacter baumannii*, su u poslednjih nekoliko decenija od komensalnih stanovnika zdravstvenih ustanova evoluirale u jednu od najozbiljnijih pretnji savremenog zdravstvenog sistema. Globalno rasprostranjenje i konstantan porast izolata *Acinetobacter* spp. rezistentnih na karbapeneme, antibiotike poslednjeg izbora u lečenju infekcija izazvanih Gram-negativnim bakterijama, pozicionira ovu grupu bakterija na sam vrh liste patogena za koje je neophodan urgentan pronalazak novih efikasnih antimikrobnih terapeutika. Kontinuirani nadzor nad *Acinetobacter* spp. rezistenim na karbapeneme, koji podrazumeva praćenje klonalnog širenja i utvrđivanje molekularnih mehanizama odgovornih za rezistenciju na ovu grupu antibiotika, je prvi korak u uspešnom ograničavanju diseminacije navedenih patogenih bakterija. Saznanja o prirodni signala iz spoljašnje sredine, koji mogu uticati na nivo rezistencije na antibiotike i virulencije, ukazuju na uslove pogodne za opstanak *A. baumannii* i idejno usmeravaju ka pronalasku novih terapeutika. Pored toga, formulacija efikasne vakcine, kao izuzetno značajnog antiinfektivnog agensa, predstavlja jedan od imperativa u eliminaciji infekcija izazvanih višestruko rezistentnim sojevima *A. baumannii*.

U skladu sa prethodno navedenim, ova teza je imala za cilj da molekularno okarakteriše izolate *A. baumannii* rezistentne na karbapeneme uzorkovane u periodu od 2012. do 2014. godine na Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić” (Beograd, Srbija) (n=28). Analizirani izolati *A. baumannii* su pripadali trima klonalnim grupama karakterističnim za Evropu (Evropski klonovi I-III) sa izuzetkom jednog izolata (8778), koji nije pripadao nijednoj od ove tri grupe. Evropski klon II, najuspešniji bolnički Evropski klon, je takođe bio najzastupljeniji i među izolatima iz Srbije (67,86%). PFGE metodom izolati *A. baumannii* rezistenti na karbapeneme su grupisani u dva klastera (I i II), koja su obuhvatala četiri pulсотipa (A-D). Sličnost izolata se kretala od 85% do skoro 100%. Budući da je metodom zasnovanom na sekvencama tri gena i PFGE ustanovljena raznovrsnost izolata *A. baumannii*, može se zaključiti da nije došlo do klonalnog širenja datih izolata unutar bolničke ustanove u kojoj su uzorkovani.

PCR metodom je detektovano prisustvo gena za urođene β -laktamaze (AmpC cefalosporinazu i OXA-51 oksacilinazu) kod svih izolata *A. baumannii* rezistentnih na

karbapeneme. Takođe, određeni testirani izolati su posedovali gene za stečene karbapenemaze klase D OXA-23 (57,14%), OXA-24 (82,14%) i OXA-58 (39,29%), kao i IS*Aba1* sekvencu pozicioniranu uzvodno od *bla*_{AmpC} (46,43%), *bla*_{OXA-51} (3,57%) i *bla*_{OXA-23} (35,71%) gena. Kod dva izolata rezistenciji na karbapeneme je doprinio i porin CarO usled insercije inaktivacije gena koji ga kodira. Stečene karbapenemaze klase A (KPC), B (IMP, VIM i NDM-1) i D (OXA-143 i OXA-235), i porin Omp33-36 nisu bili uključeni u rezistenciju na karbapeneme kod izolata *A. baumannii* poreklom iz Srbije.

Drugi cilj ove teze se odnosio na ispitivanje uticaja različitih signala (faze rasta, subinhibitorne koncentracije karbapenema, hipoksije, kontakta sa keratinocitama i imunskim ćelijama) na transkripciju gena za porine CarO i Omp33-36 kliničkih sojeva *A. baumannii*. Dobijeni rezultati ukazuju da ekspresija *carO* i *omp33-36* gena zavisi od faze rasta bakterija, ali i da je ta zavisnost specifična za pojedinačne sojeve *A. baumannii*. Generalno, subinhibitorne koncentracije karbapenema dovode do smanjenja transkripcije *carO* i *omp33-36* gena kod kliničkih sojeva *A. baumannii*, i to u izraženijoj meri kod soja osetljivog na karbapeneme u odnosu na sojeve koji su rezistentni na ovu grupu antibiotika. Takođe, uočeno je da subinhibitorna koncentracija meropenema, za razliku od imipenema, u stacionarnoj fazi rasta stimuliše transkripciju *carO* gena. Ovo zapažanje je u skladu sa činjenicom da je u okviru porina CarO pronađeno mesto za vezivanje imipenema, ali ne i meropenema. Uslovi snižene koncentracije kiseonika (hipoksija) ne utiču na transkripciju *carO* gena, ali dovode do smanjenja transkripcije *omp33-36* gena. Kontakt *A. baumannii* sa keratinocitama čoveka i imunskim ćelijama pacova značajno stimuliše transkripciju *carO* i *omp33-36* gena. Budući da citotoksični efekat pojedinačnih sojeva *A. baumannii* na keratinocite i imunske ćelije ne koreliše sa transkripcijom *carO* i *omp33-36* gena, pretpostavljeno je da sojevi uključeni u ovu analizu poseduju faktore virulencije koji imaju različit citotoksični efekat, kao i da postoji mogućnost regulacije ekspresije *carO* i *omp33-36* gena na posttranskripcionom nivou. Sumarno, transkripcija *carO* i *omp33-36* gena regulisana signalima iz spoljašnje sredine može uticati na značaj ovih porina u rezistenciji na antibiotike (subinhibitorna koncentracija karbapenema i hipoksija) ili u virulenciji (kontakt sa ćelijama domaćina) *A. baumannii*.

Analizom nukleotidnih sekvenci *carO* gena izolata *A. baumannii* uključenih u ovu studiju ustanovljeno je prisustvo 5 različitih tipova alela *carO* gena (prvi tip alela je posedovalo 12 izolata, drugi 14, dok je treći, četvrti i peti tip alela posedovao po jedan izolat). Za razliku od

prva tri, četvrti i peti tip alela *carO* gena su bili inaktivirani ugradnjom različitih insercionih sekvenci. Pored toga, kod analiziranih izolati *A. baumannii* je ustanovljeno prisustvo dva tipa alela *omp33-36* gena (prvi tip *omp33-36* alela je posedovalo 16 izolata, a drugi 13 izolata). ML filogenetska analiza je predstavnike roda *Acinetobacter* (poreklom iz NCBI baze podataka i kolekcije *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme iz Srbije) prema aminokiselinskoj sekvenci CarO porina podelila u tri osnovne grupe (I-III), koje su obuhvatale šest varijanti (I grupa četiri, a II i III po jednu varijantu). Izolati *A. baumannii* uključeni u ovu analizu su bili podeljeni na varijantu I i varijantu III grupe I. Predstavnici roda *Acinetobacter* su prema aminokiselinskoj sekvenci Omp33-36 porina bili podeljeni u tri grupe (I-III), dok su izolati *A. baumannii* grupisani u četiri varijante (1-4; varijante 1 i 2 pripadaju grupi III, varijanta 3 grupi II, a varijanta 4 grupi I). Izolati *A. baumannii* poreklom iz Srbije su bili klasifikovani u varijantu 1 i varijantu 2 grupe III. PRED-TMBB predikcijom transmembranske topologije CarO porina je ustanovljeno da ovaj porin čine 10 transmembranskih regiona sastavljenih od β -lanaca (β 1- β 10) i 5 petlji usmerenih ka vanćelijskoj sredini (L1-L5) kod svih opisanih varijanata, dok se organizacija Omp33-36 razlikovala među varijantama od 11 (β 1- β 11) do 14 transmembranskih regiona sastavljenih od β -lanaca (β 1- β 14) i od pet (L1-L5) do sedam petlji usmerenih ka vanćelijskoj sredini (L1-L7). Analiza varijabilnosti pojedinačnih pozicija aminokiselina CarO i Omp33-36 porina je ukazala na izuzetnu polimorfnost datih porina (64% i 86%, redom). Broj varijabilnih i hipervarijabilnih regiona je iznosio po 2, a konzervisanih 4 kod sve tri CarO grupe. Različite grupe Omp33-36 su posedovale od 4 do 6 varijabilnih regiona, kao i 4 ili 5 konzervisanih regiona. N-terminalno pozicioniran konzervisani motiv za sve tri CarO grupe je bio AEVGTGTYG, a za sve tri Omp33-36 grupe PLAEEAFL. Navedene osobine porina CarO i Omp33-36, kao i činjenica da njihovi konzervisani motivi imaju unutarćelijsku ili transmembransku lokalizaciju, dovode do zaključka da se ovi proteini spoljašnje membrane ne mogu smatrati adekvatnim kandidatima za profilaktičku i terapeutsku imunizaciju. Jedini potencijalni antigen, koji bi mogao biti iskorišćen za proizvodnju vakcine, je PLAEEAFL motiv Omp33-36 grupe II, budući da je samo u ovoj grupi bio lokalizovan u petlji okrenutoj ka spoljašnjoj sredini (L2). PROVEAN analizom je utvrđeno da većina aminokiselinskih razlika među CarO, kao i Omp33-36 porinima, ne bi trebalo da ispoljava efekat na biološku funkciju datih proteina.

Ključne reči: *Acinetobacter*, *Acinetobacter baumannii*, rezistencija na karbapeneme, porini, CarO, Omp33-36, regulacija ekspresije gena, regulacija transkripcije gena, vakcine

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija prokariota

UDK: [579.253+615.015.8]:[615.33+615.281.9](043.3)

Regulation of gene expression and diversity of CarO and Omp33-36 porins in *Acinetobacter* spp.

ABSTRACT

The species of the genus *Acinetobacter*, primarily *Acinetobacter baumannii*, have evolved from the commensal residents of health care institutions into the most serious threats of the modern health care system during the last few decades. Global distribution and constant increase of *Acinetobacter* spp. resistant to carbapenems, antibiotics of the last choice in the treatment of Gram-negative bacterial infections, have positioned this group of bacteria at the top of the list of pathogens that require urgent discovery of novel effective antimicrobial therapeutics. Continuous surveillance of *Acinetobacter* spp. resistant to carbapenems, which involves clonal spread monitoring and determining the molecular mechanisms responsible for resistance to this group of antibiotics, is the first step in a successful dissemination limitation of these pathogenic bacteria. Knowing the nature of the environmental signals that can affect the level of antibiotic resistance and virulence indicates conditions suitable for the survival of *A. baumannii* and can direct the invention of new therapeutics. In addition, the formulation of an effective vaccine, as an important anti-infective agent, is one of the imperatives in the elimination of infections caused by a multidrug-resistant *A. baumannii* strains.

In accordance with the aforementioned, the aim of this thesis was molecular characterization of carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates sampled in the period from 2012 to 2014 at the Institute for Health Care of Mother and Child of Serbia "Dr Vukan Cupic" (Belgrade, Serbia). The analyzed *A. baumannii* isolates belonged to three clonal groups characteristic for Europe (European clones I-III) with the exception of one isolate (8778), which could not be classified to any of these three groups. European clone II, the most successful nosocomial European clone, was also the most frequent among isolates from Serbia (67.86%). Using PFGE method carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates have been classified into two clusters (I and II), which included four pulsotypes (A-D). The similarity of the isolates ranged from 85% to almost 100%. Since the trilocus sequence-based typing and PFGE revealed high diversity of the *A. baumannii* isolates, it can be concluded that there was no clonal spreading of the analyzed isolates within the hospital institution in which they were sampled.

The presence of the genes encoding for intrinsic β -lactamases (AmpC cephalosporinase and OXA-51 oxacillinase) was detected in all carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates by the PCR method. Also, some of tested isolates possessed the genes encoding acquired carbapenemases of the class D OXA-23 (57,14%), OXA-24 (82,14%) and OXA-58 (39,29%), as well as IS*Aba1* sequence positioned upstream of *bla*_{AmpC} (46,43%), *bla*_{OXA-51} (3,57%) and *bla*_{OXA-23} (35,71%) genes. In two isolates, CarO porin also contributed to the carbapenem resistance due to insertional inactivation of the gene encoding it. The acquired carbapenemases of class A (KPC), B (IMP, VIM and NDM-1) and D (OXA-143 and OXA-235) and Omp33-36 porin were not involved in carbapenem resistance in Serbian *A. baumannii* isolates.

The second goal of this thesis was to examine the influence of various signals (growth phase, subinhibitory carbapenem concentration, hypoxia, contact with keratinocytes and immune cells) on the transcription of genes encoding for porins CarO and Omp33-36 in clinical *A. baumannii* strains. The results obtained indicate that the *carO* and *omp33-36* expression depends on the bacterial growth phase, but also that this dependence is specific for each *A. baumannii* strain. In general, subinhibitory carbapenem concentrations lead to the decrease of the *carO* and *omp33-36* transcription in clinical *A. baumannii* strains, but in a greater extent in carbapenem-susceptible strain compared to isolates that are resistant to this group of antibiotics. It has also been observed that subinhibitory meropenem concentration, unlike imipenem, at the stationary growth phase stimulates the *carO* transcription. This observation is in line with the fact that within the CarO porin was found a imipenem binding site, but not site specific for meropenem. Conditions of reduced oxygen concentration (hypoxia) have no influence on the *carO* transcription, but lead to a decrease of the *omp33-36* transcription. Contact of *A. baumannii* with human keratinocytes and rat immune cells significantly stimulates the *carO* and *omp33-36* transcription. Since the cytotoxic effect of each *A. baumannii* strain on keratinocytes and immune cells was not in correlation with the *carO* and *omp33-36* transcription, it is assumed that the strains analyzed in this assay could possess various virulence factors that exhibit different cytotoxic effects, and there is also possibility that the *carO* and *omp33-36* expression is post-transcriptionally regulated. In summary, the transcription of the *carO* and *omp33-36* genes regulated by external signals can stimulate the role of these porins in antibiotic resistance (subinhibitory carbapenem concentration and hypoxia) or in virulence (contact with host cells) in *A. baumannii*.

The *carO* gene nucleotide sequences analysis of *A. baumannii* isolates included in this study has revealed the presence of 5 different *carO* gene allele types (12 isolates possessed the first allele type, 14 the second, while the third, fourth and fifth allele type possessed one isolate). Unlike the first three, the fourth and fifth *carO* gene allele types were inactivated by different insertional sequences. Further, in analyzed *A. baumannii* isolates has been established the presence of two *omp33-36* gene allele types (the first *omp33-36* allele type possessed 16 isolates and the second 13 isolates). ML phylogenetic analysis divided the genus *Acinetobacter* representatives (originating from the NCBI database and *A. baumannii* from Serbia), according to the CarO porin amino acid sequences, into three basic groups (I-III), which included six variants (I group included four, and in II and III groups was included one variant). *A. baumannii* isolates involved in this study were divided into variant I and variant III of group I. Representatives of the genus *Acinetobacter* were classified into three groups (I-III) according to the Omp33-36 amino acid sequences, while *A. baumannii* isolates were grouped in four variants (1-4; variants 1 and 2 belong to group III, variant 3 to group II and variant 4 to group I). *A. baumannii* isolates originating from Serbia were classified in variant 1 and variant 2 of group III. The PRED-TMBB prediction of the CarO porin transmembrane topology has revealed that this porin contains 10 transmembrane regions composed of the β -chains (β 1- β 10) and 5 extracellular loops (L1-L5) in all described variants, while Omp33-36 distinguished between variants from 11 (β 1- β 11) to 14 transmembrane regions composed of the β -chains (β 1- β 14) and from five (L1-L5) to seven extracellular loops (L1-L7). The individual amino acid positions variability analysis of the CarO and Omp33-36 indicated that these porins were significantly polymorphic (64% and 86%, respectively). The number of variable and hypervariable regions was 2, and conserved 4 in all three CarO groups. Different groups of Omp33-36 possessed from 4 to 6 variable regions, as well as 4 or 5 conserved regions. The N-terminally positioned conserved motif in all three CarO groups was AEVGTTGYG, and in all three Omp33-36 groups PLAEEAFL. Aforementioned characteristics of CarO and Omp33-36, as well as the fact that their conserved motifs have intracellular or transmembrane localization, lead to the conclusion that these outer membrane proteins could not be considered as adequate candidates for prophylactic and therapeutic immunization. The only potential antigen that could be used for the vaccine production is the PLAEEAFL motif of Omp33-36 group II, since only in this group is localized in a extracellular

loop (L2). The PROVEAN analysis showed that most of the amino acid differences between CarO, as well as Omp33-36 porins, should not affect the biological function of these proteins.

Keywords: *Acinetobacter*, *Acinetobacter baumannii*, carbapenem resistance, porins, CarO, Omp33-36, gene expression regulation, transcriptional gene expression regulation, vaccines

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology of prokaryotes

UDC: [579.253+615.015.8]:[615.33+615.281.9](043.3)

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1. 1. Rod <i>Acinetobacter</i>	1
1. 1. 1. Vrsta <i>Acinetobacter baumannii</i>	3
1. 2. Rezistencija na karbapeneme	7
1. 2. 1. Karbapenemi	7
1. 2. 2. Mehanizmi rezistencije na karbapeneme	9
1. 2. 3. Mehanizmi rezistencije na karbapeneme kod <i>A. baumannii</i>	11
1. 3. Porini	14
1. 3. 1. Porini odgovorni za rezistenciju na karbapeneme kod <i>A. baumannii</i>	16
1. 3. 1. 1. CarO.....	16
1. 3. 1. 2. Omp33-36	19
1. 3. 1. 3. Ostali porini odgovorni za rezistenciju na karbapeneme kod <i>A. baumannii</i>	20
1. 4. Neantibiotske terapije infekcija izazvanih <i>A. baumannii</i>	21
1. 4. 1. Vakcine	22
2. Cilj rada.....	25
3. Materijal i metode.....	27
3. 1. Bakterijski izolati	27
3. 2. Identifikacija bakterijskih izolata.....	28
3. 3. Genotipizacija izolata <i>Acinetobacter baumannii</i> rezistentnih na karbapeneme.....	29
3. 3. 1. Identifikacija klonalnih grupa <i>A. baumannii</i>	29
3. 3. 2. Gel elektroforeza u pulsirajućem polju („Pulsed-Field Gel Electrophoresis”, PFGE)	30
3. 4. Medijumi za rast bakterija.....	32
3. 5. Određivanje osetljivosti na β -laktamske antibiotike.....	32
3. 6. Metoda za izolaciju totalne DNK.....	33
3. 7. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom	34
3. 8. Elektroforeza DNK	39
3. 9. Kultivacija <i>A. baumannii</i> u uslovima stresa.....	40
3. 9. 1. Kultivacija <i>A. baumannii</i> u prisustvu subinhibitorne koncentracije karbapenema tokom različitih faza rasta	40
3. 9. 2. Kultivacija <i>A. baumannii</i> u hipoksičnim uslovima	40
3. 10. Infekcija eukariotskih ćelija sa <i>A. baumannii</i>	41

3. 10. 1. Infekcija HaCaT keratinocita čoveka sa <i>A. baumannii</i>	41
3. 10. 2. Infekcija imunskih ćelija pacova sa <i>A. baumannii</i>	41
3. 11. Test citotoksičnosti <i>A. baumannii</i>	42
3. 12. Metode rada sa RNK iz bakterijskih ćelija.....	43
3. 12. 1. Metoda za izolaciju RNK iz bakterijskih ćelija	43
3. 12. 2. Metoda za prečišćavanje RNK od DNK molekula	43
3. 12. 3. Reverzna transkripcija RNK	43
3. 13. Metoda transkripcione analize RT-qPCR („Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction”).....	44
3. 14. Bioinformatička analiza CarO i Omp33-36 porina	45
3. 14. 1. Analiza nukleotidnih sekvenci <i>carO</i> i <i>omp33-36</i> gena izolata <i>A. baumannii</i> poreklom iz Srbije	45
3. 14. 2. Pretraga aminokiselinskih sekvenci CarO i Omp33-36 porina.....	46
3. 14. 3. Filogenetska analiza CarO i Omp33-36 porina.....	46
3. 14. 4. Predikcija topologije CarO i Omp33-36 porina.....	46
3. 14. 5. Analiza polimorfnosti CarO i Omp33-36 porina i varijabilnosti njihovih regiona.....	47
3. 14. 6. Uticaj varijabilnosti aminokiselina CarO i Omp33-36 na biološku ulogu.....	47
3. 15. Statistička obrada rezultata.....	47
4. Rezultati	49
4. 1. Identifikacija bakterijskih izolata	49
4. 2. Genotipizacija izolata <i>A. baumannii</i> rezistentnih na karbapeneme.....	49
4. 2. 1. Identifikacija klonalnih grupa <i>A. baumannii</i>	49
4. 2. 2. PFGE analiza	50
4. 3. Osetljivost na β -laktamske antibiotike.....	52
4. 4. Molekularne determinante rezistencije na β -laktamske antibiotike.....	54
4. 4. 1. Distribucija molekularnih determinanti rezistencije na β -laktamske antibiotike među klonalnim grupama <i>A. baumannii</i>	56
4. 5. Uticaj stresa na transkripciju <i>carO</i> i <i>omp33-36</i> gena.....	56
4. 5. 1. Uticaj faze rasta i subinhibitorne koncentracije karbapenema na transkripciju <i>carO</i> i <i>omp33-36</i> gena.....	56
4. 5. 2. Uticaj hipoksije na transkripciju <i>carO</i> i <i>omp33-36</i> gena	62
4. 6. Uticaj kontakta <i>A. baumannii</i> sa eukariotskim ćelijama na transkripciju <i>carO</i> i <i>omp33-36</i> gena	63
4. 6. 1. Uticaj kontakta <i>A. baumannii</i> sa HaCaT keratinocitama čoveka na transkripciju <i>carO</i> i <i>omp33-36</i> gena.....	63
4. 6. 2. Uticaj kontakta <i>A. baumannii</i> sa imunskim ćelijama pacova na transkripciju <i>carO</i> i <i>omp33-36</i> gena.....	64

4. 7. Citotoksični efekat <i>A. baumannii</i> na HaCaT i imunske ćelije	65
4. 8. Bioinformatička analiza CarO i Omp33-36 porina	66
4. 8. 1. Nukleotidne sekvence <i>carO</i> i <i>omp33-36</i> gena izolata <i>A. baumannii</i> poreklom iz Srbije	66
4. 8. 2. Filogenetski profili CarO i Omp33-36 porina.....	67
4. 8. 3. Transmembranski topološki profili CarO i Omp33-36 porina.....	71
4. 8. 4. Polimorfnost CarO i Omp33-36 porina i varijabilnost njihovih regiona	73
4. 8. 5. Predikcija uticaja varijabilnosti aminokiselina CarO i Omp33-36 porina na njihovu biološku ulogu	76
5. <i>Diskusija</i>	81
6. <i>Zaključci</i>	92
7. <i>Literatura</i>	95
8. <i>Prilozi</i>	117
Prilog 1.	117
Prilog 2.	117
Prilog 3.	118

1. Uvod

1. 1. Rod *Acinetobacter*

Rod *Acinetobacter* (familija *Moraxellaceae*, red *Pseudomonadales*, klasa *Gammaproteobacteria*) predstavljaju Gram-negativne, striktno aerobne, nefermentišuće, loptasto-štapice bakterije (kokobacili). Dimenzije bakterijskih ćelija roda *Acinetobacter* u logaritamskoj fazi rasta iznose od 1,5 do 2 µm po dužini i od 1 do 1,5 µm po širini, dok u stacionarnoj fazi često poprimaju kokoidan oblik. Sparivanje i grupisanje ćelija je česta pojava kod bakterija ovog roda. Kolonije koje formiraju na čvrstom medijumu su uglavnom glatke, ponekad mukoidne, bledo-žute do sivkaste boje dimenzija od 1 do 2 mm u prečniku. Većina sojeva može da raste na mineralnom medijumu sa malo hranljivih materija, koji sadrži amonijumove ili nitratne soli kao izvor azota i jedinstven izvor ugljenika i energije, kao što su acetat, laktat ili piruvat. Spektar organskih jedinjenja koja se mogu koristiti kao izvor ugljenika je širok, s tim da je broj vrsta koji mogu da koriste glukozu relativno mali. Optimalna temperatura rasta klinički značajnih vrsta je 37°C, dok sredinske vrste bolje rastu na nižim temperaturama. Iako naziv ovog roda potiče od grčke reči za nepokretljivost („a-kineto”), ustanovljeno je da predstavnici ovog roda imaju mogućnost kretanja (Clemmer et al., 2011). Svi predstavnici roda *Acinetobacter* su katalaza pozitivni i oksidaza negativni, a GC sastav im varira od 39 do 47% (Bergogne-Berezin i Towner, 1996; Visca et al., 2011).

Do danas su okarakterisane 64 vrste koje pripadaju rodu *Acinetobacter*, od čega su 54 vrste validno imenovane (<http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>). Budući da je identifikacija određenih vrsta ovoga roda do nedavno bila otežana, pojedini predstavnici roda su bili grupisani u komplekse (npr. *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* kompleks). Ovakav neadekvatan vid grupisanja vrsta koje su klinički značajne (*A. baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter seifertii* i *Acinetobacter dijkshoorniae*) sa onom koja to nije (*A. calcoaceticus*) je prevaziđen korišćenjem MALDI-TOF („Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight”) masene spektrometrije sa unapređenim bazama podataka (Cosgaya et al., 2016; Jeong et al., 2016).

Bakterije roda *Acinetobacter* su široko rasprostranjene u prirodi, ali i u bolničkim ustanovama. Pored prisustva u zemljištu i morskoj vodi, predstavnici ovog roda su detektovani i u mulju, močvarama, otpadnim vodama i na deponijama. Takođe, uočeni su i na poljima pirinča i repe, korenu duvana, kori bora i cvetnom nektaru. Vrste roda *Acinetobacter* su izolovane i iz kućnih ljubimaca (pasa i mačaka), konja, stoke, različitih vrsta ptica, riba i insekata. Prehrambeni proizvodi, kao što su povrće, meso, riba i mlečni proizvodi, su takođe opisani kao stanište predstavnika ovog roda. Pored svega prethodno navedenog, vrste roda *Acinetobacter* imaju i sposobnost kolonizacije kože ljudi. Najčešće opisane vrste kolonizatori ljudi su *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter radioresistens*, *A. pittii* i *Acinetobacter junii*, a najčešće kolonizovani delovi tela su ruke, prepone, regioni između nožnih prstiju, čeonu region, uši i unutrašnji deo lakti. Analizom mikrobiote respiratornih puteva zdravih ljudi, kao i uzoraka majčinog mleka uočeno je prisustvo predstavnika ovog roda (Al Atrouni et al., 2016). Najznačajnije mesto u savremenoj mikrobiologiji roda *Acinetobacter* zauzimaju predstavnici koji uzrokuju infekcije ljudi. Vrsta koja u najvećem broju prijavljenih slučajeva uzrokuje infekcije poreklom iz bolničkih ustanova je *A. baumannii*. *A. nosocomialis* i *A. pittii* takođe predstavljaju uzročnike unutarbolničkih infekcija, ali u manjoj meri u odnosu na *A. baumannii*. Pored prethodno navedenih, kao uzročnici unutarbolničkih infekcija su u sporadičnim slučajevima prijavljene i sledeće vrste: *Acinetobacter bereziniae*, *A. dijkshoorniae*, *Acinetobacter guillouiae*, *Acinetobacter haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, *Acinetobacter parvus*, *A. radioresistens*, *Acinetobacter schindleri*, *A. seifertii*, *Acinetobacter soli* i *Acinetobacter ursingii* (Visca et al., 2011; Cosgaya et al., 2016; Kishii et al., 2016). Kada je reč o infekcijama stečenim u vanbolničkoj sredini, *A. baumannii* se ponovo javlja kao najčešći uzročnik. Infekcije koje izazivaju drugi predstavnici roda *Acinetobacter* se mogu smatrati pojedinačnim primerima (*A. nosocomialis*, *A. junii* i *A. lwoffii*) (Dexter et al., 2015).

Osobine koje omogućavaju bakterijama roda *Acinetobacter* da opstanu u surovim uslovima spoljašnje sredine duži vremenski period su izuzetno širok spektar metaboličkih mogućnosti, kao i otpornost na isušivanje (Al Atrouni et al., 2016). Predstavnici ovog roda ostvaruju značajnu ulogu u bioremedijaciji usled sposobnosti razlaganja različitih zagađivača životne sredine. Takođe, u kompetitivnim uslovima produkuju molekule koji sprečavaju rast drugih vrsta, kao što su organske kiseline i biosurfaktanti (Cray et al., 2013).

1. 1. 1. Vrsta *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii predstavlja vrstu koja je tokom nekoliko prethodnih decenija od komensalnog stanovnika zdravstvenih ustanova prerasla u jednu od najozbiljnijih pretnji savremenog zdravstvenog sistema (Roca Subirà et al., 2012). Promene u kliničkoj praksi koje se smatraju odgovornim za porast učestalosti i ozbiljnosti infekcija izazvanim *A. baumannii* su sve češća upotreba invazivnih aparata (mehaničkih ventilatora, centralnih venskih i urinarnih katetera, endotrahealnih tubusa i cerebrospinalnih šantova) i antibiotskih agenasa (Wong et al., 2017).

Infekcije koje izaziva *A. baumannii* su u najvećem broju slučajeva bolničkog porekla. Procenjeno je da ova vrsta uzrokuje ~2% infekcija u zdravstvenim ustanovama u Evropi i Sjedinjenim Američkim Državama, dok je učestalost u Aziji dvostruko veća. Iako *A. baumannii* u većini slučajeva izaziva manji procenat infekcija u odnosu na druge klinički značajne Gram-negativne patogene bakterije, procenjena smrtnost pacijenata inficiranih ovom bakterijom je u nekim slučajevima znatno veća (Bulens et al., 2018; Harding et al., 2018). Učestalost infekcija izazvanih vrstom *A. baumannii* je naročito visoka na odeljenjima intenzivne nege, gde se javljaju kod teško obolelih pacijenata. Bolnički stečene infekcije koje izaziva *A. baumannii* su pneumonija, bakteremija, meningitis, infekcije urinarnog trakta i rana. Faktori koji povećavaju rizik infekcije ovom bakterijom su korišćenje prethodno navedenih invazivnih aparata, prethodna antibiotska terapija, ozbiljne povrede i opekotine, tretman imunosupresorima, operacije, produženi boravak u bolničkih ustanovama (posebno na odeljenju intenzivne nege), starost, dodatna oboljenja i prevremeno rođenje (Visca et al., 2011; ECDC, 2017). Ozbiljne povrede i opekotine žrtava zemljotresa širom sveta i ratova u Iraku i Avganistanu su doprinele povećanju broja infekcija uzrokovanih *A. baumannii* (Kempf i Rolain, 2012).

A. baumannii ima mogućnost izazivanja infekcija i van bolničkih ustanova, ali u daleko manjoj meri u odnosu na bolničke infekcije. Ovaj tip infekcija je po svemu sudeći klimatski predisponiran, budući da su prijavljeni slučajevi uglavnom iz azijsko-pacifičkog regiona u kom vlada topla i vlažna klima (Hong-Kong, Singapur, Tajvan, Južna Koreja i severna Australija). Takođe, uočena je i sezonska zavisnost infekcija izazvanih *A. baumannii*, jer je oko 80% infekcija detektovano u mesecima sa izraženijom vlagom. Najčešće opisan tip infekcija poreklom iz vanbolničke sredine izazvan *A. baumannii* je akutna pneumonija, koja može imati ozbiljne posledice (smrtnost do 64%). Pored ovog tipa infekcija, *A. baumannii* je prijavljen i kao

uzročnik hronične pneumonije, meningitisa, endokarditisa, infekcija urinarnog trakta i rana. Faktorima rizika za vanbolničke infekcije izazvane ovom bakterijom se smatraju konzumiranje alkohola i cigareta, kao i određenja oboljenja (dijabetes melitus, hronična bolest pluća i oboljenje bubrega) (Dexter et al., 2015). Iako postoje pretpostavke da bolnički izolati *A. baumannii* vode poreklo iz vanbolničke sredine, dosadašnje studije u većini slučajeva ne idu u prilog ovoj pretpostavci (Zeana et al., 2003; Peng et al., 2012; Dexter et al., 2015).

Za značajan klinički uspeh vrste *A. baumannii* odgovorna je izuzetna moć preživljavanja u bolničkim uslovima i unutar domaćina. Pored urođene otpornosti na brojne stresore poreklom iz spoljašnje sredine, plastičnost genoma ovoj bakteriji obezbeđuje brzu adaptaciju na izmenjene uslove u kojima se nalazi. Otpornost na isušivanje i dezinfekciona sredstva značajno doprinosi prolongiranju prisustva *A. baumannii* u bolničkim ustanovama. Etanol, najčešće korišćeno dezinfekciono sredstvo, u niskim koncentracijama može čak stimulisati rast i virulenciju *A. baumannii* (Harding et al., 2018). Pored toga, ova vrsta pokazuje izraženu sposobnost vezivanja kako za žive, tako i za nežive površine. Pili i fimbrije su esencijalne za inicijalnu adheziju bakterija, nakon čega dolazi do lučenja egzopolisaharida, koji predstavlja sastavni deo biofilma ovih bakterija. Zahvaljujući ovoj strukturi, koja *A. baumannii* štiti od spoljašnjih uticaja, predstavnici ove vrste imaju mogućnost dugog opstanka unutar bolnica. Česti su primeri formiranja biofilma na invazivnim medicinskim aparatima, koji u kontaktu sa pacijentima mogu direktno uzrokovati infekciju ovom bakterijom. Formiranje biofilma u domaćinu ovim bakterijama omogućava adheziju za ćelije, štiti ih od delovanja neutrofila i doprinosi rezistenciji u serumu. Pored zaštite od imunskog sistema domaćina, biofilm bakterije štiti i od terapijskih antibiotika (Gordon i Wareham, 2010; Harding et al., 2018). Faktori koji, takođe, doprinose virulenciji ove vrste su pokretljivost (pokretljivost asocirana sa površinom i putem trzaja), površinski glikokonjugati (lipopolisaharidi spoljašnje membrane-LPS, kapsularni polisaharidi i glikozilovani proteini), sekrecioni sistemi (tip I, II, IV, V i VI), fosfolipaze, vezikule spoljašnje membrane, porini (OmpA i Omp33-36) i sistemi za preuzimanje mikronutrijenata, kao što su gvožđe (acinetobaktin) i cink (ZnuABC99). Navedeni faktori su uključeni u različite vidove virulencije, poput izbegavanja imunskog odgovora domaćina, izazivanja inflamacije, rasta u serumu, transporta virulentnih faktora u ćelije domaćina, adhezije i invazije ćelija domaćina, indukcije apoptoze ćelija domaćina, stimulacije formiranja biofilma i

preuzimanja mikronutrijenata od domaćina (Roca Subirà et al., 2012; McConnell et al., 2013; Smani et al., 2013; Harding et al., 2018).

Izuzetno visok nivo rezistencije na antibiotike, pored prethodno navedenog, značajano doprinosi patogenom potencijalu vrste *A. baumannii*. Karakteristike, koje *A. baumannii* obezbeđuju rezistenciju na antibiotike, se mogu podeliti na urođene i stečene. Urođene osobine, kao što su niska propustljivost spoljašnje membrane i aktivan efluks antibiotika, ograničavaju njihov ulazak i zadržavanje u ćeliji. Niska propustljivost spoljašnje membrane je ostvarena produkcijom malog broja porina, čije su dimenzije manje u odnosu na porine drugih Gram-negativnih bakterija. Pored toga, produkcija efluks pumpi na niskom nivou obezbeđuje transport izvesne količine antibiotika van ćelije (Wong et al., 2017). *A. baumannii* poseduje i enzime koji hidrolizuju β -laktamske antibiotike, β -laktamaze (AmpC cefalosporinazu i OXA-51 oksacilinazu). AmpC cefalosporinaza obezbeđuje rezistenciju na peniciline i cefalosporine proširenog spektra (osim na cefepim), dok OXA-51 oksacilinaza hidrolizuje peniciline i karbapeneme. Oba enzima se eksprimiraju na bazalnom nivou, osim ako se uzvodno od njih ne nalaze insercione sekvence (IS), kao što su IS*Aba1* i IS*Aba9*, koje mogu predstavljati promotore i povećavati im nivo ekspresije. Vrsta *A. baumannii* ima kapacitet da brzo i jednostavno stiče različite determinante antibiotske rezistencije. Stečene rezistencije na antibiotike se mogu podeliti na one koje su u bakteriju dospele horizontalni genskim transferom iz druge bakterije i na mutacije već postojećih gena. Horizontalnim genskim transferom determinante rezistencije na antibiotike u *A. baumannii* dospevaju putem mobilnih genetičkih elemenata (plazmida, transpozona, integrona, IS i ostrva rezistencije). Ostrva rezistencije predstavljaju naročito značajnog diseminatora antibiotske rezistencije u *A. baumannii* (Roca Subirà et al., 2012). Opisano je nekoliko ostrva rezistencije, a najveće je bilo dužine 86 kb i nosilo je čak 45 gena, koji obezbeđuju rezistenciju na antibiotike i teške metale (Fournier et al., 2006). Mutacije postojećih gena uglavnom podrazumevaju izmene u ciljnim mestima delovanja antibiotika, propustljivosti membrane, kao i u strukturi i ekspresiji gena za rezistenciju na antibiotike (Roca Subirà et al., 2012).

Globalno širenje MDR („multidrug resistant“) *A. baumannii* sojeva, koji su rezistentni na tri ili više klasa antibiotika, predstavlja ozbiljnu pretnju savremenom zdravstvenom sistemu (Neonakis et al., 2011). Stoga je ova bakterijska vrsta svrstana u takozvanu ESKAPE grupu, koju čini šest klinički značajnih patogena (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*

pneumoniae, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp.) sa najizraženijom rezistencijom na antibiotike i za koje je prioritet pronalazak novih antimikrobnih jedinjenja (Santajit i Indrawattana, 2016). Podaci globalne studije koja obuhvata period od 2004. do 2014. godine govore da ~45% izolata *A. baumannii* poseduje MDR fenotip. U Latinskoj Americi i na Srednjem Istoku je taj procenat dostigao ~70%, dok je u Severnoj Americi sa ~30% bio najniži. Takođe, procenat MDR izolata *A. baumannii* je čak četiri puta veći u odnosu na druge klinički značajne Gram-negativne patogene, kao što su *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa* (Giammanco et al., 2017). Rezistencija na karbapeneme, jedne od antibiotika poslednjeg izbora u terapiji infekcija izazvanih MDR *A. baumannii*, čini situaciju u kliničkoj mikrobiologiji alarmantnom. Budući da se epidemiološka situacija izolata *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme iz godine u godinu pogoršava Svetska zdravstvena organizacija („World Health Organization”, WHO) je u 2017. godini ovu grupu bakterija pozicionirala na sam vrh liste patogena za koje je hitno potreban pronalazak aktivnih antimikrobnih agenasa (WHO, 2017). Studija antimikrobne rezistencije roda *Acinetobacter* (sa najvećom učestalošću *A. baumannii*) u zemljama pripadnicama Evropske ekonomske zone („European Economic Area”, EEA; države članice Evropske unije, Island, Lihtenštajn i Norveška) za 2016. godinu je došla do podataka da je u nekoliko zemalja procenat *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme veći od 50%. Uočava se trend porasta rezistencije na karbapeneme kada se krene od severa i zapada Evrope ka jugu, jugoistoku i istoku (Slika 1) (ECDC, 2017). Takođe, procenat bolničkih izolata *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme u Sjedinjenim Američkim Državama u 2014. godini je iznosio ~50% (Bulens et al., 2018). S obzirom da je procenat izolata *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme izuzetno visok na globalnom nivou, do skora su se antibioticima izbora za lečenje ovakvog tipa infekcija smatrali kolistin i tige ciklin. Međutim, poslednjih nekoliko godina se i ta slika menja. Naime, sve češće se javljaju izolati koji su rezistentni i na ove grupe antibiotika, što ukazuje na pojavu rezistencije na sve klinički relevantne antibiotike i svetski zdravstveni sistem dovodi u gotovo bezizlaznu poziciju (Deng et al., 2014; Qureshi et al., 2015; Wong et al., 2017).



Slika 1. Procenat *Acinetobacter* spp. izolata (%) rezistentnih na karbapeneme po državama pripadnicama Evropske ekonomske zone za 2016. godinu (preuzeto i izmenjeno iz ECDC, 2017).

1. 2. Rezistencija na karbapeneme

1. 2. 1. Karbapenemi

Karbapenemi, zajedno sa penicilinima, cefalosporinima, cefamicinima, monobaktamima i klavamima, spadaju u klasu β -laktamskih antibiotika (Topisirović i Jovčić, 2013). Zlatno doba antibiotika otpočelo je 1929. godine otkrićem β -laktamskog antibiotika penicilina, nakon čega je otkriven i sintetisan veliki broj antibiotika koji pripadaju ovoj klasi. Tokom duge istorije β -laktama, razvoj ove grupe antibiotika išao je u pravcu proširivanja spektra dejstva, povećanja efikasnosti i aktivnosti protiv rezistentnih patogena, kao i stabilnosti u organizmu obolelih pacijenata (Demain i Elander, 1999). Danas, ova grupa antibiotika nalazi najširu primenu u kliničkom lečenju zahvaljujući nizu pozitivnih svojstava. Značajnu prednost predstavlja činjenica da su specifični za bakterijske ćelije i da ne ispoljavaju efekat na domaćina (Wilke et al., 2005).

Mehanizam delovanja β -laktamskih antibiotika se ogleda u interferenciji sa umrežavanjem peptidoglikana, finalnim korakom sinteze ćelijskog zida bakterija. Peptidoglikan predstavlja osnovnu komponentu ćelijskog zida bakterija, štiti ćeliju od osmotskog pucanja, određuje joj oblik i od suštinske je važnosti za ćelijski rast i deobu. Transpeptidaze i karboksipeptidaze, enzimi koji katalizuju reakcije umrežavanja peptidoglikana, predstavljaju glavne mete β -laktamskih antibiotika. Ovi enzimi su poznatiji pod nazivom penicilin vezujući proteini („penicillin binding proteins”, PBPs), budući da je prvobitno otkriveno da vezuju penicilin. Inhibicija ovih enzima je moguća zahvaljujući stereochemijskoj sličnosti delova β -laktamskih molekula sa supstratom ovih enzima, terminalnim aminokiselinama (D-alanil-D-alanin) peptida koji se umrežavaju. Vezivanje antibiotika za aktivno mesto ovih enzima dovodi do formiranja kompleksa koji nema sposobnost katalize daljeg umrežavanje, što rezultuje u slaboj povezanosti peptidoglikana. Usled slabljenja ćelijskog zida, dolazi do inhibicije rasta, a naknadno i lize ćelije (Walker, 1996; Essack, 2001; Wilke et al., 2005).

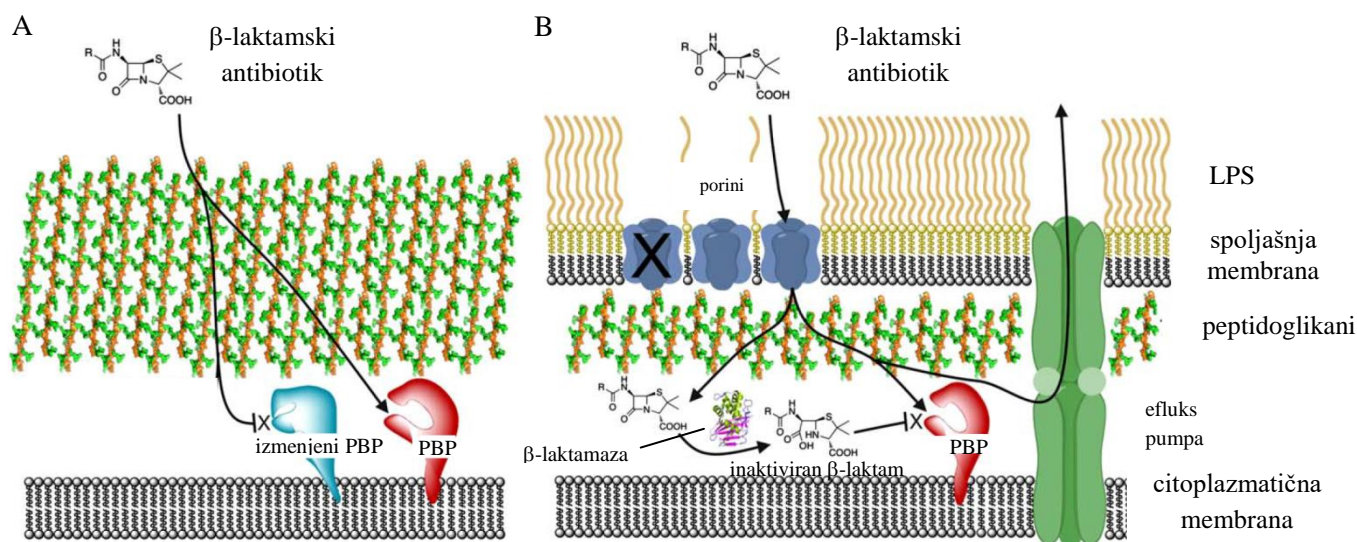
Karbapenemi predstavljaju najpotentniju grupu β -laktamskih antibiotika zahvaljujući strukturnim osobinama, koje korelišu sa njihovim spektrom dejstva i efikasnošću u borbi protiv patogenih bakterija. Strukturna karakteristika svih karbapenema je biciklično jezgro koje se sastoji iz fuzionisanog β -laktamskog prstena i petočlanog prstena. Petočlani prsten karbapenema je za razliku od tiazolidnog prstena penicilina nezasićen i poseduje atom ugljenika umesto atoma sumpora. Ovaj atom ugljenika igra važnu ulogu u aktivnosti i spektru delovanja ove grupe β -laktama, kao i u rezistenciji na veći broj β -laktamaza. Ono što im daje prednost u odnosu na peniciline i cefalosporine u rezistenciji na β -laktamaze je i *trans* konfiguracija dela β -laktamskog prstena (Zhanel et al., 2007). Prvi karbapenem, tienamicin, je izolovan iz zemljišne bakterije *Streptomyces cattleya* (Kahan et al., 1979). Ovaj karbapenem pokazuje izraženu efikasnost protiv velikog broja bakterija zahvaljujući svojoj strukturi. Hidroksietil bočna grupa vezana za β -laktamski prsten, pored prethodno pomenutih prednosti, dodatno doprinosi otpornosti na hidrolitičko delovanje velikog broja β -laktamaza. Nažalost, tienamicin je izuzetno hemijski nestabilan i brzo se degraduje, ali je iskorišćen za sintezu drugih karbapenema, koji pokazuju veću stabilnost. Prvi derivat tienamicina, imipenem (N-formimidoiltienamicin), pokazuje veću stabilnost od tienamicina zahvaljujući N-formimidoil grupi. Nedostatak ovog karbapenema je njegova osetljivost na enzim dehidropeptidazu (DHP-1), koji se nalazi u bubrežnim cevčicama

sisara. Da bi se sprečila njegova degradacija, primenjuje se u kombinaciji sa inhibitorom dehidropeptidaze, cilastatinom. Drugi karbapenemi, kao što su meropenem, ertapenem i doripenem, su modifikovani tako da poseduju metil grupu na C₁-atomu karbapenemskog prstena, što ih štiti od degradacije dehidropeptidazom. U poređenju sa meropenemom, imipenem pokazuje veću efikasnost protiv Gram-pozitivnih i neznatno slabiju protiv Gram-negativnih bakterija. Međutim, imipenem je efikasniji u borbi protiv *A. baumannii* u odnosu na meropenem. U odnosu na imipenem, meropenem i doripenem, ertapenem ima uži spektar delovanja, jer je manje efikasan u eliminaciji *P. aeruginosa* i *Enterococcus* spp., ali ima duži poluživot u ljudskom organizmu, tako da se može davati jednom dnevno, za razliku od ostalih karbapenema (Zhanel et al., 2007; Papp-Walace et al., 2011).

1. 2. 2. Mehanizmi rezistencije na karbapeneme

Pojava i globalno širenje rezistencije na karbapeneme, naročito među Gram-negativnim patogenim bakterijama, predstavlja ozbiljan izazov sa kojim se suočava savremeni svetski zdravstveni sistem. Budući da, kao što je napomenuto i u odeljku 1.1.1., karbapenemi predstavljaju antibiotike poslednjeg izbora za MDR izolate i da je broj rezistentnih sojeva na ovu grupu antibiotika u porastu, broj efikasnih terapeutike je izuzetno ograničen (Meletis, 2016).

Pored retko opisane urođene rezistencije na karbapeneme (Sánchez, 2015), ova prednost se u najvećem broju slučajeva stiče (Meletis, 2016). Mehanizmi koje obezbeđuju rezistenciju na karbapeneme su isti kao i za druge β-laktamske antibiotike (Slika 2).



Slika 2. Mehanizmi rezistencije na β -laktamske antibiotike.

(A) Kod Gram-pozitivnih bakterija rezistencija na β -laktamske antibiotike potiče od produkcije izmenjenih PBPs, koji imaju nizak afinitet vezivanja β -laktama (B) Gram-negativnim bakterijama rezistenciju na β -laktamske antibiotike obezbeđuju β -laktamaze, ograničen ulazak β -laktama u periplazmatični prostor izostankom ili produkcijom izmenjenih porina, smeštenih u spoljašnjoj membrani ćelijskog zida, kao i aktivno izbacivanje β -laktama u spoljašnju sredinu posredstvom efluks pumpi (preuzeto i izmenjeno iz Llarrull et al., 2010).

Kod Gram-pozitivnih bakterija rezistenciju na karbapeneme obezbeđuje produkcija PBPs sa sniženim afinitetom za karbapeneme. Mehanizmi koji obezbeđuju rezistenciju na karbapeneme kod Gram-negativnih bakterija su produkcija β -laktamaza koje hidrolizuju karbapeneme (karbapenemaza), smanjena propustljivost spoljašnje membrane (smanjenje ili potpuni izostanak produkcije porina, kao i ekspresija izmenjenih porina), povećano izbacivanje karbapenema van ćelije posredstvom efluks pumpi i, mada znatno ređe, produkcija izmenjenih PBPs (Papp-Wallace et al., 2011; Meletis, 2016). Asociranost gena koji kodiraju za karbapenemaze sa mobilnim genetičkim elementima čini ih najrasprostranjenijim učesnikom u rezistenciji na karbapeneme. Pored toga, dati mobilni genetički elementi u velikom broju slučajeva nose i determinante rezistencije na antibiotike drugih klasa. Dodatno, pored sposobnosti da hidrolizuju karbapeneme, karbapenemaze inaktiviraju i druge β -laktamske antibiotike. Sve prethodno navedeno govori u prilog tome da izolati koji poseduju

karbapenemaze predstavljaju višestruki izazov za pronalazak adekvatne terapije (Papp-Wallace et al., 2011; Meletis, 2016). Ova grupa enzima se kategoriše u klase β -laktamaza A, B i D po Ambleru (Ambler, 1980). Za hidrolitičku aktivnost β -laktamaza klase A i D neophodan je serin u aktivnom mestu (serinske β -laktamaze), dok klasa B zahteva prisustvo jona cinka (metalo- β -laktamaze-„metallo- β -lactamases”, MBLs). Dok klase A i D, pored karbapenemaza, poseduju i predstavnike koji ne mogu da inaktiviraju karbapeneme, sve β -laktamaze klase B imaju tu sposobnost. Takođe, članovi klasa A i D pokazuju različit spektar osetljivosti na inhibitore β -laktamaza (klavulansku kiselinu i tazobaktam), dok predstavnicima klase B helatori metalnih jona (npr. EDTA) inhibiraju hidrolitičku aktivnost (Bush i Jacoby, 2010). Karbapenemaze klase A obuhvataju članove SME, IMI, NMC, SFC, GES i KPC familija β -laktamaza. Među njima je najrasprostranjenija KPC karbapenemaza, najčešće opisana na plazmidima kod *K. pneumoniae*. Karbapenemaze klase D uglavnom obuhvataju β -laktamaze OXA tipa, koje su u najvećem broju slučajeva detektovane kod *A. baumannii*. Opisane MBLs pripadaju familijama IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, NDM, AIM, DIM, FIM i POM. Karbapenemaze koje se karakterišu kao najpotentnije i najrasprostranjenije su KPC, OXA-48, IMP, VIM i NDM (Queenan i Bush, 2007; Meletis, 2016).

1. 2. 3. Mehanizmi rezistencije na karbapeneme kod *A. baumannii*

Tokom poslednjih nekoliko decenija uočen je znatan porast rezistencije na karbapeneme među izolatima vrste *A. baumannii* na globalnom nivou. Mehanizmi koji obezbeđuju ovu prednost *A. baumannii* su mnogobrojni i u većini slučajeva zajedničkim delovanjem vode rezistenciji na karbapeneme (Wong et al., 2017).

Najrasprostranjeniji učesnici u rezistenciji na karbapeneme opisani kod *A. baumannii* su β -laktamaze klase D koje hidrolizuje karbapeneme („carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases”, CHDLs). Budući da ima sposobnost inaktivacije karbapenema, ova grupa β -laktamaza je odvojena unutar klase D β -laktamaza u zasebnu podgrupu pod nazivom 2df. Generalno, CHDLs pokazuju slabu hidrolitičku aktivnost kada su karbapenemi u pitanju, s tim da imipenem hidrolizuju brže i efikasnije u odnosu na meropenem (Bush i Jacoby, 2010). Takođe, ove karbapenemaze su otporne na delovanje klavulanske kiseline i tazobaktama (Poirel i Nordmann, 2006). Pored jedne urođene, pod nazivom OXA-51, koja je opisana u odeljku 1.1.1.,

kod *A. baumannii* je detektovano nekoliko stečenih CHDLs grupisanih u podfamilije OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143 i OXA-235 oksacilinaza. Među genima za stečene oksacilinaze, najčešće je detektovan *bla*_{OXA-23}, koji je lociran na plazmidima ili u hromozomu. Prisustvo IS, kao što je *ISAbal* i *ISAb4*, uzvodno od gena koji kodira za ovaj tip CHDLs može da stimuliše njihovu ekspresiju obezbeđujući im promotorsku sekvencu. Takođe, pored plazmida, *bla*_{OXA-23} je pronađen i unutar transpozona (Tn2006, Tn2007 i Tn2008), što objašnjava njegovo globalno rasprostranjenje. Geni za predstavnike podfamilije OXA-24 oksacilinaza su, kao i OXA-23, pozicionirani na plazmidima i hromozomu, dok je gen *bla*_{OXA-58} isključivo lociran na plazmidima. Kao i u slučaju OXA-51 i OXA-23, gen koji kodira za OXA-58 oksacilinazu je asociran sa IS, kao što su *ISAbal*, *ISAb2*, *ISAb3* i *IS18*, koje mogu da mu povećaju nivo ekspresije (Poirel i Nordmann, 2006; Poirel et al., 2011; Roca Subirà et al., 2012; Abbott et al., 2013). Skorije opisane i ređe prisutne CHDLs su OXA-143 i OXA-235. Do sada prijavljeni geni za oksacilinaze slične OXA-143 su detektovani na plazmidima, nisu asocirani sa IS i okruženi su genima za replikazu, što ukazuje na homolognu rekombinaciju kao put kojim su dospale u odgovarajući plazmid (Higgins et al., 2009b). Takođe, opisane su samo u Severnoj i Južnoj Americi, kao i Iranu (Higgins et al., 2009b; Zander et al., 2014; Sarikhani et al., 2017). Geni koji kodiraju za oksacilinaze grupe OXA-235 su locirani na plazmidima i hromozomu izolata poreklom iz Severne i Južne Amerike. Pored toga, uočeno je da su geni grupe *bla*_{OXA-235} smešteni između dve *ISAbal* sekvence, što navodi na zaključak da su u genom *A. baumannii* dospeli transpozicijom (Higgins et al., 2013). OXA-48 oksacilinaze su sporadično navedene kao CHDLs *A. baumannii*, bez detaljnijih podataka o njihovoj lokaciji i okruženju u genomu (Elsherif et al., 2016).

Iako ređe detektovane, MBLs svojom izraženijom hidrolitičkom aktivnošću (100-1000 puta) u većoj meri doprinose rezistenciji na karbapeneme u odnosu na CHDLs (Poirel i Nordmann, 2006). MBLs koje su opisane kod *A. baumannii* su grupisane u IMP (IMP-1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 19 i 24), VIM (VIM-1, 2, 3, 4 i 11), SIM (SIM-1), NDM (NDM-1, 2 i 3) i GIM (GIM-1) tipove (Abbott et al., 2013; Alkasaby i El Sayed Zaki, 2017; Lee et al., 2017). Osobina ovih enzima, koja ih čini izraženijom pretnjom, je njihova asociranost sa mobilnim genetičkim elementima (plazmidima, integronima i transpozonima). Geni koji kodiraju IMP, VIM i SIM MBLs su često locirani unutar integrona klase 1, koji dodatno nose determinante rezistencije na druge antibiotike u formi genskih kaseti (Roca Subirà et al., 2012). Pored toga, NDM-1 β -

laktamaza je locirana unutar transpozona Tn125, koji je potencijalno prevozno sredstvo za brzo širenje ovog gena među različitim patogenima na globalnom nivou. Takođe, pretpostavljeno je da upravo *A. baumannii* predstavlja izvor bla_{NDM-1} gena koji se naknadno proširio na druge značajne Gram-negativne patogene (Bonnin et al., 2014; Bontron et al., 2016).

Najmanje prisutna klasa karbapenemaza kod *A. baumannii* su karbapenemaze klase A. U pitanju su KPC (KPC-2, 3, 4 i 10) i GES (GES-1, 5, 11 i 14) tipovi karbapenemaza. Prisustvo KPC enzima je ustanovljeno samo u izolatima iz Porto Rika (Robledo et al., 2010), dok su GES karbapenemaze detektovane u nekoliko zemalja (Bogaerts et al., 2010; Bonnin et al., 2011; Zeka et al., 2014; Chihi et al., 2016; Al-Agamy et al., 2017).

Iako ostvaruje manji doprinos u rezistenciji na karbapeneme kod *A. baumannii* u poređenju sa karbapenemazama, smanjena propustljivost spoljašnje membrane igra značajnu ulogu u rezistenciji na ovu grupu antibiotika. Promene u strukturi i ekspresiji ili potpuni gubitak porina mogu dovesti do smanjene propustljivosti spoljašnje membrane i, posledično, ograničenog ulaska antibiotika u bakterijsku ćeliju (Abbott et al., 2013). Prvi opisani porin *A. baumannii* čiji je izostanak asociran sa rezistencijom na karbapeneme je bio CarO („carbapenem resistance-associated outer membrane protein”). Iako je ovaj vid rezistencije najčešće u kombinaciji sa produkcijom karbapenemaza, opisani izolat nije posedovao karbapenemaze (Limansky et al., 2002). Najčešće opisani mehanizam inaktivacije *carO* gena je ugradnja različitih IS unutar ovog gena (Mussi et al., 2005). Pored najviše izučenog CarO porina, opisano je i učešće Omp33-36 (del Mar Tomás et al., 2005) i OprD porina (Dupont et al., 2005) u rezistenciji na karbapeneme kod *A. baumannii*. Detaljnije o navedenim porinima u odeljku 1.3.

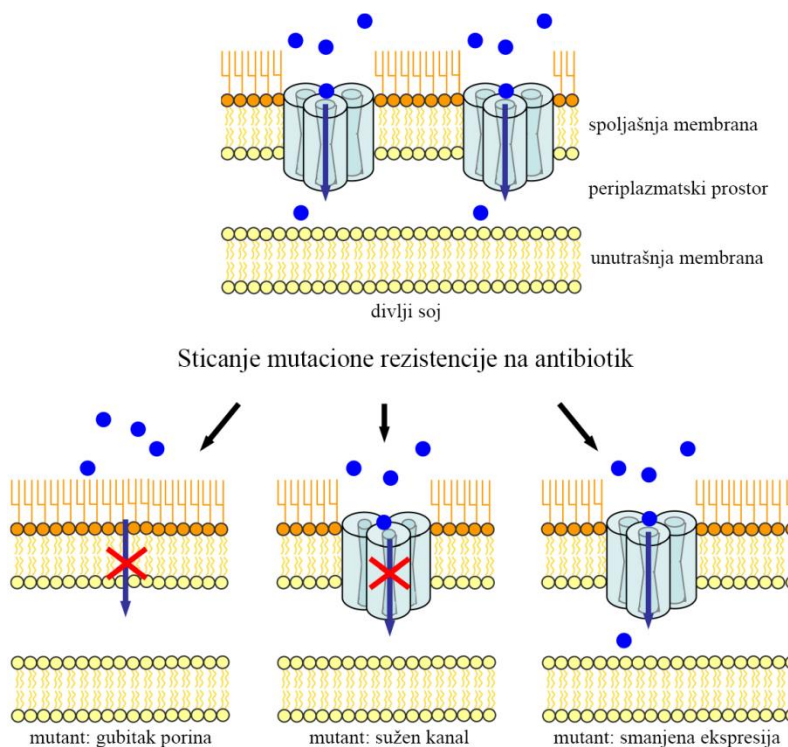
Izbacivanje karbapenema iz bakterijske ćelije putem prekomerno eksprimiranih efluks pumpi predstavlja još jedan mehanizam zaslužan za rezistenciju na ovu grupu antibiotika kod *A. baumannii*. Najbolje izučena RND („resistance and nodulation”) efluks pumpa kod *A. baumannii*, efluks pumpa AdeABC, igra ulogu u smanjenoj osetljivosti na karbapeneme. Kao i većina RND efluks pumpi, AdeABC pumpa ima mogućnost izbacivanja većeg broja antibiotika iz ćelije i učestvuje u MDR fenotipu patogena. Prekomerna ekspresija AdeABC pumpe doprinosi rezistenciji na aminoglikozide, fluorohinolone, tetraciklin, hloramfenikol, eritromicin, netilmicin, etidijum bromid i, najznačajnije, tigeciklin i meropenem (Piddock, 2006; Ruzin et al., 2007). Takođe, pretpostavljeno je da efluks pumpe AdeABC, AdeIJK i AbeM doprinose rezistenciji na imipenem kod *A. baumannii* (Hou et al., 2012).

Pored prethodno navedenih učesnika u rezistenciji na karbapeneme kod *A. baumannii*, ustanovljena je i uloga PBPs u ovom fenomenu. Učešće PBPs u rezistenciji na karbapeneme je opisano kroz sniženu produkciju određenih PBPs, kao i prekomernu ekspresiju PBP od 24 kDa, koji poseduju snižen afinitet za karbapeneme (Gehrlein et al., 1991; Fernández-Cuenca et al., 2003).

1. 3. Porini

Membrane bakterijskih ćelija predstavljaju barijere selektivne propustljivosti, koje istovremeno štite ćeliju od štetnih molekula iz spoljašnje sredine i omogućavaju ulazak hranljivih materija, neophodnih za opstanak, u ćeliju (Koebnik et al., 2000). Sastavni delovi spoljašnjih membrana Gram-negativnih bakterija, koji obavljaju ove biološke uloge, su proteini pod nazivom porini. Porini formiraju kanale (pore ispunjene vodom), koji prolaze kroz spoljašnju membranu Gram-negativnih bakterija i omogućavaju ulazak hidrofilnih molekula ograničene veličine u ćeliju. U spoljašnjoj membrani porini formiraju strukturu β -bureta, koja se sastoji iz transmembranskih antiparalelnih β -ploča čije su hidrofobne (okrenute ka spoljašnjosti pore) i hidrofilne aminokiseline (okrenute ka unutrašnjem delu kanala) raspoređene naizmenično (Fernández i Hancock, 2012). Transmembranski regioni porina pokazuju izraženiju konzervisanost u odnosu na petlje izložene vanćelijskoj sredini. Pretpostavljeno je da klinički značajne patogene bakterije na taj način izbegavaju adaptivni imunski odgovor domaćina (Achouak et al., 2001). Ovi proteini spoljašnje membrane mogu biti organizovani u vidu monomerne ili trimerne strukture (Koebnik et al., 2000). Porini se prema specifičnosti mogu podeliti na opšte i specifične porine. Opšti porini ne pokazuju afinitet za prolazak određenih molekula, dok specifični poseduju mesta vezivanja za pojedinačne supstrate. Takođe, specifični porini se karakterišu kinetikom zasićenja supstratom u submilimolarnim koncentracijama, kao i kompeticijom za prolazak molekula koji dele isto mesto vezivanja unutar kanala (Morán-Barrio et al., 2017). Prvi porin, poreklom iz *Escherchia coli*, je okarakterisan 1976. godine (Nakae, 1976), nakon čega je opisan niz drugih porina kod različitih predstavnika Gram-negativnih bakterija. Okarakterisani porini su pokazali izuzetnu raznovrsnost u osobinama (Fernández i Hancock, 2012). Naime, bakterije familije *Enterobacteriaceae* poseduju velike opšte porine, kao što su OmpF i C (Nikaido, 2003), dok *P. aeruginosa* i *A. baumannii* poseduju mali broj specifičnih porina čije su dimenzije ograničene. S tim u vezi, ove dve vrste su u većoj meri

zaštićene od ulaska nepoželjnih molekula iz spoljašnje sredine, kao što su antibiotici (Fernández i Hancock, 2012; Chevalier et al., 2017). Budući da su određeni antibiotici mali hidrofilni molekuli (npr. β -laktami) i da imaju mogućnost prolaska kroz opisane porine, ove bakterije su unapredile mehanizme rezistencije na date antibiotike (Fernández i Hancock, 2012; Ghai i Ghai, 2018). Mutacije koje obezbeđuju smanjenje ili potpuni izostanak ekspresije, kao i modifikacije u strukturi porina, mogu ograničiti ulazak antibiotika u ćeliju (Slika 3). Prema literaturnim podacima, gubitak porina u spoljašnjoj membrani retko doprinosi rezistenciji na antibiotike u velikoj meri, ali produžavanjem opstanka daje priliku bakteriji da razvije dodatne mutacije koje vode rezistenciji na visokom nivou (Fernández i Hancock, 2012). Pored uloge u rezistenciji na antibiotike, porini doprinose i različitim vidovima virulencije kod patogenih bakterija, kao što su adhezija, invazija i smrt ćelija domaćina (Achouak et al., 2001).



Slika 3. Mehanizmi sticanja mutacione rezistencije na antibiotike asocirani sa porinima. Plavi krugovi predstavljaju molekule antibiotika, dok crveni krstovi ukazuju da antibiotik nema mogućnost prolaska kroz spoljašnju membranu (preuzeto i izmenjeno iz Fernández i Hancock, 2012).

1. 3. 1. Porini odgovorni za rezistenciju na karbapeneme kod *A. baumannii*

Kao što je prethodno napomenuto rezistencija na karbapeneme kod *A. baumannii* predstavlja ozbiljan globalni problem, a porini su okarakterisani kao jedan od uzročnika ovog fenomena. Uloga porina CarO i Omp33-36 u rezistenciji na karbapeneme je najdetaljnije proučena, za porin OprD postoje oprečni podaci, dok je još nekoliko porina navedeno da potencijalno propušta ove antibiotike.

1. 3. 1. 1. CarO

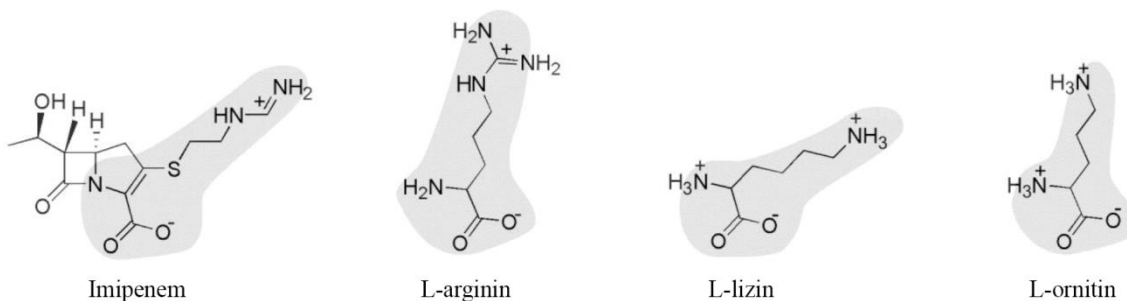
Uloga CarO porina u rezistenciji na imipenem je prvi put ustanovljena 2002. godine, kada je primećen izostanak porina od 29 kDa kod izolata rezistentnih u odnosu na one koji su bili senzitivni na imipenem. Razlika u produkciji porina je uočena kako među srodnim izolata, tako i između divljeg soja osetljivog na imipenem i njegovih laboratorijski dobijenih derivata rezistentnih na isti antibiotik. Značajno je naglasiti da ovi izolati nisu bili producenti karbapenemaza (Limansky et al., 2002).

Nakon kloniranja *carO* gena, protein za koji kodira je okarakterisan kao protein spoljašnje membrane koji formira strukturu β -bureta. Budući da nije pokazao blisku homologiju sa članovima drugih familija porina, predloženo je da bude prvi predstavnik nove familije. Takođe, homolozi ovog proteina su pronađeni samo kod rodova koji pripadaju familiji *Moraxellaceae* (*Acinetobacter*, *Moraxella* i *Psychrobacter*), tako da se smatra specifičnim za ovu grupu bakterija (Mussi et al., 2005). Dalje analize CarO porina su ustanovile da je u pitanju monomerni protein, koji poseduje izvesnu katjonsku selektivnost (Siroy et al., 2005).

Iako se u početku mislilo da je CarO neselektivan kanal (Siroy et al., 2005), uočene su izvesne sličnosti sa OprD porinom *P. aeruginosa* iz čega su proistekla nova otkrića. Naime, oba porina učestvuju u rezistenciji na karbapeneme i ugradnja IS u gene koji ih kodiraju je osnovni mehanizam za njihovu inaktivaciju. Pored toga, OprD porin je selektivan za bazne aminokiseline, dok CarO poseduje slabu katjonsku selektivnost (Mussi et al., 2005; Siroy et al., 2005). Ispitivanjem specifičnosti CarO porina za različite aminokiseline, ustanovljeno je da se takođe radi o kanalu za bazne aminokiseline. Ovaj porin je pokazao najizraženiju specifičnost za L-ornitin, a zatim za L-arginin, L-lizin i L-histidin. Takođe, bakterije su pokazale smanjenu osetljivost na imipenem u prisustvu ovih aminokiselina, što ukazuje na međusobnu kompeticiju za mesto vezivanja unutar CarO porina. Ni D- izomeri odgovarajućih baznih aminokiselina, kao

ni di- ni tripeptidi koji poseduju bazne aminokiseline nisu posedovali specifično mesto vezivanja unutar CarO porina, što ovaj porin razlikuje od OprD porina vrste *P. aeruginosa* (Mussi et al., 2007). Budući da za razliku od funkcionalne, ne pokazuju ni sekvencnu, ni strukturnu sličnost, ova dva porina se mogu smatrati analozima (Mussi et al., 2005). Pretpostavljeni značaj uloge CarO porina u preuzimanju L-ornitina i L-arginina iz spoljašnje sredine je u signalizaciji, koja obaveštava bakteriju da se nalazi u domaćinu, i to imunokompromitovanom. L-ornitin i L-arginin su prisutni u krvi sisara u submilimolarnim koncentracijama, ali prilikom povreda kože dolazi do prevođenja arginina u ornitin, u kojima obe aminokiseline imaju ulogu u zaceljivanju. Takođe, ornitin je sastavni deo dugoživećih proteina kože („long-lived skin proteins”), kao što je kolagen, gde se javlja usled posttranslacionih modifikacija koje su povezane sa starošću. Još jedna činjenica, koja govori u prilog ulozi CarO porina kao senzora prisustva u domaćinu, je njegova povećana ekspresija na telesnoj temperaturi ljudi u odnosu na niže temperature (Mussi et al., 2007).

Izučavanjem CarO porina kod drugog predstavnika roda *Acinetobacter*, *Acinetobacter baylyi*, došlo se do sličnih rezultata kao kod *A. baumannii*. CarO porin je bio specifičan za bazne aminokiseline, koje su kompetirale sa ulaskom imipenema. Analizom strukture supstrata CarO kanala i onih koji to nisu, došlo se do zaključaka da su α -karboksilna grupa i pozitivno naelektrisana amino grupa bočnog lanca baznih aminokiselina, kao i njihova udaljenost, značajni za specifičnost kanala. Izražena strukturna sličnost imipenema i baznih aminokiselina je prikazana na Slici 4. Značajno je napomenuti i da je CarO učestvovao u rezistenciji na imipenem, meropenem i ertapenem kod *A. baylyi* u ograničenoj meri (Morán-Barrio et al., 2017).



Slika 4. Hemijska struktura supstrata CarO porina.

Na slici je obeležena strukturna sličnost dela imipenema i baznih aminokiselina (L-arginina, L-lizina i L-ornitina) (preuzeto i izmenjeno iz Morán-Barrio et al., 2017).

Nakon prvobitne analize aminokiselinskih sekvenci CarO porina ustanovljeno je da se ova familija proteina može podeliti u dve grupe, CarOa i CarOb. Ispitivanjem specifičnosti za određene supstrate, uočeno je da je CarOb dva puta specifičniji za imipenem u odnosu na CarOa. Nasuprot tome, CarOa je bio propustljiviji za L-ornitin i L-arginin. Nijedna varijanta CarO porina nije pokazala specifičnost za meropenem, iako je izostanak ovog proteina bio povezan i sa rezistencijom na meropenem (Mussi et al., 2005; Catel-Ferreira et al., 2011; Morán-Barrio et al., 2017). Detaljnijom analizom uočeno je da ipak postoje četiri varijante CarO porina *A. baumannii*, koje odlikuje izuzetna polimorfnost (Mussi et al., 2011). Neusaglašenost filogenetske pripadnosti izolata i CarO varijanti koje poseduju je navela na zaključak da među pripadnicima ove vrste može doći do asortativne rekombinacione zamene tj. do zamene celokupnog *carO* gena. Ovakav fenomen može predstavljati vid strategije za preživljavanje u izmenjenim uslovima životne sredine, kao što je prelazak sa neživih površina u domaćina ili izlaganje karbapenemskoj terapiji. Budući da imaju različit afinitet prema supstratu (imipenem i bazne aminokiseline), određene varijante CarO porina u specifičnim uslovima spoljašnje sredine mogu doneti selektivnu prednost datoj bakteriji. Takođe, najizraženija polimorfnost je uočena u petljama koje su pozicionirane van ćelije, što može predstavljati taktiku za izbegavanje adaptivnog imunskog odgovora (Mussi et al., 2011).

Pored uloge u rezistenciji na antibiotike postoje izvesne naznake da bi CarO mogao biti i faktor koji doprinosi virulenciji *A. baumannii*. Naime, poređenjem dva *A. baumannii* izolata (višestruko rezistentnog na antibiotike i ATCC19606) je uočeno da rezistencija na antibiotike obrnuto koreliše sa virulencijom. Učešće proteina spoljašnje membrane u smrti ćelija je bilo izvesno i izraženije kod ATCC19606, a poređenje ekspresije porina je ukazalo na najizraženije smanjenje CarO porina kod višestruko rezistentnog izolata (Fernández-Cuenca et al., 2011). Takođe, CarO porin je predložen kao indirektan učesnik u formiranju biofilma. Kao kanal za L-histidin, CarO porin omogućava ulazak ove aminokiseline, značajnog stimulatora produkcije biofilma, u ćeliju (Cabral et al., 2011). Prisustvo CarO porina u vezikulama spoljašnje membrane, strukturama za prenos efektorskih molekula patogena do ćelja domaćina, predstavlja još jedan razlog da se veruje da ima ulogu u virulenciji kod *A. baumannii* (Kwon et al., 2009; McConnell et al., 2011b). Iako navedeno ukazuje da je CarO porin potencijalni faktor virulencije, učešće u adheziji za ćelije domaćina nije uočeno (Smani et al., 2012).

1. 3. 1. 2. Omp33-36

Godine 1996. prvi put je uočeno smanjenje ekspresije proteina spoljašnje membrane od 33-36 kDa kod izolata *A. baumannii* rezistentnih na imipenem u poređenju sa senzitivnim. Takođe, uočena razlika u ekspresiji datog proteina je potvrđena poređenjem izolata rezistentnog na imipenem i njegovog revertanta koji je bio osetljiv na ovaj antibiotik. Analizirani izolati nisu posedovali enzime sa karbapenemaznom aktivnošću (Clark, 1996). Ubrzo nakon toga je uočen izostanak/smanjenje ovog porina kod dva nezavisna izolata *A. baumannii* koji su dodatno posedovali imipenemaze. Za jedan je određena rezistencija samo na imipenem, dok je za drugi ispitivana i ustanovljena rezistencija i na meropenem (Bou et al., 2000; Costa et al., 2000). Takođe, drugi izolat je pokazao sniženu ekspresiju još jednog proteina spoljašnje membrane koji je bio veličine 22 kDa (Bou et al., 2000).

Konačnu potvrdu uloge Omp33-36 proteina u rezistenciji na karbapeneme ustanovili su del Mar Tomás i saradnici analizom profila proteina spoljašnje membrane izolata *A. baumannii* rezistentnog na karbapeneme i njegovog laboratorijski dobijenog revertanta koji je pokazivao izraženiju senzitivnost na date antibiotike. Pored toga, kloniranje i ekspresija gena za Omp33-36 porin izolata senzitivnog na karbapeneme u rezistentni je značajno smanjilo MIK (Minimalna Inhibitorna Koncentracija) vrednosti za imipenem i meropenem (del Mar Tomás et al., 2005). Analizom aminokiselinske sekvence Omp33-36 zaključeno je da je u pitanju porin (del Mar Tomás et al., 2005), koji omogućava ulazak vode u ćeliju (Rumbo et al., 2014).

Nakon otkrića uloge Omp33-36 u adheziji za ćelije domaćina, kroz vezivanje za fibronektin (Smani et al., 2012), započinje detaljnije izučavanje uloge ovog porina u virulenciji *A. baumannii*. Pored učešća u adheziji, uočena je njegoova uloga i u invaziji ćelija domaćina (Smani et al., 2013). *A. baumannii* kome je mutiran *omp33-36* gen iskazuje manju citotoksičnost prema ćelijama plućnog epitela i makrofagima (Smani et al., 2013). Tip ćelijske smrti koju indukuje Omp33-36 je apoptoza i to aktivacijom kaspaza (Rumbo et al., 2014). Takođe, ovaj porin ima sposobnost modulacije autofagije kroz nagomilavanje p62 i LC3B-II. Na ovaj način dolazi do formiranja autofagozoma, ali ne i njihovog sazrevanja. Modulacija autofagije ovog tipa predstavlja vid strategije za opstanak bakterija u ćelijama domaćina unutar autofagozoma (Rumbo et al., 2014). Ovaj fenomen je opisan kod nekoliko unutarćelijskih, ali i kod vanćelijskih patogena (Rumbo et al., 2014; Kimmey i Stallings, 2016). Vezikule spoljašnje membrane ostvaruju ulogu u transportu Omp33-36 porina, kao i drugih efektorskih molekula patogena, do

ciljnih ćelija (McConnell et al., 2011b; Rumbo et al., 2014). Takođe, Omp33-36 doprinosi širenju *A. baumannii* unutar organizma, kao i povećanju stope smrtnosti *in vivo* (Smani et al., 2013). Iako je prvobitno predložena ograničena uključenost Omp33-36 u formiranju biofilma (Cabral et al., 2011), došlo se do zaključka da definitivno nije faktor koji doprinosi ovom procesu (Smani et al., 2013). Činjenica da porini predstavljaju kanale za prolazak nutrijenata i toksičnih metabolita ukazuje da ova grupa proteina može biti vrlo značajna za fitness same bakterije. U skladu sa tim, *in vitro* i *in vivo* eksperimenti su pokazali da Omp33-36 igra izuzetno važnu ulogu u fitnessu *A. baumannii* doprinoseći brzini rasta ove bakterije (Smani et al., 2013).

1. 3. 1. 3. Ostali porini odgovorni za rezistenciju na karbapeneme kod *A. baumannii*

Porin *A. baumannii*, koji je uz CarO i Omp33-36, najčešće okarakterisan kao faktor koji je povezan sa rezistencijom na karbapeneme poseduje veličinu od 43 kDa. Njegovo pretpostavljeno učešće u rezistenciji na karbapeneme je prvi put opisano kod rezistentnog izolata koji je u manjoj meri eksprimirao porine od 29 kDa (CarO) i 47 kDa u odnosu na senzitivne izolate. Analizom aminokiselinske sekvence ovog porina uočena je sličnost sa OprD porinom *P. aeruginosa* (uloga ovog porina je navedena u odeljku 1.3.1.1.), što je navelo na zaključak da su u pitanju homolozi (Dupont et al., 2005). U želji da se prethodno navedena pretpostavka eksperimentalno dokaže, ispitivana je specifičnost OprD porina *A. baumannii* za bazne aminokiseline i karbapeneme. Odsustvo specifičnosti za ove supstrate i detaljnija analiza aminokiselinske sekvence su ovaj porin približile OprQ proteinu *P. aeruginosa*. Kao i kod *P. aeruginosa*, izučavani porin *A. baumannii* je pokazao specifičnost za Fe^{3+} i Mg^{2+} , što ukazuje na njegovu ulogu u adaptaciji na uslove spoljašnje sredine u kojima je koncentracija ovih elemenata ograničena (Catel-Ferreira et al., 2012). Nasuprot tome, OprD protein *A. baylyi* je doprineo rezistenciji na karbapeneme (imipenem, meropenem i ertapenem), kao i ulasku L-arginina u ćeliju. Takođe, kod *A. baylyi* je uočena izuzetna funkcionalna sličnost između OprD i CarO porina (Morán-Barrio et al., 2017). Budući da su do sada dobijeni rezultati oprečni, ne može se doneti konačan zaključak o specifičnosti OprD porina za karbapeneme kod roda *Acinetobacter*. Kada je reč o značaju ovog porina u virulenciji, u jednoj studiji je predložen njegov nedefinisani virulentni karakter (Fernández-Cuenca et al., 2011), dok je u drugoj pretpostavljen kao učesnik u formiranju biofilma vrste *A. baumannii* (Cabral et al., 2011).

Porini čija je smanjena produkcija povezana sa rezistencijom na karbapeneme, ali ne i detaljnije izučena, su veličine 22 (Bou et al., 2000), 37, 44 i 47 kDa (Quale et al., 2003).

1. 4. Neantibiotske terapije infekcija izazvanih *A. baumannii*

Administracija efikasne antibiotske terapije u početnim stadijumima infekcije je ključna za preživljavanje pacijenata. Nažalost, globalno rasprostranjenje MDR izolata *A. baumannii* je značajno ograničilo izbor efikasnih terapeutika. Pojava rezistencije na antibiotike poslednjeg izbora, kao što su karbapenemi, kolistin i tigeciklin, je situaciju učinila još alarmantnijom. Predložene antibiotske terapije infekcija izazvanih ovakvim izolatima uglavnom podrazumevaju tretman kombinovanjem različitih antibiotika (kolistin, tigeciklin, karbapenemi, rifampin, minociklin, sulbaktam, daptomicin, teikoplanin, plazomicin), koji ostvaruju sinergističko delovanje. Efikasnost lečenja kombinovanim antibioticima zavisi od karakteristika samih izolata, kao i tipa infekcije koju izazivaju. Određene kompanije rade na razvoju novih antibiotika aktivnih protiv *A. baumannii*, ali je njihov broj ograničen (Abbott et al., 2013; Lee et al., 2017; Wong et al., 2017).

U nedostatku antibiotika efikasnih u eliminaciji potpuno rezistentnih *A. baumannii* predloženo je nekoliko alternativnih terapijskih opcija. Pre svega, tu su agensi koji predstavljaju vid odbrane domaćina od patogena, antimikrobni peptidi i proteini koji vezuju metale. Antimikrobni peptidi samostalno pokazuju izuzetnu baktericidnu aktivnost kada je *A. baumannii* u pitanju, a u kombinaciji sa određenim antibioticima ostvaruju sinergizam. Spisak efikasnih peptida je dugačak, a njihovo poreklo može biti ljudsko, životinjsko (uglavnom vodozemci i gmizavci) ili sintetičko. Osnovne mane ove grupe terapeutika su kratak poluživot u serumu, potencijalna toksičnost i skupa produkcija, dok je osnovna prednost teže sticanje rezistencije u odnosu na antibiotike (Roca Subirà et al., 2012; García-Quintanilla et al., 2013; Lee et al., 2017; Wong et al., 2017). Proteini koji vezuju metale, kao što su gvožđe i cink, ograničavaju dostupnost ovih jona bakterijama, kojima su oni neophodni za obavljanje osnovnih fizioloških procesa. Transferin i kalprotektin, proteini ljudi koji vezuju metale, deluju bakteriostatički na *A. baumannii* u *in vitro* eksperimentima (Wong et al., 2017). Bakteriofagi, virusi koji imaju mogućnost lize bakterijskih ćelija, predstavljaju još jedan potencijalan terapeutik infekcija izazvanih vrstom *A. baumannii*. Prethodnih godina opisan je niz bakteriofaga koji su specifični za određene izolate *A. baumannii*. Prevazilaženje njihove uske specifičnosti je

uspešno izvršeno tretmanom ovih bakterija koktelom različitih bakteriofaga (García-Quintanilla et al., 2013). Endolizini, enzimi bakteriofaga koji hidrolizuju peptidoglikane, su inženjerski modifikovani i artelizini sa sposobnošću da destabilišu spoljašnju membranu *A. baumannii* i uspešno izvrše eliminaciju ovih patogena (Briers et al., 2014; Defraigne et al., 2016). Pored litičkog efekta, bakteriofagi imaju značajnu ulogu u destabilizaciji biofilma *A. baumannii*, što oslobođene bakterijske ćelije čini daleko osetljivijim na antibiotike i dezinfekciona sredstva (Thawal et al., 2012; Yele et al., 2012). Nedostacima bakteriofaga se smatra potencijalna nestabilnost u organizmu, neželjeno pokretanje imunskog odgovora i uticaj na postojeću mikrobiotu, kao i moguće sticanje rezistencije na ove agense (Wong et al., 2017). Kada je reč o tretmanu infekcija kože, predložene terapije su fotodinamička i terapija bazirana na azot oksidu. Obe terapije se zasnivaju na formiranju reaktivnih vrsta koje štetno utiču na ćelije. Izuzetno su efikasne u eliminaciji patogena i na njih se ne stiče rezistencija, međutim, usled neselektivnosti, mogu oštetiti i ćelije domaćina (García-Quintanilla et al., 2013; Wong et al., 2017). Modulacija inflamatornog odgovora domaćina, kroz izmenu interakcije LPS i TLR4 („Toll-like receptor 4”) receptora imunskih ćelija, može značajno doprineti preživljavanju obolelog. Ova interakcija može biti narušena disrupcijom TLR4 ili korišćenjem malih molekula koji bi blokirali ovu interakciju (Wong et al., 2017). Kao što je na velikom broju patogena potvrđeno, imunizacija predstavlja zlatni standard, pre svega, u profilaksi, ali i terapiji infekcija (Delany et al., 2014).

1. 4. 1. Vakcine

U prethodnom veku vakcinacija je bila najefikasniji mera u kontroli morbiditeta i mortaliteta izazvanih infektivnim agensima (Delany et al., 2014). Usled porasta ozbiljnih infekcija izazvanih *A. baumannii* i nedostatka adekvatnih antibiotskih terapeutika, javila se potreba za pronalaskom odgovarajuće vakcine (Chen, 2015). Grupe koje se smatraju ciljnim za upotrebu ovakvih vakcina su pacijenti koji se izlažu mehaničkoj ventilaciji i dugo borave u zdravstvenim ustanovama, naročito na odeljenju intenzivne nege, kao i vojne jedinice koje se spremaju za odlazak u rat (McConnell i Pachón, 2010).

Pristupi u pronalasku efikasnih vakcina za *A. baumannii* su raznovrsni, ali se osnovna podela eksperimentalnih vakcina može izvršiti na višekomponentne i vakcine koje sadrže pojedinačan antigen. Višekomponentne vakcine su prvobitno podrazumevale inaktivisane cele ćelije (McConnell i Pachón, 2010), komplekse spoljašnje membrane (McConnell et al., 2011a) i

vezikule spoljašnje membrane (McConnell et al., 2011b). Ova grupa vakcina ostvaruje izuzetan efekat u eliminaciji *A. baumannii* i doprinosi preživljavanju eksperimentalnih životinja. Njihov uspeh je obezbeđen velikim brojem antigena, ali se isto tako smatraju nebezbednim zbog činjenice da postoji mogućnost zadržavanja nedovoljno inaktivisanih ćelija i LPS-a kao toksičnih elemenata (McConnell et al., 2011b; García-Quintanilla et al., 2014). Jedno od predloženih rešenja je korišćenje inaktivisanih ćelija izolata koji prirodno ne produkuje LPS, ali i pored toga štite domaćina od *A. baumannii* koji produkuje LPS (García-Quintanilla et al., 2014). Drugi pristup podrazumeva upotrebu pojedinačnih antigena za koje bi bilo poželjno da ispunjavaju sledeće uslove: rasprostranjenost među izolatima, visoka konzervisanost, lokalizacija u spoljašnjoj membrani, ekspresija tokom infekcije, prisustvo epitopa koji se vezuju sa visokim afinitetom za HLA („human leukocyte antigen”) alele i izostanak homologije sa proteinima ljudi (Garg et al., 2016; Huang et al., 2016). Izbor pojedinačnih antigena se prvobitno zasnivao na njihovom učešću u virulenciji *A. baumannii*. Na taj način su ispitani protein asociran sa biofilmom (Bap) (Fattahian et al., 2011), poli-N-acetil- β -(1-6)-glukozamin (PNAG) (Bentancor et al., 2012a), trimerni autotransporter (Ata) (Bentancor et al., 2012b), OmpA (Luo et al., 2012) i K1 kapsularni polisaharid (Russo et al., 2013) kao potencijalne vakcine. Takođe, određeni kandidati, kao što su OmpW (Huang et al., 2015) i Omp22 (Huang et al., 2016), su izabrani kao sastavni delovi vezikula spoljašnje membrane. Primenom reverzne vakcionologije i imunoproteomike su izdvojeni dodatni predloženi antigeni (Moriel et al., 2013; Fajardo Bonin et al., 2014; Chiang et al., 2015), ali su samo neki od njih testirani (NucAB, FilF, OmpK, FKIB i Ompp1) (Chiang et al., 2015; Garg et al., 2016; Singh et al., 2016). Sve testirane vakcine su, u različitoj meri, dovele do povećane produkcije antitela, smanjenja bakterija u organima i proinflatornih citokina u serumu, kao i povećanog preživljavanja eksperimentalnih životinja prilikom aktivne i pasivne imunizacije. Osnovnim nedostatkom ovog tipa vakcina se smatra potencijalna izmena u nivou ili potpuni izostanak ekspresije datog antigena tokom infekcije (García-Quintanilla et al., 2014). Ideja koja može prevazići ovaj problem je kombinovana upotreba definisanih antigena, što je čak i potvrđeno u nekoliko studija (Badmasti et al., 2015; Chiang et al., 2015).

Iako je spisak predloženih vakcina za *A. baumannii* relativno dug, izostanak kliničkih studija koje ispituju njihovu aplikabilnost govori u prilog tome da još uvek nije pronađen adekvatan kandidat. Višekomponentna vakcina definisanog sastava, visoke efikasnosti, široke

pokrivenosti izolata i zadovoljavajućeg nivoa bezbednosti za preventivne i terapijske svrhe se smatra odgovarajućim kandidatom vakcine za *A. baumannii*, koji može ući u klinička ispitivanja (Chen, 2015).

2. Cilj rada

Značajan porast unutarbolničkih infekcija izazvanih predstavnicima vrste *Acinetobacter baumannii* rezistentnim na karbapeneme je primećen u zemljama širom sveta. Budući da postojeći podaci za evropske zemlje ukazuju na izraženiji procenat izolata *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme u zemljama južne, jugoistočne i istočne Evrope, vrlo je važno uključiti i podatke za izolate *A. baumannii* iz Srbije, koji su do ove teze izostajali.

Prethodno je ustanovljeno da različiti uslovi spoljašnje sredine, kao i struktura, mogu uticati na doprinos komponenata bakterijske ćelije rezistenciji na antibiotike i virulenciji. Uticaj različitih uslova spoljašnje sredine na transkripciju porina roda *Acinetobacter* uključenih u rezistenciju na karbapeneme (*CarO* i *Omp33-36*), kao i njihova bioinformatička analiza, su bili predmet istraživanja ove teze.

U skladu sa prethodno navedenim, ciljevi rada bili su:

1. Molekularna karakterizacija kolekcije izolata *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme poreklom iz Srbije

- molekularna identifikacija i određivanje pripadnosti klonalnim grupama
- osetljivost na različite grupe β -laktamskih antibiotika
- određivanje prisustva molekularnih determinanti rezistencije na β -laktamske antibiotike

2. Ispitivanje uticaja stresa poreklom iz spoljašnje sredine i kontakta sa eukariotskim ćelijama na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena kliničkih izolata *A. baumannii*

- uticaj faze rasta na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena
- uticaj subinhibitorne koncentracije karbapenema na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena
- uticaj hipoksije na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena
- uticaj kontakta *A. baumannii* sa HaCaT keratinocitama čoveka na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena
- uticaj kontakta *A. baumannii* sa imunskim ćelijama pacova na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena
- nivo citotoksičnosti koji ostvaruju sojevi *A. baumannii* na HaCaT i imunske ćelije

3. Bioinformatička analiza porina CarO i Omp33-36

-analiza *carO* i *omp33-36* gena izolata *A. baumannii* poreklom iz Srbije

-filogenetska analiza porina CarO i Omp33-36

-analiza transmembranske topologije porina CarO i Omp33-36

-analiza polimorfnosti i varijabilnosti regiona porina CarO i Omp33-36

-analiza uticaja varijabilnosti aminokiselina porina CarO i Omp33-36 na biološku ulogu

-predikcija potencijalnih antigena u okviru aminokiselinske sekvence CarO i Omp33-36

porina

3. Materijal i metode

3. 1. Bakterijski izolati

Bakterijski izolati koji su korišćeni u izradi ove teze poreklom su iz Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić” i prikupljeni su u periodu od 2012. do 2015. godine. Spisak bakterijskih izolata je prikazan u Tabeli 1.

Tabela 1. Spisak bakterijskih izolata

Bakterijski izolat	Datum uzorkovanja	Uzorak
1865/12	01.06.2012.	hemokultura
1950/12	07.06.2012.	hemokultura
6051/12	08.06.2012.	bris jejunostome
6070/12	09.06.2012.	trahealni aspirat
6077/12	10.06.2012.	CVK
1995/12	11.06.2012.	hemokultura
6120/13	04.06.2013.	trahealni aspirat
6344/13	10.06.2013.	trahealni aspirat
6000	17.06.2013.	trahealni aspirat
7342	06.07.2013.	trahealni aspirat
8709	15.08.2013.	koža na potiljku
8761	16.08.2013.	ET tubus
8778	16.08.2013.	trahealni aspirat

4031	20.08.2013.	bris rane
280FA	18.09.2013.	BAL
9977	19.09.2013.	trahealni aspirat
10061	22.09.2013.	vrh ET tubusa
10271	29.09.2013.	trahealni aspirat
307FA	18.10.2013.	BAL
11587	30.10.2013.	trahealni aspirat
12655	26.11.2013.	dekubitalna rana
13056	07.12.2013.	trahealni aspirat
4530	29.12.2013.	hemokultura
16F	24.01.2014.	BAL
1031	28.01.2014.	vrh drena
1070	29.01.2014.	trahealni aspirat
1225	02.02.2014.	trahealni aspirat
1237	03.02.2014.	trahealni aspirat
813	14.02.2015.	vrh CVK

CVK-centralni venski kateter; ET-endotrahealni; BAL-bronhoalveolarni ispirak.

3. 2. Identifikacija bakterijskih izolata

Identifikacija bakterijskih izolata korišćenih u izradi ove teze je izvršena pomoću VITEK 2 Sistema (verzija 05.04, BioMerieux, Daram, Severna Karolina, SAD) na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić”. Za potvrdu identifikacije datih izolata dobijene VITEK 2 Sistemom korišćena je PCR („Polymerase Chain Reaction”) metoda

za amplifikaciju i sekvenciranje gena za 16S rRNK (Jovicic et al., 2009). Umnožavanje gena za 16S rRNK PCR metodom je vršeno mešanjem totalne DNK pojedinačnih izolata (0,1-1 µg) sa 2,5 µl 10 × reakcionog pufera („Standard reaction buffer” sa Mg²⁺, Kapa Biosystems, SAD), smešom dNTP (svaki dNTP po 200 µM), prajmerima (svaki po 2,5 µM; UNI16SF 5'-GAGAGTTTGATCCTGGC-3' i UNI16SR 5'-AGGAGGTGATCCAGCCG-3'), 0,25 µl *Taq* DNK polimeraze (Kapa Biosystems, SAD, 5 U/µl) i bidestilovanom vodom do finalne zapremine od 25 µl. Pri postavljanju PCR reakcija, kao negativna kontrola je korišćena reakciona smeša koja je imala sve prethodno navedene sastojke osim DNK matrice. PCR reakcije su rađene korišćenjem aparata „GeneAmp 2700 PCR Cycler” (Applied Biosystems, SAD) prema sledećem programu: inicijalna denaturacija na 95°C 5 minuta; 30 ciklusa sukcesivne denaturacije na 95°C 30 sekundi, hibridizacije na 55°C 30 sekundi i elongacije na 72°C 30 sekundi; finalna elongacija na 72°C 10 minuta. Dobijeni PCR amplikoni su prečišćeni korišćenjem „GeneJET PCR Purification kit”-a (Thermo Scientific, Litvanija) prema uputstvu proizvođača i sekvencirani uslužno u centru za sekvenciranje Macrogen (Macrogen Inc., Holandija).

3. 3. Genotipizacija izolata *Acinetobacter baumannii* rezistentnih na karbapeneme

3. 3. 1. Identifikacija klonalnih grupa *A. baumannii*

Identifikacija klonalnih grupa 28 izolata *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme je vršena PCR metodom u kojoj su istovremeno korišćeni prajmeri za tri različita gena (*ompA*, *csuE* i *bla_{OXA-51}*). Prajmeri korišćeni za identifikaciju odgovarajuće klonalne grupe su prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2. Spisak prajmera korišćenih za identifikaciju klonalnih grupa *A. baumannii*

Klonalna grupa	Gen	Sekvenca prajmera	Dužina amplikona (bp)	Referenca
Grupa 1	<i>ompA</i>	5'-GATGGCGTAAATCGTGGTA-3' 5'-CAACTTTAGCGATTTCTGG-3'	355	Turton et al., 2007
	<i>csuE</i>	5'-CTTTAGCAAACATGACCTACC-3' 5'-TACACCCGGGTTAATCGT-3'	702	
	<i>bla_{OXA-51}</i>	5'-GCGCTTCAAAATCTGATGTA-3' 5'-GCGTATATTTTGTTCATTC-3'	559	
Grupa 2	<i>ompA</i>	5'-GACCTTCTTATCACAACGA-3' 5'-CAACTTTAGCGATTTCTGG-3'	343	
	<i>csuE</i>	5'-GGCGAACATGACCTATTT-3' 5'-CTTCATGGCTCGTTGGTT-3'	580	
	<i>bla_{OXA-51}</i>	5'-CATCAAGGTCAAACCTCAA-3' 5'-TAGCCTTTTTTCCCCATC-3'	162	

Umnožavanje odgovarajućih gena PCR metodom je vršeno na način koji je naveden u odeljku 3.2. sa izuzetkom kada su u pitanju prajmeri. U zavisnosti da li se postavljala reakcija za klonalnu Grupu 1 ili 2, korišćena su istovremeno tri para prajmera za odgovarajuću grupu. PCR reakcije su rađene prema sledećem programu: inicijalna denaturacija na 94°C 3 minuta; 30 ciklusa sukcesivne denaturacije na 94°C 45 sekundi, hibridizacije na 57°C 45 sekundi i elongacije na 72°C 1 minut; finalna elongacija na 72°C 5 minuta.

Identifikacija određenog izolata kao pripadnika Grupe 1 ili Grupe 2 je zahtevala prisustvo PCR amplikona za sva tri gena sa prajmerima odgovarajućim za tu grupu i odsustvo PCR amplikona sa prajmerima za drugu grupu. Pripadnost Grupi 3 je zahtevala prisustvo PCR umnožaka sa prajmerima za *csuE* i *bla_{OXA-51}* gene Grupe 1 i *ompA* PCR umnoška sa prajmerima predviđenim za Grupu 2 (Turton et al., 2007).

3. 3. 2. Gel elektroforeza u pulsirajućem polju („Pulsed-Field Gel Electrophoresis”, PFGE)

PFGE metoda je vršena po modifikovanoj proceduri koju su ustanovili Kojić i saradnici (2005). Talog dobijen centrifugiranjem (2 min, 15 871 × g, centrifuga 5424, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) 100 µl logaritamske kulture je opran u 1 ml EET pufera (100 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8) i centrifugiran (1 min, 15 871 × g, centrifuga 5424,

Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Dobijeni talog je opran u 500 μ l EET pufera i suspenzija je centrifugirana (1 min, $15\ 871 \times g$, centrifuga 5424, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Čelijski pelet je resuspendovan u 50 μ l EET pufera, nakon čega je suspenzija zagrevana na 42°C da bi se sprečilo naglo stezanje agaroze nakon njenog dodavanja u uzorke. Otopljena agarosa (2% „SeaPlaque-GTG agarose”, FMC BioProducts, Rokland, Mejn, SAD) je dodavana u zapremini od 50 μ l u ćelijsku suspenziju i nakon kratkog mešanja nastavkom, ova mešavina je prenošena u kalupe za blokčiće. Stezanje blokčića je izvršeno premeštanjem na 4°C. U međuvremenu je pripremljen rastvor, koji sadrži 0,5 mg/ml proteinaze K, EET pufer i 0,5% SDS. Ovako pripremljen, rastvor je preinkubiran na 50°C u trajanju od 30 minuta. Nakon stezanja, blokčići su prebačeni u pojedinačne tube (15 ml), u koje je dodato 500 μ l rastvora koji se sadrži 0,5 mg/ml proteinaze K, EET pufer i 0,5% SDS. U cilju eliminisanja proteina, blokčići su ovom rastvoru inkubirani na 50°C preko noći. Narednog dana, nakon odlivanja rastvora, dodato je 10 ml 0,1 mM rastvora PMSF („phenylmethylsulfonyl-fluoride”), inhibitora proteinaze K. Blokčići su u ovom rastvoru mešani 30 minuta na sobnoj temperaturi, posle čega je rastvor odlivan, a postupak ponovljen. Zatim su oprani od prethodnog rastvora mešanjem u 10 ml vode. Mešanje je trajalo 15 minuta na sobnoj temperaturi, posle čega je voda odlivana, a postupak ponovljen. Nakon odlivanja vode, blokčići su sečeni na četiri dela i prebacivani u mikrotube. Dodavanjem 300 μ l $1 \times$ odgovarajućeg pufera za restrikcioni enzim (u ovom slučaju „Blue buffer”, UAB Fermentas, Viljnus, Litvanija) blokčići su ekvilibrisani za sečenje restrikcijom enzimom i ostavljeni 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 30 minuta, odliven je pufer i dodato je 100 μ l smeše odgovarajućeg pufera i enzima (20 U po blokčiću restrikcijom enzima *Apa*I, UAB Fermentas, Viljnus, Litvanija). Sečenje DNK restrikcijom enzimom je vršeno 3 sata na 37°C. Nakon toga je pufer sa enzimom odlivan, a dodato je 100 μ l stop pufera (40% saharoza, 10 mM EDTA, 0,01% bromfenol plavo, pH 8) da bi se zaustavilo dalje sečenje DNK i uzorci su prebačeni na 4°C.

PFGE je vršena u 1,2% agaroznom gelu. Gel je pravljen rastvaranjem agaroze u $1 \times$ TBE puferu (90 mM Tris, 90 mM borna kiselina, 2 mM EDTA, pH 8,3). U bunariće napravljenog gela je stavljen samo jedan od četiri blokčića sa uzorkom, nakon čega su bunarići zalivani ostatkom rastopljenog gela. PFGE je tekla u $0,5 \times$ TBE puferu (45 mM Tris, 45 mM borna kiselina, 1 mM EDTA, pH 8,3) u „2015 Pulsafor unit”-u (LKB Instruments, Broma, Švedska), sa elektrodama raspoređenim u obliku šestougla, na 9°C pri naponu od 300 V u trajanju od 16 sati. Vreme

pulsiranja je linearno raslo od 8 do 19 sekundi tokom elektroforeze. Nakon toga, dodat je etidijum bromid (0,5 µg/ml) u 0,5 × TBE pufer da bi se omogućila vizuelizacija DNK. Mešanje u trajanju od 30 min je obezbedilo rastvaranje i ujednačeno raspoređivanje etidijum bromida. Budući da se on ugrađuje i u gel, vršeno je njegovo odbojavanje ponovnim mešanjem gela u čistom 0,5 × TBE puferu u istom vremenskom intervalu.

PFGE dendrogram je konstruisan korišćenjem Wardove metode korelacije koeficijenata između različitih PFGE profila pomoću SPSS softvera verzija 21.0 (IBM Corp. izdato 2012. IBM SPSS statistika za Windows, verzija 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

3. 4. Medijumi za rast bakterija

Za kultivaciju izolata *A. baumannii* korišćen je Luria-Bertani (LB) tečni medijum (0,5% natrijum hlorid, 1% tripton i 0,5% ekstrakt kvasca). Čvrsta podloga za rast je dobijena dodavanjem 1,7% agara u LB medijum. Pored toga, za potrebe testa mikrodilucije i izolacije RNK, bakterije su gajene u komercijalnom Mueller-Hinton (MH) tečnom medijumu (Oxoid, Hempšir, Velika Britanija). Medijumi su sterilisani u autoklavu, 15 minuta na 121°C. Pre kultivacije, ampicilin (100 mg/L) je dodavan u tečni i otopljeni čvrsti LB medijum za rast izolata rezistentnih na karbapeneme. U cilju određivanja osetljivosti izolata *A. baumannii* na različite β-laktamske antibiotike mikrodilucionom metodom u MH medijum su dodavani antibiotici u sledećim koncentracijama: piperacilin (64-256 mg/L), piperacilin/tazobaktam (32-256 mg/L), ceftazidim (16-256 mg/L), aztreonam (8-256 mg/L) i imipenem (8-16 mg/L). Za potrebe ispitivanja uticaja subinhibitorne koncentracije karbapenema na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena u MH tečni medijum je dodavan imipenem (0,01 mg/L za soj 813, 1,6 mg/L za soj 1995/12 i 3,2 mg/L za soj 4031) ili meropenem (0,01 mg/L za soj 813 i 3,2 mg/L za soj 1995/12). Bakterije su gajene na 37°C uz intenzivnu aeraciju na 180 rpm. Modifikacije kultivacije koje su bile potrebne za specifične eksperimente su naglašene u narednim odeljcima.

3. 5. Određivanje osetljivosti na β-laktamske antibiotike

Inicijalna determinacija osetljivosti 28 izolata *A. baumannii* (izuzev izolata 813) na β-laktamske antibiotike je vršena određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) pomoću VITEK 2 Sistema. Ova analiza je urađena na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić”. Osetljivost izolata *A. baumannii* je ispitivana na sledeće

antibiotike: ampicilin, piperacilin, cefoksitin, ceftazidim, cefotaksim, cefepim, aztreonam, imipenem i meropenem. Takođe, ispitivana je osetljivost izolata na antibiotike u kombinaciji sa inhibitorima β -laktamaza (amoksicilin/klavulanska kiselina i piperacilin/tazobaktam).

Pored toga, osetljivost na β -laktamske antibiotike izolata korišćenih u ovoj tezi je ispitivana i mikrodilucionom metodom (CLSI, 2010). Tumačenje dobijenih rezultata je vršeno prema graničnim vrednostima za antimikrobnu osetljivost *Acinetobacter* spp. propisanu od Evropskog komiteta za testiranje antimikrobne osetljivosti (Tabela za interpretaciju graničnih vrednosti MIKova i prečnika zona, verzija 4.0, 2014. <http://www.eucast.org>). Vrednosti su izražene kroz pedeset procenata rasta bakterija u odnosu na kultivaciju bakterija u odsustvu antibiotika (IC50) za izolate koji su se prethodno pokazali rezistentnim na karbapeneme. Osetljivost 28 izolata rezistentnih na karbapeneme je ispitivana na piperacilin, piperacilin u kombinaciji sa tazobaktamom, ceftazidim, aztreonam i imipenem. Dodatno, osetljivost na karbapeneme izražena kroz MIK vrednosti je određivana mikrodilucionom metodom za izolate, koji su korišćeni u ispitivanju uticaja subinhibitorne koncentracije karbapenema na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena (imipenem-813, 1995/12 i 4031; meropenem-813 i 1995/12). Određivanje IC50 i MIK vrednosti je rađeno u triplikatu.

3. 6. Metoda za izolaciju totalne DNK

Izolacija totalne DNK izolata *A. baumannii* započinje resuspendovanjem ćelijskog taloga, dobijenog centrifugiranjem (2 min, $15\ 871 \times g$, centrifuga 5424, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) 1,5 ml prekonoćne kulture, u 500 μ l TEN pufera (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8). Liziranje ćelija je omogućeno dodavanjem 250 μ l 2% SDS-a („sodium dodecyl sulfate”) i obrtanjem uzorka. Prečišćavanje od proteina je vršeno višestrukim dodavanjem 200 μ l neutralnog fenola, vorteksovanjem i centrifugiranjem uzorka (10 min, $15\ 871 \times g$, centrifuga 5424, Eppendorf, Hamburg, Nemačka), sve do gubitka interfaze. Nakon svakog centrifugiranja supernatant je prebacivan u novu mikrotubu. Precipitacija je omogućena dodavanjem 0,1 volumena nepuferisanog 3 M Na-acetata i 0,7 volumena izopropanola, nakon čega je sledilo centrifugiranje (20 min, $15\ 871 \times g$, centrifuga 5424, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Talog je opran dodavanjem 500 μ l 70% etanola i centrifugiranjem (10 min, $15\ 871 \times g$, centrifuga 5424, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Dobijeni talog je sušen na 37°C, a zatim

resuspendovan u bidestilovanoj vodi. Preostala RNK je eliminisana dodatkom 1 µl RNaze (10 mg/ml) u uzorak i inkubacijom na 37°C u trajanju od 15 minuta.

3. 7. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom

PCR metodom je ispitano prisustvo sledećih gena u izolatima *A. baumannii* rezistentnim na karbapeneme: *bla*_{AmpC}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-143}, *bla*_{OXA-235}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}, *carO* i *omp33-36*. Takođe, na ovaj način je detektovano i pozicioniranje *ISAbal* uzvodno od *bla*_{AmpC} i *bla*_{OXA} gena. Za soj koji je senzitiv na karbapeneme (813) je vršena samo amplifikacija *carO* i *omp33-36* gena. Parovi prajmera korišćeni za umnožavanje datih gena i određivanje prisustva *ISAbal* uzvodno od *bla*_{AmpC} i *bla*_{OXA} gena su prikazani u Tabeli 3. Za detektovanje prisustva *ISAbal* uzvodno od *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51} i *bla*_{OXA-58} gena je korišćen prajmer *ISAbal-F* u paru sa *OXA-23-like-R*, *OXA-24-like-R*, *OXA-51-like-R* i *OXA-58-like-R*, redom.

Tabela 3. Spisak prajmera korišćenih za umnožavanje gena čiji su produkti uključeni u rezistenciju na β -laktamske antibiotike i određivanje prisustva IS*AbaI* uzvodno od *bla*_{AmpC} i *bla*_{OXA} gena

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Dužina amplikona (bp)	Referenca
AmpC-F	5'-ACTTACTTCAACTCGCGACG-3'	663	Beceiro et al., 2004
AmpC-R	5'-TAAACACCACATATGTTCCG-3'		
OXA-23-like-F	5'-GATCGGATTGGAGAACCAGA-3'	501	Woodford et al., 2006
OXA-23-like-R	5'-ATTTCTGACCGCATTTCAT-3'		
OXA-24-like-F	5'-GGTTAGTTGGCCCCCTAAA-3'	246	
OXA-24-like-R	5'-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT-3'		
OXA-51-like-F	5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3'	353	
OXA-51-like-R	5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'		
OXA-58-like-F	5'-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG-3'	599	
OXA-58-like-R	5'-CCCCTCTGCGCTCTACATAC-3'		
OXA-143-F	5'-TGGCACTTTCAGCAGTTCCT-3'	149	Higgins et al., 2010
OXA-143-R	5'-TAATCTTGAGGGGGCCAACC-3'		
OXA-235-F	5'-TTGTTGCCTTTACTTAGTTGC-3'	768	Higgins et al., 2013
OXA-235-R	5'-CAAAATTTAAGACGGATCG-3'		
IMP-A	5'-GAAGGYGTTTATGTTTCATAC-3'	587	Pitout et al., 2005
IMP-B	5'-GTAMGTTTCAAGAGTGATGC-3'		
VIM2004A	5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3'	382	
VIM2004B	5'-AATGCGCAGCACCAGGATAG-3'		
NDMFF	5'-ATGGAATTGCCAATATTATG-3'	815	Teo et al., 2012
NDMRR	5'-TCAGCGCAGCTTGTGCGGCC-3'		
KPCF2	5'-GTATCGCCGTCTAGTTCTGC-3'	637	Wolter et al., 2009
KPCR2	5'-GGTCGTGTTCCCTTAGCC-3'		
carO-F	5'-ATTGTAGAAAGCTGAGACAT-3'	~1300	Mussi et al., 2011
carO-R	5'-ATTTCTYTATGCTCACCTGA-3'		

33-36Omp-F	5'-ATGAAAAAATTGGTTTAGCCAC-3'	880	Ova teza
33-36Omp-R	5'-AGAAACGGAATTTAGCA-3'		
ISAbal-F	5'-AAAGGATCCCTCTGTACACGACAAATTTAC-3'	1369	Beceiro et al., 2009
ampInt-R	5'-GCCGACTTGATAGAA-3'		

Y-C ili T; M-A ili C.

Umnožavanje navedenih gena PCR metodom je vršeno na način koji je opisan u odeljku 3.2. uz korišćenje odgovarajućih prajmera. PCR reakcije za umnožavanje određenih gena ili regiona, koji obuhvataju ISAbal i *bla*_{AmpC} ili *bla*_{OXA} gen, su rađene po uslovima prikazanim u Tabelama 4-12.

Tabela 4. Šema PCR reakcije za *bla*_{AmpC} gen

Faza reakcije	Temperatura	Vreme	
Inicijalna denaturacija	94°C	10 min	
Denaturacija	94°C	1 min	
Hibridizacija	50°C	1 min	30 ciklusa
Elongacija	72°C	2 min	
Finalna elongacija	72°C	10 min	

Tabela 5. Šema PCR reakcije za *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-143} i *bla*_{OXA-235} gene

Faza reakcije	Temperatura	Vreme	
Inicijalna denaturacija	94°C	5 min	
Denaturacija	94°C	25 s	
Hibridizacija	52°C	40 s	30 ciklusa
Elongacija	72°C	50 s	
Finalna elongacija	72°C	6 min	

Tabela 6. Šema PCR reakcije za *bla_{IMP}* i *bla_{VIM}* gene

Faza reakcije	Temperatura	Vreme	
Inicijalna denaturacija	94°C	5 min	
Denaturacija	94°C	1 min	
Hibridizacija	54°C	1 min	30 ciklusa
Elongacija	72°C	1,5 min	
Finalna elongacija	72°C	10 min	

Tabela 7. Šema PCR reakcije za *bla_{NDM-1}* gen

Faza reakcije	Temperatura	Vreme	
Inicijalna denaturacija	95°C	10 min	
Denaturacija	94°C	1 min	
Hibridizacija	58°C	30 s	30 ciklusa
Elongacija	72°C	1 min	
Finalna elongacija	72°C	10 min	

Tabela 8. Šema PCR reakcije za *bla_{KPC}* gen

Faza reakcije	Temperatura	Vreme	
Inicijalna denaturacija	95°C	5 min	
Denaturacija	94°C	1 min	
Hibridizacija	55°C	30 s	33 ciklusa
Elongacija	72°C	45 s	
Finalna elongacija	72°C	10 min	

Tabela 9. Šema PCR reakcije za *carO* gen

Faza reakcije	Temperatura	Vreme	
Inicijalna denaturacija	95°C	5 min	
Denaturacija	94°C	1 min	
Hibridizacija	55°C	1 min	30 ciklusa
Elongacija	72°C	45 s	
Finalna elongacija	72°C	10 min	

Tabela 10. Šema PCR reakcije za *omp33-36* gen

Faza reakcije	Temperatura	Vreme	
Inicijalna denaturacija	94°C	5 min	
Denaturacija	94°C	30 s	
Hibridizacija	48°C	30 s	30 ciklusa
Elongacija	72°C	45 s	
Finalna elongacija	72°C	10 min	

Tabela 11. Šema PCR reakcije za detektovanje IS*AbaI* uzvodno od *bla*_{AmpC} gena

Faza reakcije	Temperatura	Vreme	
Inicijalna denaturacija	95°C	4 min	
Denaturacija	94°C	1 min	
Hibridizacija	40°C	1 min	30 ciklusa
Elongacija	72°C	2 min	
Finalna elongacija	72°C	10 min	

Tabela 12. Šema PCR reakcije za detektovanje IS*Abal* uzvodno od *bla*_{OXA} gena

Faza reakcije	Temperatura	Vreme	
Inicijalna denaturacija	95°C	5 min	
Denaturacija	94°C	1 min	
Hibridizacija	52°C	30 s	30 ciklusa
Elongacija	72°C	1,5 min	
Finalna elongacija	72°C	7 min	

Dobijeni PCR amplikoni su prečišćeni korišćenjem „GeneJET PCR Purification kit”-a (Thermo Scientific, Litvanija) prema uputstvu proizvođača i sekvencirani uslužno u centru za sekvenciranje Macrogen (Macrogen Inc., Holandija).

3. 8. Elektroforeza DNK

Elektroforeza totalne DNK i fragmenata dobijenih PCR umnožavanjem vršena je u 1% agaroznom gelu. Gelovi su pravljani rastvaranjem agaroze u 1 × TAE puferu (40 mM Tris acetat, 2 mM EDTA, finalno pH 8) uz dodavanje etidijum bromida (0,5 µg/ml). Za elektroforezu je korišćen 1 × TAE pufer. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela. Veličine DNK fragmenata su određivane poređenjem dužine pređenog puta DNK fragmenta koji se analizira i dužine puta koji pređu DNK fragmenti poznate veličine (standard). Kao DNK standard je korišćen „GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder” (Thermo Scientific, MA, SAD), čiji su fragmenti dugi 20 000, 10 000, 7 000, 5 000, 4 000, 3 000, 2 000, 1 500, 1 000, 700, 500, 400, 300, 200 i 75 bp.

3. 9. Kultivacija *A. baumannii* u uslovima stresa

3. 9. 1. Kultivacija *A. baumannii* u prisustvu subinhibitorne koncentracije karbapenema tokom različitih faza rasta

Selekcija izolata i antibiotika, korišćenih u ovom eksperimentu, je izvršena na osnovu osetljivosti izolata na karbapeneme (813 je osetljiv, dok su 1995/12 i 4031 rezistentni na karbapeneme), funkcionalnosti CarO porina (813 i 1995/12 imaju divlji tip *carO* gena, dok 4031 poseduje inaktiviran gen usled ugradnje IS) (Novovic et al., 2015) i činjenice da CarO porin poseduje specifično mesto za imipenem, ali ne i meropenem. Stoga su sva tri izolata kultivisana u prisustvu subinhibitorne koncentracije (1/10 MIK vrednosti za određeni izolat) imipenema, a samo 813 i 1995/12 u prisustvu subinhibitorne koncentracije meropenema. Izolati *A. baumannii* 813, 1995/12 i 4031 su kultivisani u MH tečnom medijumu sa odgovarajućom koncentracijom karbapenema na 37°C uz aeraciju na 180 rpm. Gustina bakterijskih ćelija je merena na 600 nm (OD₆₀₀) korišćenjem spektrofotometra (Ultrospec 500 pro, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Engleska) i rast je zaustavljan u različitim fazama rasta (rana, srednja, kasna eksponencijalna i stacionarna faza rasta) odvajanjem alikvota. Prikupljene ćelije su centrifugirane (2 minuta, 15 871 × g, centrifuga 5424, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i potom korišćene za izolaciju RNK. Kontrolu su predstavljale ćelije koje su kultivisane u odsustvu karbapenema. Eksperimenti su rađeni u triplikatu.

3. 9. 2. Kultivacija *A. baumannii* u hipoksičnim uslovima

Kultivacija izolata 813 u hipoksičnim uslovima je postignuta gajenjem bakterija u anaerobnim posudama uz dodatak „CampyGen™ 2.5L” (Thermo Scientific, MA, SAD) na 37°C preko noći. Nakon obaranja (2 minuta, 15 871 × g, centrifuga 5424, Eppendorf, Hamburg, Nemačka), ćelije su korišćene za izolaciju RNK. Bakterije gajene u aerobnim uslovima su predstavljale kontrolni uzorak. Eksperimenti su rađeni u triplikatu.

3. 10. Infekcija eukariotskih ćelija sa *A. baumannii*

3. 10. 1. Infekcija HaCaT keratinocita čoveka sa *A. baumannii*

Ćelijska linija humanih keratinocita HaCaT je gajena u DMEM („Dulbecco's Modified Eagle's Medium”) medijumu sa visokom koncentracijom glukoze od 4500 mg/L u CO₂ inkubatoru (5% CO₂) na 37°C. DMEM medijum je dodatno sadržao 10% fetalnog goveđeg seruma („Fetal Bovine Serum”, FBS), 2 mM L-glutamina, 100 µg/ml streptomicina i 100 U/ml penicilina. Navedene hemikalije za kultivaciju ćelija su proizvedene u kompaniji Gibco, Life Technologies. HaCaT ćelije su pre infekcije zasejane u flaskove površine 25 cm² (T-25, Sarstedt, Nemačka) u broju od 1×10⁶ i gajene na 37°C preko noći u CO₂ inkubatoru. Pre dodavanja bakterija, ćelije su oprane u fosfatnom puferu („Phosphate-Buffered Saline”, PBS) i resuspendovane u prethodno navedenom medijumu bez antibiotika.

Bakterijske ćelije (813, 1995/12 i 4031) su gajene u MH tečnom medijumu na 37°C uz aeraciju na 180 rpm preko noći. Medijum u kome se nalazilo 1×10⁸ ćelija je obaran na 15 871 × g 2 minuta u centrifugi 5424 (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), nakon čega su ćelije oprane u rastvoru PBS. Nakon ponovnog obaranja, bakterije su resuspendovane u DMEM medijumu sa visokom koncentracijom glukoze, koji je sadržao 10% FBS-a i 2 mM L-glutamina.

Infekcija HaCaT ćelija je izvršena dodavanjem bakterija u flask sa keratinocitama (multiplicitet infekcije je bio 100). Humane i bakterijske ćelije su koinkubirane na 37°C u CO₂ inkubatoru u trajanju od 21 h. Sakupljeni medijum sa bakterijskim ćelijama je centrifugiran (5 minuta, 405 × g, klinička centrifuga 5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) u cilju obaranja preostalih keratinocita koje nisu adherirale za flask. Nakon toga je supernatant sa bakterijskim ćelijama obaran u kliničkoj centrifugi 5804R (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) na 4500 × g 5 minuta i sakupljeni pelet je korišćen za izolaciju RNK. Negativnu kontrolu su predstavljale bakterije gajene u gore navedenim uslovima, ali u odsustvu HaCaT keratinocita. Eksperimenti su rađeni u triplikatu.

3. 10. 2. Infekcija imunskih ćelija pacova sa *A. baumannii*

Imunske ćelije su izolovane iz mezenteričnih limfnih čvorova pacova soja Wistar. Izolovane ćelije su zasejane u količini 2×10⁶ po bunaru (TC 24-well plate, Sarstedt, Nemačka) u

RPMI-1640 („Roswell Park Memorial Institute 1640”) medijum (Gibco, Life Technologies) sa 10% FBS-a i 2 mM L-glutamina.

Ćelije *A. baumannii* izolata 813 su gajene u MH tečnom medijumu na 37°C uz aeraciju na 180 rpm preko noći. Obaranje 2×10^8 bakterijskih ćelija je vršeno na $15\ 871 \times g$ 2 minuta u centrifugi 5424 (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), nakon čega su oprane u rastvoru PBS. Ponovno oborene bakterije su resuspendovane u RPMI-1640 medijumu koji je sadržao 10% FBS-a.

Infekcija je izvršena dodavanjem bakterijskih ćelija u bunar sa imunskim ćelijama (multiplicitet infekcije je bio 100). Koinkubacija imunskih i bakterijskih ćelija je vršena na 37°C u CO₂ inkubatoru u trajanju od 21 h. Sakupljeni medijum sa imunskim i bakterijskim ćelijama je centrifugiran u kliničkoj centrifugi 5804R (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) na $405 \times g$ 5 minuta u cilju obaranja imunskih ćelija. Nakon toga je supernatant sa bakterijskim ćelijama obaran (5 minuta, $4500 \times g$, klinička centrifuga 5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i sakupljeni pelet je korišćen za izolaciju RNK. Bakterije gajene u gore navedenim uslovima, ali bez imunskih ćelija su predstavljale negativnu kontrolu. Eksperimenti su rađeni u triplikatu.

3. 11. Test citotoksičnosti *A. baumannii*

Nivo citotoksičnosti koji ostvaruje *A. baumannii* na humane HaCaT ćelije i imunske ćelije pacova je određen putem LDH („Lactate dehydrogenase”) eseja. Naime, procenat citotoksičnosti pojedinačnih izolata je vršen merenjem aktivnosti oslobođene laktat dehidrogenaze iz mrtvih ćelija korišćenjem komercijalnog kita za određivanje citotoksičnosti („Cytotoxicity Assay Kit”, Thermo Scientific, Litvanija). Aktivnost oslobođene laktat dehidrogenaze je merena u supernatantu, dobijenom nakon obaranja bakterijskih ćelija, prema uputstvu proizvođača. Apsorbanca je merena na 490 nm u spektrofotometru za merenje mikrotitarskih ploča (Tecan Austria, GmbH, Austrija). U cilju detektovanja aktivnosti laktat dehidrogenaze eukariotskih ćelija, dobijene vrednosti su normalizovane u odnosu na one poreklom iz bakterijskih ćelija (bakterije gajene u odsustvu eukariotskih ćelija).

3. 12. Metode rada sa RNK iz bakterijskih ćelija

3. 12. 1. Metoda za izolaciju RNK iz bakterijskih ćelija

Bakterijski peleti, prikupljeni nakon rasta bakterija u različitim uslovima spoljašnje sredine i tokom različitih faza rasta, su korišćeni za izolaciju RNK. Izolacija RNK iz bakterijskih ćelija je vršena korišćenjem „RNeasy Mini Kit”-a (Qiagen, Nemačka) uz određene modifikacije. Ćelije su enzimski lizirane resuspendovanjem u 100 µl TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6), koji je sadržao 15 mg/ml lizozima (Serva, Nemačka) i 20 mg/ml proteinaze K (Sigma-Aldrich, Misuri, SAD), uz inkubaciju na 37°C 1 h (Hood et al., 2010). Nakon dodavanja 250 µl 96% etanola i intenzivnog mešanja, ćelijski lizat je prebacivan u kolone i centrifugiran (15 s, 15 871 x g, centrifuga 5424, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Pranje RNK vezane za membranu kolone je vršeno dodavanjem 700 µl pufera RW1 i centrifugiranjem (15 s, 15 871 x g, centrifuga 5424, Eppendorf, Hamburg, Nemačka), a zatim dodavanjem 500 µl RPE pufera u dva navrata (prvo centrifugiranje 15 s, a drugo centrifugiranje 2 min na 15 871 x g, centrifuga 5424, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Odvajanje RNK od membrane kolone je vršeno resuspendovanjem u 30 µl vode oslobođene od RNaza i centrifugiranjem (1 min, 15 871 x g, centrifuga 5424, Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

3. 12. 2. Metoda za prečišćavanje RNK od DNK molekula

Prečišćavanje RNK, izolovane iz bakterijskih ćelija, od DNK je vršeno korišćenjem „Ambion DNA-freeTM Kit”-a (Thermo Fisher Scientific, MA, SAD). Degradacija zaostale DNK je obavljena inkubacijom RNK u rastvoru 0,1 volumena 10 × pufera za DNazu I i 1 µl DNaze I na 37°C 30 minuta. Po isteku inkubacije, dodat je 0,1 volumen reagensa za inaktivaciju DNaze I, ovakav rastvor je blago mešan i centrifugiran (1,5 minut, 15 871 x g, centrifuga 5424, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Nakon centrifugiranja, supernatant, u kome se nalazila RNK oslobođena od suvišnih komponenata, je prebacivan u nove mikrotube.

3. 12. 3. Reverzna transkripcija RNK

Prevođenje prečišćene RNK u cDNK („complementary DNA”) je urađeno korišćenjem „RevertAid RT Reverse Transcription Kit”-a (Thermo Fisher Scientific, MA, SAD). Kao matrica za reakciju reverzne transkripcije je korišćena prečišćena RNK (500 ng), kojoj je dodat 1 µl

nasumičnih heksmera i voda oslobođena od RNaze do zapremine od 12,5 μ l. Ova smeša je inkubirana na 65°C 5 minuta u cilju denaturisanja potencijalnih sekundarnih struktura RNK molekula. Nakon toga, u smešu je dodat 1 \times reakcionog pufera, 20 U RNaznog inhibitora („Ribolock“-a), 1 mM dNTP miksa i 200 U reverzne transkriptaze do finalne zapremine od 20 μ l. Reakcija reverzne transkripcije je bila obavljena prema sledećem programu: 25°C 10 minuta, 42°C 60 minuta i 70°C 10 minuta. Provera potencijalne kontaminacije sa DNK je izvršena postavljanjem reakcija paralelno sa prethodno navedenim, ali bez dodavanja reverzne transkriptaze. Uspešnost prevođenja RNK u cDNK, kao i potvrda odsustva DNK u uzorcima, je proverena PCR reakcijom za konstitutivno eksprimiran gen *rpoB*. Priprema reakcije za PCR je urađena kao što je navedeno u odeljku 3.2. korišćenjem prajmera *rpoB* for (5'-TCCGCACGTAAAGTAGGAAC-3') i *rpoB* rev (5'-ATGCCGCCTGAAAAAGTAAC-3') (Coyne et al., 2010). Uslovi date PCR reakcije su bili sledeći: inicijalna denaturacija na 95°C 5 minuta; 30 ciklusa sukcesivne denaturacije na 95°C 30 sekundi, hibridizacije na 48°C 30 sekundi i elongacije na 72°C 30 sekundi; finalna elongacija na 72°C 10 minuta. Reverzna transkripcija, kao i PCR reakcija, su obavljene u aparatu „GeneAmp 2700 PCR Cycler“ (Applied Biosystems, SAD).

3. 13. Metoda transkripcione analize RT-qPCR („Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction“)

Analiza transkripcije *carO* i *omp33-36* gena *A. baumannii* u različitim uslovima spoljašnje sredine i tokom različitih faza rasta je vršena RT-qPCR metodom korišćenjem „KAPA SYBR Fast qPCR Kit“-a (KAPA Biosystems, MA, SAD). Reakcija, čija je finalna zapremina bila 10 μ l, je sadržala 1 μ l sintetisane cDNK, po 20 ng odgovarajućih prajmera, 0,2 μ l Rox Low referentne boje, 1 \times „KAPA SYBR FAST Universal Master Mix“-a i bidestilovanu vodu. RT-qPCR je obavljen u aparatu „7500 Real Time PCR System thermocycler“ (Applied Biosystems, SAD) prema sledećim uslovima: 95°C 3 minuta, 40 sukcesivnih ciklusa 95°C 15 s i 60°C 1 minut. Prajmeri za umnožavanje ciljnih cDNK su prikazani u Tabeli 13, a prajmeri za umnožavanje cDNK konstitutivno eksprimiranog gena *rpoB* su navedeni u odeljku 3.12.3. Reakcijom apsolutne kvantifikacije je utvrđena efikasnost prajmera i količina cDNK adekvatna za RT-qPCR. Transkripcija ciljnih gena je izračunata po formuli $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak i Schmittgen, 2001). U datoj formuli $\Delta\Delta Ct$ vrednost predstavlja razliku između ΔCt vrednosti određenog

uzorka i ΔCt vrednosti uzorka koji je kalibrator. Vrednost ΔCt je razlika Ct vrednosti dobijene za ciljani gen (*carO* ili *omp33-36*) i konstitutivno eksprimiran gen (*rpoB*). U zavisnosti od uslova rasta bakterija, kalibratori su bili sledeći: uzorak iz rane eksponencijalne faze rasta koji je rastao u odsustvu subinhibitorne koncentracije karbapenema, kao i za svaku pojedinačnu fazu rasta uzorak koji nije tretiran karbapenemima; uzorak koji je rastao pri normalnoj koncentraciji kiseonika; uzorak koji je rastao u odsustvu HaCaT ili imunskih ćelija. Transkripcija ciljnih gena je izražena za svaki soj pojedinačno. Eksperimenti RT-qPCR su rađeni u triplikatu.

Tabela 13. Spisak prajmera za umnožavanje ciljnih cDNK

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Referenca
CarO-RT F	5'-GGGTTATAACGGCGGTGAC-3'	Ova teza
CarO-RT R	5'-CCCAGCAGCTACATATAAGCC-3'	
Omp33-RT F	5'-GCTTATCAATTTGAAGTTCAAGGTC-3'	
Omp33-RT R	5'-GCTTGGTTTAAGAAAGCTGC-3'	

3. 14. Bioinformatička analiza CarO i Omp33-36 porina

3. 14. 1. Analiza nukleotidnih sekvenci *carO* i *omp33-36* gena izolata *A. baumannii* poreklom iz Srbije

Nukleotidne sekvence gena za porine CarO i Omp33-36 izolata *A. baumannii* poreklom iz Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić” su analizirane korišćenjem „DNA Strider” programa verzije 1.4f7 (Marck, 1988). Poređenje datih sekvenci s onima koje se nalaze u bazi podataka NCBI („National Center for Biotechnology Information”) je vršeno upotrebom BLAST („Basic Local Alignment Search Tool”) programa za nukleotidne sekvence.

3. 14. 2. Pretraga aminokiselinskih sekvenci CarO i Omp33-36 porina

Osnovno oruđe za konstrukciju proteinskog profila CarO i Omp33-36 je bio algoritam PSI-BLAST („Position-Specific Iterated BLAST”) (Altschul et al., 1997), koji ima mogućnost pretraživanja NCBI baze podataka. Prototip za CarO je bila sekvenca DQ309875, dok je Omp33-36 prototip predstavljala CAH40841.2 sekvenca. Parametri pretrage su bili ograničeni na familiju *Moraxellaceae* i e vrednost do $1e^{-4}$, a korišćena matrica je bila BLOSUM62. Takođe, za Omp33-36 je pretraga obavljena i za vrstu *A. baumannii* posebno, sa istom graničnom e vrednošću. U daljoj analizi su korišćeni svi pogoci za CarO i Omp33-36 roda *Acinetobacter* iznad 47% i 27% identičnosti, kao i 68% i 71% pokrivenosti dužine proteina, redom.

3. 14. 3. Filogenetska analiza CarO i Omp33-36 porina

Konstrukcija filogenetskih stabala za porine CarO i Omp33-36 je vršena korišćenjem MEGA („Molecular Evolutionary Genetics Analysis”) softvera verzije 6.0 (Tamura et al., 2013) i 7.0 (Kumar et al., 2016), redom. Prethodno selektovane aminokiselinske sekvence, kao i sekvence izolata uključenih u ovu tezu, su višestruko poravnate pomoću „Vector NTI” programa, koji koristi „Clustal W” algoritam (Thompson et al., 1994). Kandidati čija se dužina značajno razlikovala od većine poravnatih sekvenci su odbačeni. Filogenetska stabla su dobijena korišćenjem metode maksimalne sličnosti („Maximum-Likelihood”, ML) i „Jones-Thompson-Taylor” modela. Verodostojnost dobijenih stabala je proveravana podešavanje parametra „bootstrap” na 1000 ponavljanja. Slike dobijenih Omp33-36 stabala za rod *Acinetobacter* i vrstu *A. baumannii* su obrađene u alatu dostupnom na internetu iTOL („interactive Tree Of Life”) verzije 3. (Letunic i Bork, 2016).

3. 14. 4. Predikcija topologije CarO i Omp33-36 porina

Predikcija topologije porina CarO i Omp33-36 je vršena pomoću PRED-TMBB („Prediction of TransMembrane Beta-Barrel Proteins”) internet servera (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/>). Ovaj server se zasniva na skrivenom Markovljevom modelu za predviđanje topologije transmembranskih proteina spoljašnje membrane Gram-negativnih bakterija koji formiraju strukturu β -bureta (Bagos et al., 2004). Pojedinačni predstavnici različitih izoformi CarO i Omp33-36 porina (varijanti vrste *A.*

baumannii), ustanovljenih filogenetskom analizom, su korišćeni za predviđanje transmembranske topologije.

3. 14. 5. Analiza polimorfnosti CarO i Omp33-36 porina i varijabilnosti njihovih regiona

Poređenjem aminokiselina različitih CarO i Omp33-36 porina roda *Acinetobacter* na pojedinačnim pozicijama ustanovljena je konzervisanost/varijabilnost date pozicije u porinu, kao i polimorfnost porina uopšte. Ove osobine su utvrđene izračunavanjem Šenonove entropije za svaku poziciju aminokiseline u porinu prema sledećoj formuli:

$$H = -\sum_{i=1}^M Pi \log_2 Pi$$

U datoj formuli P_i predstavlja učestalost aminokiseline i , a M broj aminokiselina na datoj poziciji. Šenonova entropija (H) ima opseg od 0 (samo jedna aminokiselina) do 4,32 (svih dvadeset aminokiselina su podjednako zastupljene na datoj poziciji) (Shannon, 1948). U zavisnosti od H vrednosti aminokiselina određenih regiona, oni su smatrani konzervisanim, varijabilnim ili hipervarijabilnim.

3. 14. 6. Uticaj varijabilnosti aminokiselina CarO i Omp33-36 na biološku ulogu

Uticaj variranja aminokiselina (zamena, insercija ili delecija) na određenoj poziciji na biološku ulogu CarO i Omp33-36 porina je ispitivan korišćenjem PROVEAN („Protein Variation Effect Analyzer”) softvera (<http://provean.jcvi.org/index.php>) (Choi i Chan, 2015). Aminokiselinska sekvenca porina u odnosu na koju su analizirane ostale preselektovane sekvence (kanonska sekvenca) je bila predstavnik varijante I/1 za CarO i Omp33-36, redom.

3. 15. Statistička obrada rezultata

Rezultati koji su dobijeni u ovoj studiji su predstavljeni kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Statistička obrada rezultata je izvršena pomoću SPSS 20.0 programa za „Windows”. „GraphPad Prism” program je predstavljao alat za grafički prikaz rezultata. Studentov t -test je korišćen za poređenje kontrolne i eksperimentalne grupe, dok je jednofaktorska analiza varijanse („One-way ANOVA”) praćena „Tukey *post hoc*” testom

upotrebljena za poređenje više eksperimentalnih grupa. Vrednost verovatnoće $p \leq 0,05$ je smatrana statistički značajnom.

4. Rezultati

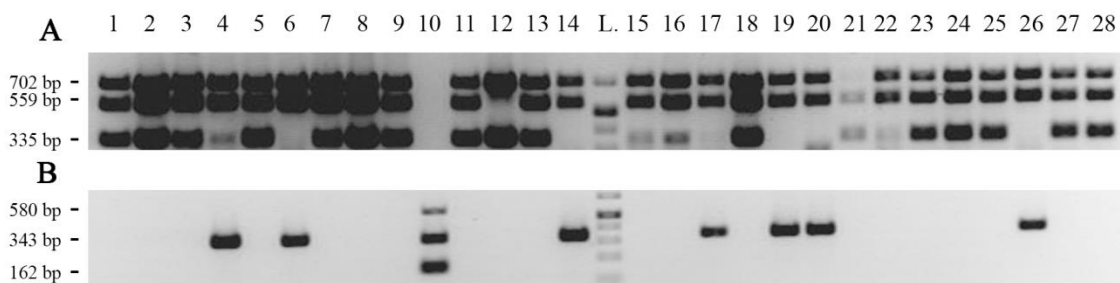
4. 1. Identifikacija bakterijskih izolata

Bakterijski izolati poreklom iz Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić” (n=29) su identifikovani kao kompleks *Acinetobacter baumannii* upotrebom VITEK 2 Sistema. Umnožavanjem i sekvenciranjem gena za 16S rRNK, dati izolati su identifikovani do nivoa vrste. Nakon poređenja sekvenciranih amplikona gena za 16S rRNK sa sekvencama u NCBI bazi podataka, svi izolati uključeni u ovu tezu su identifikovani kao vrsta *A. baumannii*. Nukleotidne sekvence gena za 16S rRNK 28 korišćenih izolata su deponovane u Evropskoj nukleotidnoj arhivi pod pristupnim brojevima LN611347-LN611374 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/LN611347-LN611374>), dok se nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK izolata 813 nalazi u Prilogu 1.

4. 2. Genotipizacija izolata *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme

4. 2. 1. Identifikacija klonalnih grupa *A. baumannii*

Pripadnost izolata *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme (n=28) određenoj klonalnoj grupi je ustanovljena PCR metodom u kojoj su umnožavana tri različita gena (*ompA*, *csuE* i *bla_{OXA-51-like}*) (Slika 5). Najrasprostranjenija je bila Grupa 1 (ekvivalent Evropskog klona II), koja je obuhvatala 67,86% izolata (n=19; 1865/12, 1950/12, 6051/12, 6070/12, 6077/12, 1995/12, 6120/13, 6344/13, 6000, 7342, 280FA, 10061, 10271, 307FA, 4530, 16F, 1031, 1070 i 1225). Pripadnik Grupe 2 (ekvivalent Evropskog klona I) je bio samo jedan izolat (4031), dok je u Grupi 3 (ekvivalent Evropskog klona III) svrstano sedam izolata (8709, 8761, 9977, 11587, 12655, 13056 i 1237). Izolat 8778 nije pripadao nijednoj od tri navedene klonalne grupe.

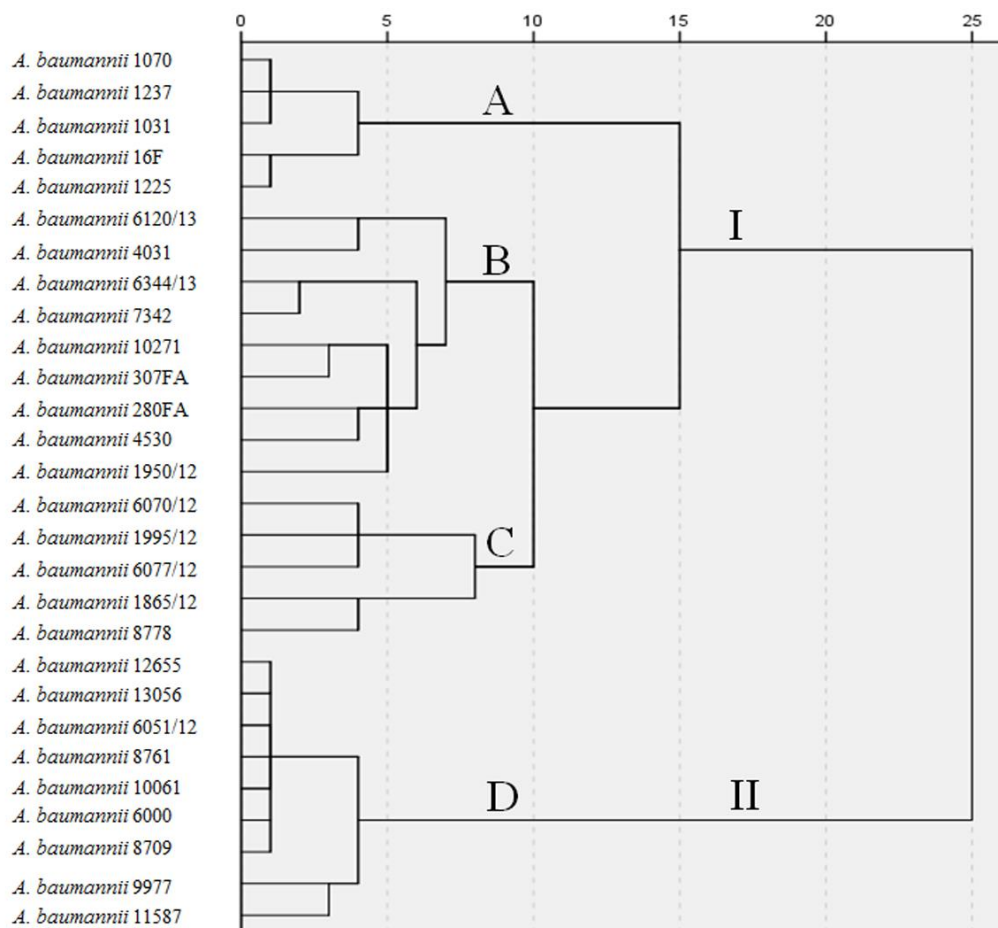


Slika 5. Gel elektroforeza PCR amplikona dobijenih umnožavanjem *ompA*, *csuE* i *bla*_{OXA-51} gena *A. baumannii* izolata rezistentnih na karbapeneme poreklom iz Srbije.

(A) PCR amplikoni dobijeni korišćenjem tri para prajmera za Grupu 1. (B) PCR amplikoni dobijeni korišćenjem tri para prajmera za Grupu 2. Redosled analiziranih *A. baumannii* izolata (od 1 do 28) je: 6070/12, 6051/12, 6120/13, 8761, 6344/13, 8709, 6000, 1995/12, 6077/12, 4031, 7342, 8778, 10271, 9977, 280FA, 10061, 11587, 307FA, 12655, 13056, 4530, 16F, 1031, 1070, 1225, 1237, 1865/12 i 1950/12. Korišćeni DNK standard je bio „GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder” (L.).

4. 2. 2. PFGE analiza

Potencijalno klonalno širenje izolata *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme unutar Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić” je, pored prethodno navedene, ispitivano i PFGE metodom. Konstrukcija dendrograma za ove izolate je zasnovana na poređenju profila traka genomske DNK svakog pojedinačnog izolata, dobijenih digestijom *ApaI* restrikcionim enzimom. Broj traka koje su bile relevantne za poređenje i na osnovu kojih je napravljen dendrogram je iznosio 30. Genomska sličnost izolata *A. baumannii* je iznosila od 75 do skoro 100% (Slika 6), što ukazuje da nisu međusobno identični.



Slika 6. Dendrogram izolata *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme poreklom iz Srbije konstruisan na osnovu PFGE *ApaI* makrorestrikcionog profila genomske DNK. Izolati su podeljeni u klaster I i II, i dalje u pulsotipove A, B, C i D.

Izolati su podeljeni u dva klastera, čije su razlike iznosile 25%. Klaster I je obuhvatao 19 izolata (1865/12, 1950/12, 6070/12, 6077/12, 1995/12, 6120/13, 6344/13, 7342, 8778, 4031, 280FA, 10271, 307FA, 4530, 16F, 1031, 1070, 1225 i 1237), dok je klaster II obuhvatao 9 izolata (6051/12, 6000, 8709, 8761, 9977, 10061, 11587, 12655 i 13056). Izolati koji su pripadali klasteru I su delili identičnost od 85% do skoro 100% i bili su dodatno podeljeni u 3 pulsotipa (A, B i C). Pulsotip B je bio najbrojniji sa 9 izolata (1950/12, 6120/13, 6344/13, 7342, 4031, 280FA, 10271, 307FA i 4530), dok je u pulsotip A (16F, 1031, 1070, 1225 i 1237) i pulsotip C (1865/12, 6070/12, 6077/12, 1995/12 i 8778) klasifikovano po 5 izolata. Izolati klastera II su grupisani u pulsotip D i pokazivali su izraženiju sličnost sa manje od 5% razlika u genomu. Samo se za pulsotip A može reći da ga čine izolati koji su uzorkovani u razmaku od nekoliko

dana (od 24.01. do 03.02.2014. godine), dok drugi pulsotipovi obuhvataju izolate uzorkovane u dužim vremenskim razmacima (Slika 6, Tabela 1). Poređenjem genotipizacije dobijene PFGE metodom i identifikacijom klonalnih grupa na osnovu tri gena (*ompA*, *csuE* i *bla_{OXA-51-like}*) ustanovljeno je da su predstavnici klonalne Grupe 1 raspoređeni u sva četiri pulsotipa (A-D) sa najmanjom zastupljenošću u pulsotipu D. Izolati klonalne Grupe 3 su bili smešteni u najvećem broju u pulsotip D, sa jednim predstavnikom u pulsotipu A. Jedini član Grupe 1 se nalazio u pulsotipu B, dok je negrupisani izolat bio predstavnik pulsotipa C (Slike 5 i 6).

4. 3. Osetljivost na β -laktamske antibiotike

Ispitivanje osetljivosti na β -laktamske antibiotike 28 izolata *A. baumannii* (izuzev izolata 813) VITEK 2 Sistemom otkrilo je prisustvo rezistencije na sledeće antibiotike ili antibiotike u kombinaciji sa inhibitorima β -laktamaza (vrednosti MIK) kod svih izolata: ampicilin (>32 mg/L), amoksicilin/klavulanska kiselina (≥ 32 mg/L), piperacilin (≥ 128 mg/L), piperacilin/tazobaktam (≥ 128 mg/L), cefoksitin (≥ 64 mg/L), ceftazidim (≥ 64 mg/L), cefotaksim (≥ 64 mg/L), cefepim (≥ 64 mg/L), aztreonam (≥ 64 mg/L), imipenem (≥ 16 mg/L) i meropenem (≥ 16 mg/L).

Osetljivost datih izolata na piperacilin, piperacilin/tazobaktam, ceftazidim, aztreonam i imipenem je dodatno određena mikrodilucionom metodom i izražena kroz IC50 vrednosti, koje su prikazane u Tabeli 14.

Tabela 14. Osetljivost *A. baumannii* izolata izražena kroz prosečne IC50 vrednosti antibiotika sa standardnim devijacijama

Izolat	Piperacilin (mg/L)	Piperacilin/Tazobaktam (mg/L)	Ceftazidim (mg/L)	Aztreonam (mg/L)	Imipenem (mg/L)
1865/12	194,99 ± 0,74	110,93 ± 8,15	209,07 ± 20,41	11,68 ± 0,97	≥16
1950/12	>256	221,44 ± 7,13	93,87 ± 3,28	11,95 ± 1,29	≥16
6051/12	>256	>256	>256	183,89 ± 6,31	≥16
6070/12	>256	184,74 ± 28,21	>256	207,79 ± 12,56	≥16
6077/12	>256	109,01 ± 5,59	>256	193,28 ± 6,4	≥16
1995/12	>256	202,24 ± 7,24	>256	193,28 ± 7,24	≥16
6120/13	>256	195,2 ± 9,96	180,48 ± 1,81	20,48 ± 2,64	≥16
6344/13	227,84 ± 1,28	183,04 ± 34,42	>256	46,4 ± 1,69	≥16
6000	123,2 ± 2,26	63,79 ± 9,1	82,56 ± 0,9	12,69 ± 1,72	≥16
7342	229,55 ± 5,33	195,20 ± 6,34	>256	36,91 ± 3,86	≥16
8709	>256	202,24 ± 7,24	>256	193,28 ± 7,24	≥16
8761	>256	176,43 ± 14,74	113,07 ± 14,46	13,92 ± 1,58	≥16
8778	112,64 ± 1,86	88,75 ± 11,74	125,87 ± 21,32	33,55 ± 3,96	≥16
4031	168,96 ± 25,21	100,16 ± 0,32	>256	14,35 ± 1,3	≥16
280FA	132,22 ± 2,94	117,44 ± 1,36	225,71 ± 6,05	19,12 ± 1,24	≥16
9977	107,95 ± 12,48	68,8 ± 9,5	31,76 ± 8,56	11,73 ± 2,25	≥16
10061	>256	229,55 ± 8,52	>256	32,37 ± 6,98	≥16
10271	>256	200,45 ± 8,9	192,85 ± 39,33	50,99 ± 2,06	≥16
307FA	155,31 ± 38,41	106,24 ± 5,29	67,30 ± 0,13	32,64 ± 7,84	≥16
11587	224 ± 27,69	114,56 ± 3,89	106,05 ± 21,52	15,47 ± 0,72	≥16
12655	103,36 ± 0,96	63,15 ± 4,89	76,8 ± 1,81	15,2 ± 1,84	≥16
13056	99,41 ± 3,52	91,73 ± 1,33	31,47 ± 6,58	11,89 ± 1,18	≥16
4530	237,23 ± 13,69	213,33 ± 16,11	108,8 ± 1,81	51,95 ± 5,64	≥16
16F	>256	179,84 ± 4,48	136,32 ± 0,91	16,75 ± 2,08	≥16
1031	216,32 ± 5,12	100,48 ± 2,31	193,71 ± 10,35	94,40 ± 9,28	≥16
1070	>256	>256	193,71 ± 9,69	62,33 ± 7,34	≥16
1225	211,63 ± 5,77	205,44 ± 6,34	192 ± 13,36	73,99 ± 2,67	≥16
1237	209,07 ± 15,16	111,15 ± 6,66	>256	19,04 ± 1,27	≥16

Mikrodilucionom metodom je potvrđena rezistencija *A. baumannii* izolata na imipenem (IC₅₀≥16), kao i izuzetno visoke IC₅₀ vrednosti za piperacilin (od 99,41 ± 3,52 do >256 mg/L) i njegovu kombinaciju sa tazobaktamom (od 63,15 ± 4,89 do >256 mg/L). Budući da Evropski komitet za testiranje antimikrobne osetljivosti ne propisuje vrednosti koje se smataju graničnim za rezistenciju na β-laktamske antibiotike, osim karbapeneme, kao granična vrednost za visok nivo rezistencije na ceftazidim i aztreonam je uzeta koncentracija od 32 mg/L. IC₅₀ vrednosti za ceftazidim su kod 92,86% izolata bile veće od predložene granične vrednosti, dok je procenat izolata rezistentnih na aztreonam iznosio 53,57%. Dodatno, rezultati mikrodilucione metode u kojoj je ispitivana osetljivost sojeva, kasnije tretiranih subinhibitornom koncentracijom karbapenema, na imipenem i meropenem su prikazani u Tabeli 15.

Tabela 15. Osetljivost odabranih sojeva *A. baumannii* izražena kroz MIK vrednosti

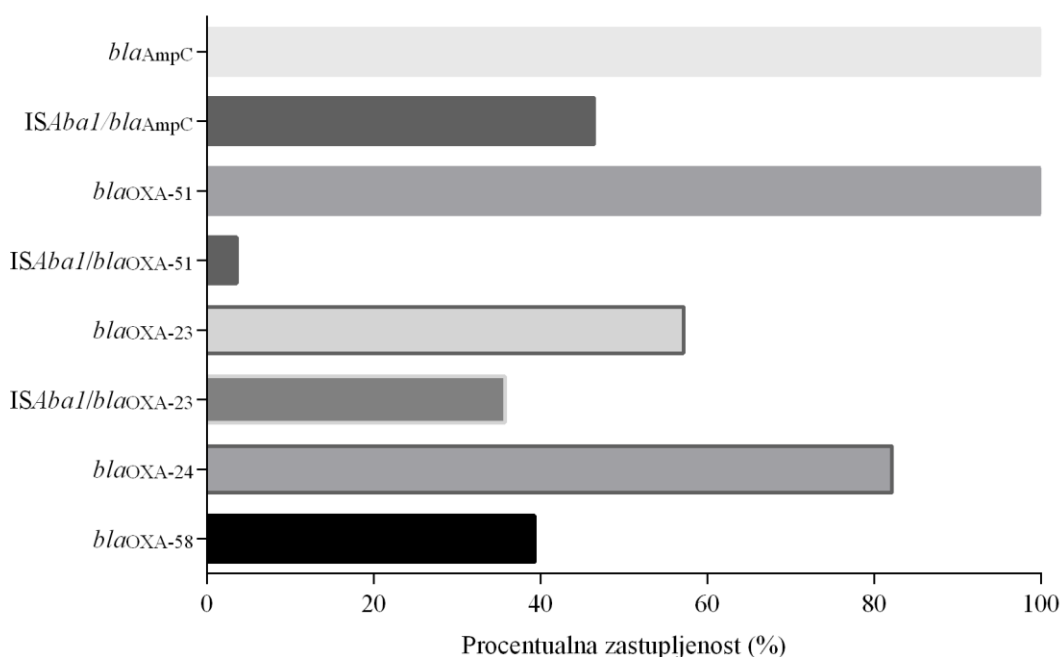
Izolat	Imipenem (mg/L)	Meropenem (mg/L)
813	0,1	0,1
1995/12	16	32
4031	32	NT

NT-nije testirano.

4. 4. Molekularne determinante rezistencije na β-laktamske antibiotike

Prisustvo gena za različite β-laktamaze, pre svega karbapenemaze, kao i insercione sekvence *ISAbal* uzvodno od *bla*_{AmpC} i *bla*_{OXA} gena, je ispitivano PCR metodom kod 28 izolata *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme. Geni za urođene β-laktamaze (*AmpC* cefalosporinazu i *OXA-51* oksacilinazu) su detektovani kod svih izolata, dok je *ISAbal* uzvodno od *bla*_{AmpC} i *bla*_{OXA-51} bila prisutna kod 13 izolata (46,43%; 1865/12, 1950/12, 8709, 8761, 4031, 280FA, 9977, 10061, 11587, 12655, 13056, 16F i 1237) i 1 izolata (3,57%; 8778), redom. Učestalost gena za stečene oksacilinaze je bila sledeća: *bla*_{OXA-23} 57,14% (n=16), *bla*_{OXA-24} 82,14% (n=23) i *bla*_{OXA-58} 39,29% (n=11), dok *bla*_{OXA-143} i *bla*_{OXA-235} nisu detektovani ni u jednom izolatu. Prisustvo sve tri stečene oksacilinaze je uočeno kod 6 izolata (6077/12, 1995/12, 6344/12, 7342, 8761 i 8778), dok je 5 izolata posedovalo oksacilinaze *OXA-23* i *OXA-24* (1950/12, 10061, 10271, 11587 i 16F), ali ne i *OXA-58*. Pored toga, 5 izolata je dalo pozitivne

PCR signale za OXA-24 i OXA-58 (6051/12, 6070/12, 6120/13, 6000 i 4031). Pored *bla*_{OXA-51} gena, samo *bla*_{OXA-23} gen je pronađen kod 5 (307FA, 4530, 1031, 1070 i 1225), a samo *bla*_{OXA-24} kod 7 izolata (1865/12, 8709, 280FA, 9977, 12655, 13056 i 1237). Inserciona sekvenca *ISAbal* je uočena uzvodno od *bla*_{OXA-23} gena sa ukupnom učestalošću od 35,71% (n=10; 6344/13, 7342, 8778, 10271, 307FA, 4530, 16F, 1031, 1070 i 1225), dok je bila odsustna uzvodno od gena za OXA-24 i OXA-58 oksacilinaze kod analiziranih izolata. Takođe, nijedan izolat nije posedovao karbapenemaze klase A (KPC) i B (IMP, VIM i NDM-1). Procentualna zastupljenost detektovanih gena za β-laktamaze i *ISAbal* pozicionirane uzvodno od njih je prikazana na Slici 7.



Slika 7. Procentualna zastupljenost *bla*_{AmpC}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} i *bla*_{OXA-58} gena, kao i *ISAbal* insercione sekvence uzvodno od *bla*_{AmpC}, *bla*_{OXA-51} i *bla*_{OXA-23} gena kod *A. baumannii* izolata rezistentnih na karbapeneme poreklom iz Srbije.

Po jedna nukleotidna sekvenca svakog umnoženog gena i gena u kombinaciji sa *ISAbal* je deponovana u Evropskoj nukleotidnoj arhivi pod pristupnim brojevima LN611403-611410 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/LN611403-LN611410>).

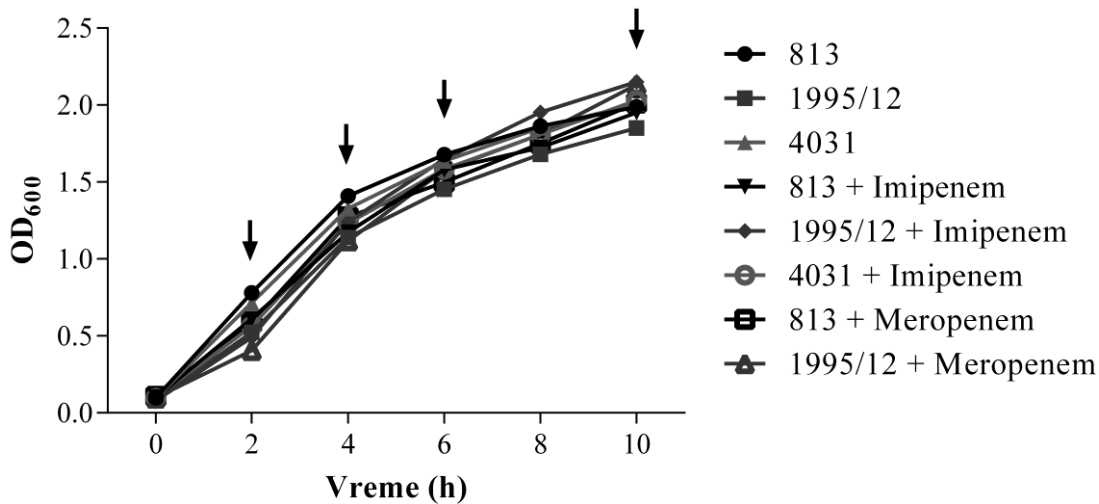
4. 4. 1. Distribucija molekularnih determinanti rezistencije na β -laktamske antibiotike među klonalnim grupama *A. baumannii*

Detektovane molekularne determinante rezistencije na β -laktamske antibiotike su bile prisutne kod predstavnika različitih klonalnih grupa, kao i izolata koji nije pripadao nijednoj od tri klonalne grupe. Geni za oksacilinaze OXA-24 i OXA-58 su pronađeni kod pripadnika sve tri klonalne grupe i izolata 8778, dok je *bla*_{OXA-23} izostao kod izolata 4031 (jedini pripadnik Grupe 2). Inerciona sekvenca *ISAbal* je bila prisutna uzvodno od *bla*_{AmpC} kod predstavnika sve tri klonalne grupe, *bla*_{OXA-51} gena kod *A. baumannii* 8778, a *bla*_{OXA-23} gena kod izolata Grupe 1 i 8778.

4. 5. Uticaj stresa na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena

4. 5. 1. Uticaj faze rasta i subinhibitorne koncentracije karbapenema na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena

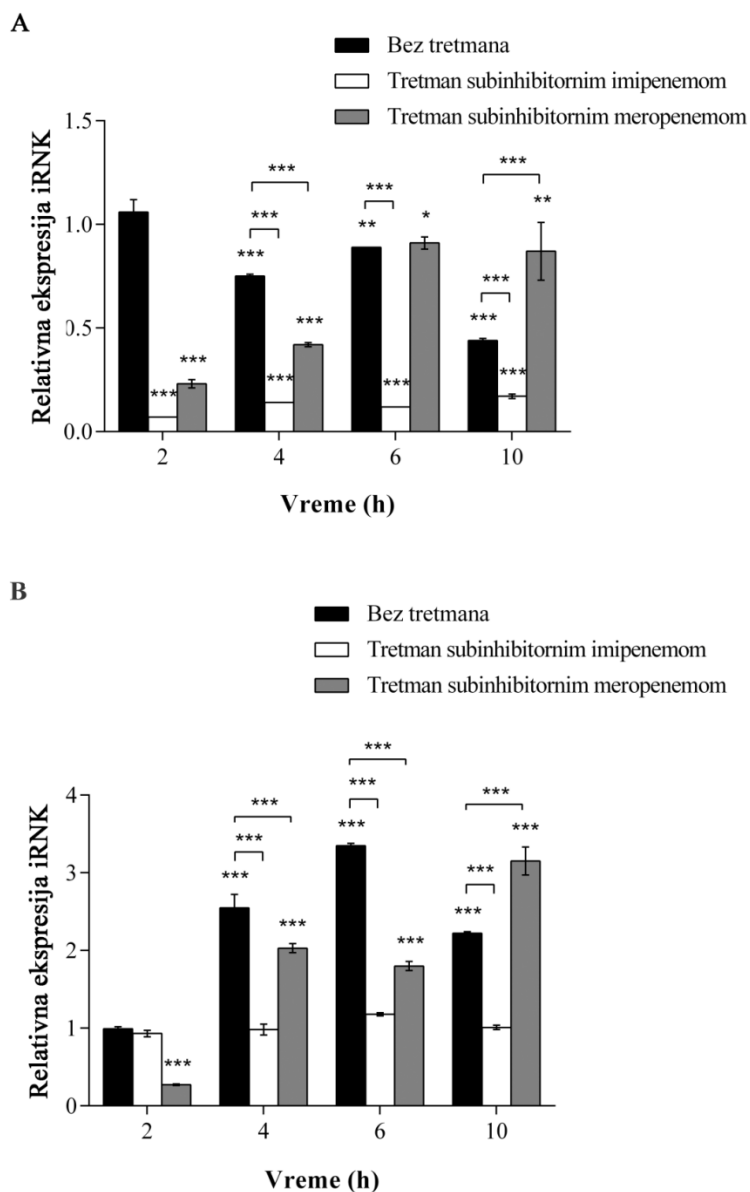
Tri soja *A. baumannii* (813, 1995/12 i 4031) sa različitim karakteristikama (osetljivost na karbapeneme i funkcionalnost CarO porina) navedenim u odeljku 3.9.1. su gajena u prisustvu subinhibitorne koncentracije imipenema (sva tri soja) ili meropenema (813 i 1995/12) tokom različitih faza rasta. Kontrolni uzorci su gajeni u medijumu bez karbapenema. Vremenske tačke koje odgovaraju ranoj (2h), srednjoj (4h), kasnoj eksponencijalnoj (6h) i stacionarnoj fazi rasta (10h) su određene merenjem optičke gustine ćelija na 600 nm. Krive rasta tri soja u odusustvu i prisustvu subinhibitorne koncentracije karbapenema su prikazane na Slici 8.



Slika 8. Krive rasta sojeva *A. baumannii* u odsustvu i prisustvu subinhibitorne koncentracije imipenema (813, 1995/12 i 4031) i meropenema (813 i 1995/12).

Uticaj faze rasta i subinhibitornog tretmana karbapenemima na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena je ispitivan RT-qPCR metodom. Budući da je *carO* gen soja 4031 inaktiviran insercionom mutagenезom čime je uveden preuranjen stop kodon, transkripcija ovog gena je ispitivana samo kod sojeva 813 i 1995/12 (Slika 9). Transkripcioni odgovor *carO* gena *A. baumannii* soja 813, osetljivog na karbapeneme, na određenu fazu rasta se značajno razlikovao od odgovora soja 1995/12, koji je rezistentan na ovu grupu antibiotika. Naime, kod soja 813 kroz faze rasta dolazi do smanjenja ekspresije ovog gena s najizraženijim padom u stacionarnoj fazi rasta (prosečno $2,27 \times$ niža ekspresija u odnosu na ranu ekspancijalnu fazu rasta). Nasuprot tome, transkripcija *carO* gena je značajno porasla od rane do kasne ekspancijalne faze rasta (prosečno $3,35 \times$) kod soja 1995/12, da bi zatim u određenoj meri opala u stacionarnoj fazi rasta (prosečno $2,22 \times$ veća od rane ekspancijalne faze rasta). Za razliku od faza rasta, odgovor ekspresije *carO* gena sojeva 813 i 1995/12 na prisustvo subinhibitornih koncentracija karbapenema se donekle može smatrati sličnim. Prisustvo imipenema u subinhibitornoj koncentraciji je dovelo do značajnog smanjenja transkripcije ovog gena kod oba soja (izuzetak je rana ekspancijalna faza soja 1995/12), s izraženijim uticajem na soj 813 kroz ekspancijalnu fazu (prosečno od 6,6% do 18,67% za soj 813 nasuprot vrednostima od 35,22% do 38,43% za soj 1995/12 od vrednosti za netretirane uzorke u istoj fazi rasta), dok je u stacionarnoj fazi rasta efekat približno isti. Prisustvo subinhibitorne koncentracije meropenema je u ranoj

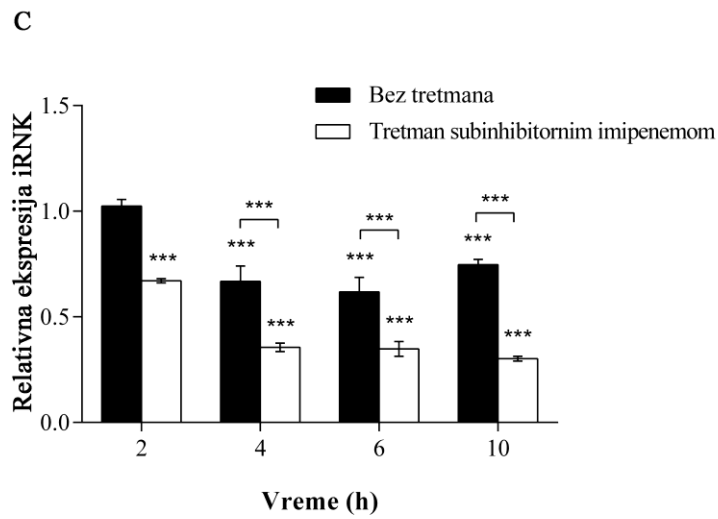
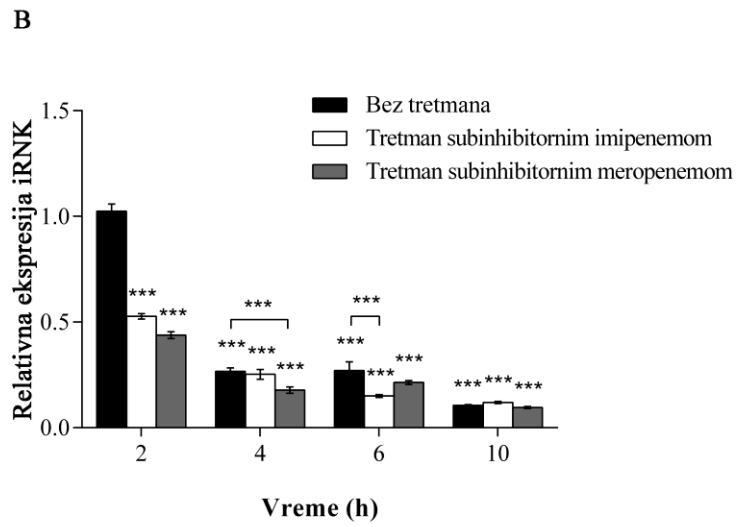
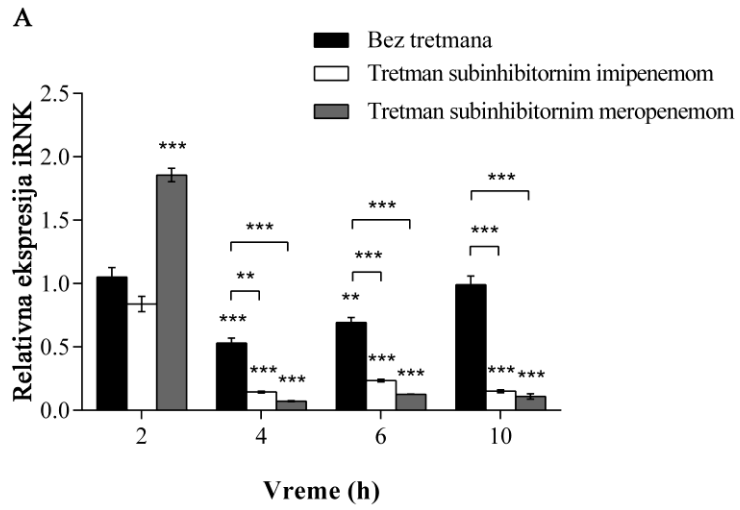
eksponencijalnoj fazi dovelo do najizraženijeg smanjenja ekspresije *carO* gena (prosečno 21,7% za 813 i 27,27% za 1995/12 od vrednosti za netretirane uzorke u istoj fazi rasta), nakon čega je došlo do izvesnog porasta i, finalno, u stacionarnoj fazi rasta do značajnog povećanja transkripcije ovog gena (prosečno $1,97 \times$ za 813 i $1,41 \times$ za 1995/12 u odnosu na netretirane uzorke u istoj fazi rasta).



Slika 9. Uticaj faze rasta i prisustva subinhibitornog karbapenema (imipenema ili meropenema) na transkripciju *carO* gena.

(A) *A. baumannii* osetljiv na karbapeneme 813. (B) *A. baumannii* rezistentan na karbapeneme 1995/12. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje svih eksperimentalnih grupa u odnosu na netretiranu grupu u ranoj eksponencijalnoj fazi rasta ili poređenje grupa koje odgovaraju određenoj fazi rasta u odnosu na netretiranu grupu date faze rasta (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Efekat prethodno navedenih faktora na transkripciju *omp33-36* gena je ispitivan kod sojeva 813, 1995/12 i 4031 (Slika 10). RT-qPCR analizom je pokazano da kod sva tri soja nivo *omp33-36* iRNK značajno opada na prelasku iz rane u srednju eksponencijalnu fazu rasta (prosečno $1,98 \times$ za soj 813, $3,84 \times$ za soj 1995/12 i $1,53 \times$ za soj 4031). Nakon toga, sojevi pokazuju različit transkripcioni odgovor gena za Omp33-36 na povećanje broja bakterijskih ćelija. Za razliku od soja 1995/12, koji u najmanjoj meri eksprimira ovaj gen u stacionarnoj fazi rasta (prosečno 10,35% od vrednosti u ranoj eksponencijalnoj fazi), kod sojeva 813 i 4031 dolazi do porasta u ekspresiji *omp33-36* gena u odnosu na fazu koja mu prethodi (prosečno 43,2% za 813 i 20,87% za 4031). Generalno, prisustvo subinhibitorne koncentracije karbapenema dovodi do smanjenja transkripcije *omp33-36* gena kod sva tri soja. Ovo smanjenje je najizraženije kod soja 813 u fazama koje slede nakon rane eksponencijalne faze (prosečno od $2,96$ do $6,61 \times$ za imipenem i od $5,45$ do $9,09 \times$ za meropenem u poređenju sa netretiranim uzorcima u istoj fazi rasta). Takođe, soj 4031, rezistentan na karbapeneme, pokazuje snižen nivo *omp33-36* iRNK u prisustvu subinhibitornog imipenema kroz sve faze rasta (prosečno od $1,52$ do $2,47 \times$ u odnosu na netretirane uzorke u istoj fazi rasta). Za razliku od prethodna dva soja, koji su u stacionarnoj fazi rasta imali najniži nivo transkripcije *omp33-36* u odnosu na kontrolni uzorak, soj 1995/12 u datoj fazi rasta nije pokazao statistički značajnu promenu u ekspresiji ovog gena nakon tretmana subinhibitornim karbapenemima.



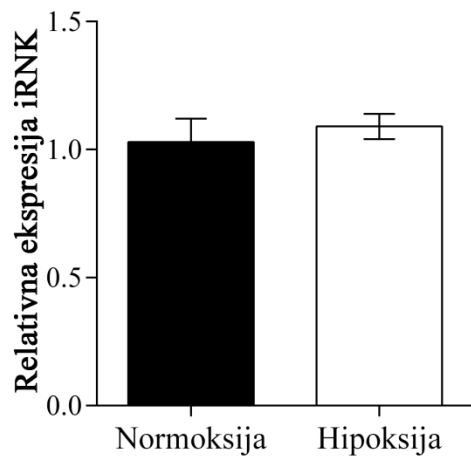
Slika 10. Uticaj faze rasta i prisustva subinhibitornog imipenema (sva tri soja) ili meropenema (813 i 1995/12) na transkripciju *omp33-36* gena.

(A) *A. baumannii* osetljiv na karbapeneme 813. (B) *A. baumannii* rezistentan na karbapeneme 1995/12. (C) *A. baumannii* rezistentan na karbapeneme 4031. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje svih eksperimentalnih grupa u odnosu na netretiranu grupu u ranoj ekspanzionalnoj fazi rasta ili poređenje grupa koje odgovaraju određenoj fazi rasta u odnosu na netretiranu grupu date faze rasta (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

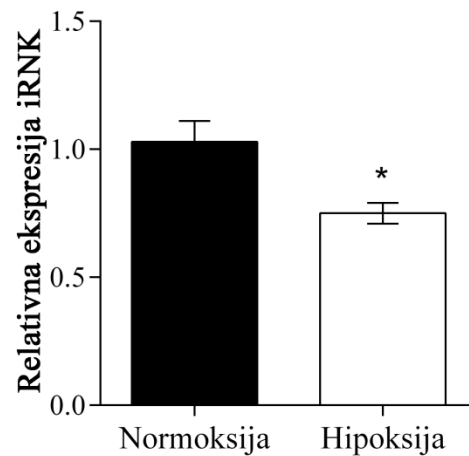
4. 5. 2. Uticaj hipoksije na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena

Uticaj snižene koncentracije kiseonika (hipoksije) na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena je ispitivan kod soja 813. Rezultati RT-qPCR su ukazali da hipoksija ne dovodi do statistički značajne promene transkripcije *carO* gena, dok se nivo *omp33-36* iRNK smanjuje (prosečno 31,19%) u ovim uslovima u odnosu na uslove atmosferske koncentracije kiseonika (normoksija) (Slika 11).

A



B



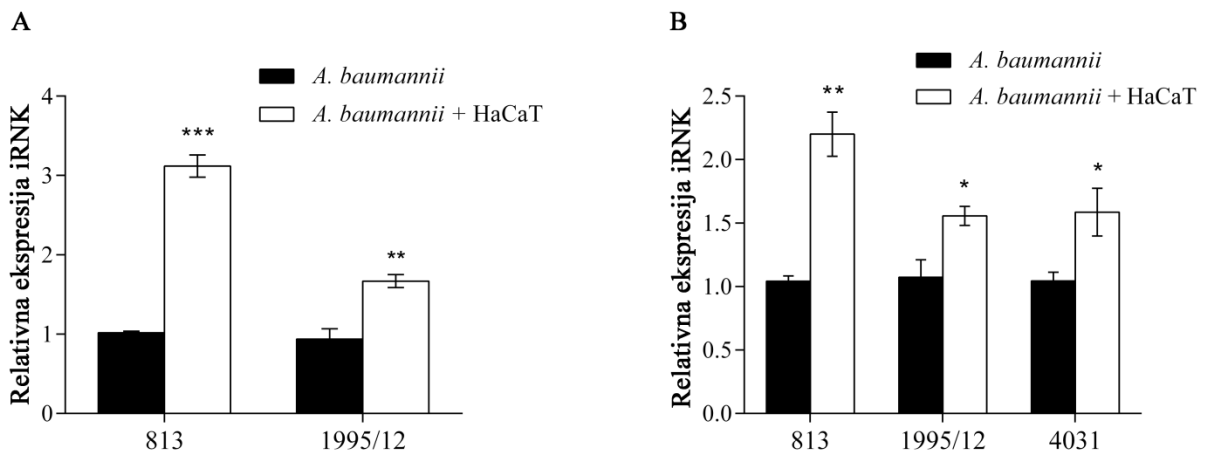
Slika 11. Uticaj hipoksije na transkripciju gena za porine *A. baumannii* soja 813.

(A) *carO* gen. (B) *omp33-36* gen. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Studentov *t*-test je korišćen za poređenje grupa kultivisanih u normoksičnim i hipoksičnim uslovima (* $p < 0,05$).

4. 6. Uticaj kontakta *A. baumannii* sa eukariotskim ćelijama na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena

4. 6. 1. Uticaj kontakta *A. baumannii* sa HaCaT keratinocitama čoveka na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena

Kontakt *A. baumannii* sojeva sa HaCaT ćelijama je statistički značajno uticao na povećanje transkripcije *carO* i *omp33-36* gena (Slika 12). Najveći porast u ekspresiji oba gena je uočen kod soja 813, s tim da je nivo *carO* iRNK povišen u proseku $3,06 \times$, a *omp33-36* iRNK $2,11 \times$ u odnosu na kontrolu. Sojevi rezistentni na karbapeneme su pokazali umeren porast ekspresije gena za porine, i to 1995/12 u proseku $1,77 \times$ za CarO i $1,45 \times$ za Omp33-36, a 4031 $1,52 \times$ za Omp33-36.

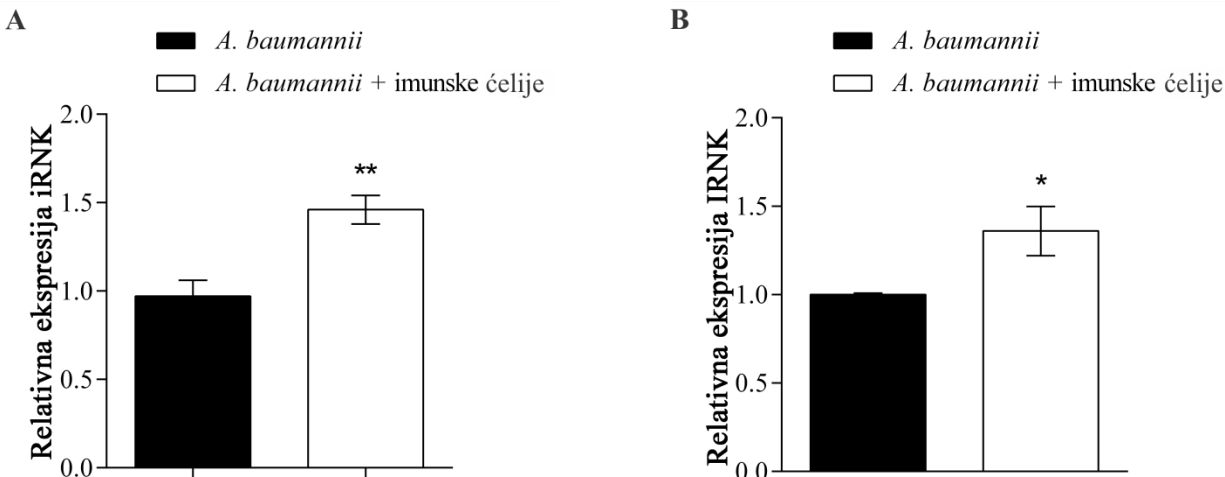


Slika 12. Inducibilnost transkripcije gena za porine nakon kontakta *A. baumannii* sa HaCaT ćelijama.

(A) *carO* gen. (B) *omp33-36* gen. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Studentov *t*-test je korišćen za poređenje grupa kultivisanih sa HaCaT ćelijama i kontrola (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4. 6. 2. Uticaj kontakta *A. baumannii* sa imunskim ćelijama pacova na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena

Statistički značajno povećanje transkripcije *carO* i *omp33-36* gena je uočeno kod soja 813 nakon kontakta sa imunskim ćelijama pacova (Slika 13). Ekspresija gena za porin CarO u proseku je bila povećana 51%, dok je povećanje transkripcije *omp33-36* gena iznosilo 36% u odnosu na kontrolne uzorke.

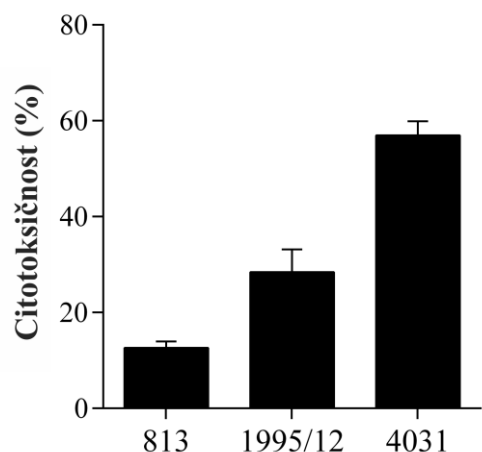


Slika 13. Inducibilnost transkripcije gena za porine nakon kontakta *A. baumannii* sa imunskim ćelijama.

(A) *carO* gen. (B) *omp33-36* gen. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Studentov *t*-test je korišćen za poređenje grupa kultivisanih sa imunskim ćelijama i kontrola (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4. 7. Citotoksični efekat *A. baumannii* na HaCaT i imunske ćelije

Nivo citotoksičnosti koji ostvaruju sojevi *A. baumannii* na HaCaT i imunske ćelije je ispitan LDH esejom. Sva tri soja su dovela do smrti HaCaT ćelija, ali u različitoj meri (Slika 14). Soj koji je osetljiv na karbapeneme 813 je ispoljio najnižu citotoksičnost ($12,6 \pm 1,34\%$), dok su sojevi rezistentni na karbapeneme bili citotoksičniji (1995/12 $28,41 \pm 4,7\%$ i 4031 $56,97 \pm 2,9\%$).



Slika 14. Nivo citotoksičnosti koji ostvaruju sojevi *A. baumannii* (813, 1995/12 i 4031) na HaCaT ćelije.

Soj 813 nije ostvarivao citotoksični efekat na imunske ćelije pacova (rezultati nisu prikazani).

4. 8. Bioinformatička analiza CarO i Omp33-36 porina

4. 8. 1. Nukleotidne sekvence *carO* i *omp33-36* gena izolata *A. baumannii* poreklom iz Srbije

Sekvenciranjem i uporednom analizom *carO* gena izolata *A. baumannii* uključenih u ovu studiju je ustanovljeno postojanje 5 različitih alela ovog gena. Prvi tip alela je posedovalo 12 izolata (6051/12, 6070/12, 6077/12, 1995/12, 6344/13, 8778, 10271, 307FA, 4530, 1031, 1070 i 1225), drugi 14 (1865/12, 1950/12, 6120/13, 6000, 8709, 8761, 280FA, 9977, 10061, 11587, 12655, 13056, 16F i 1237), dok je po jedan izolat sadržao treći (7342), četvrti (4031) i peti tip (813) alela. Nukleotidne sekvence *carO* gena navedenih izolata (prva četiri alela) su deponovane u Evropskoj nukleotidnoj arhivi pod pristupnim brojevima LN611375-LN611402 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/LN611375-LN611402>), dok se nukleotidna sekvenca gena za CarO soja 813 nalazi u Prilogu 2. Prvi i drugi tip *carO* alela su, poređenjem sa sekvencama iz NCBI baze podataka, pokazali 100% identičnosti sa odgovarajućim genima *A. baumannii* ACICU (CP000863.1) i *A. baumannii* A388 (CP024418.1), redom, dok je peti tip 99% bio identičan sa *carO* genom *A. baumannii* C71 (KX517489.1). Soj 7342 je posedovao inserciju od 47 bp unutar *carO* gena (početak na +321, završetak na +367 bp), koja je uvela stop kodon

(TAG) na poziciju 400-402 bp *carO* gena. Poređenje date insercije sa podacima iz NCBI baze je utvrdilo njegovu potpunu identičnost sa regionom (od 250 do 292 bp) delimične sekvence IS*Aba1* i *carO* gena soja *A. baumannii* AbPK-2 (HQ020497.1). Insercija od 860 bp (početak na +278, završetak na +1137 bp) je inaktivirala *carO* gen soja 4031 uvodeći stop kodon (TAA) u ovaj gen na poziciji 400-402 bp. Pretraživanje NCBI baze podataka je otkrilo da je proksimalni deo insercije (od 1 do 142 bp) 96% identičan sa fragmentom transpozaze soja *A. baumannii* SDF (CU468230.2, pozicija u genomu od 2 386 025 do 2 385 884 bp), dok je distalni deo (od 454 do 860 bp) 97% identičan sa susednim fragmentom iste transpozaze (pozicija u genomu od 2 385 885 do 2 385 479 bp). Centralni region ove insercije (od 149 do 412 bp) je pokazao 71% identičnosti sa transpozazom familije IS4 poreklom iz *Psychrobacter* sp. PRwf-1 (CP000713, pozicija u genomu od 380 979 do 380 716 bp).

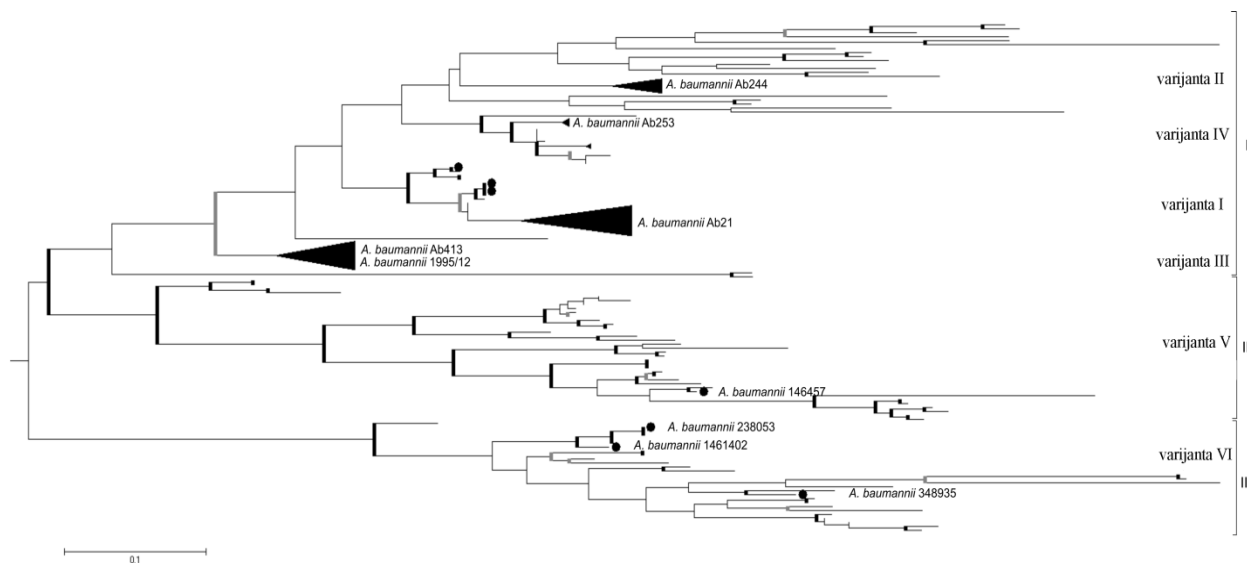
Analiza nukleotidnih sekvenci *omp33-36* gena je otkrila postojanje dva različita alela kod izolata *A. baumannii* korišćenih u ovoj tezi. Prvi tip *omp33-36* alela je posedovalo 16 izolata (1865/12, 1950/12, 6051/12, 6070/12, 6077/12, 1995/12, 6344/13, 7342, 8778, 10271, 307FA, 4530, 1031, 1070, 1225 i 813), dok je drugi tip nađen kod 13 izolata (6120/13, 6000, 8709, 8761, 4031, 280FA, 9977, 10061, 11587, 12655, 13056, 16F i 1237). Sekvence nukleotida ova dva alela su prikazane u Prilogu 3. Poređenjem *omp33-36* alela sa sekvencama iz NCBI baze podataka je ustanovljeno da prvi i drugi tip alela pokazuju potpunu identičnost sa odgovarajućim genima *A. baumannii* IOMTU 433 (AP014649) i *A. baumannii* AB031 (CP009256), redom.

4. 8. 2. Filogenetski profili CarO i Omp33-36 porina

U skladu sa sve učestalijim unutarbolničkim infekcijama izazvanim bakterijama roda *Acinetobacter*, pored vrste *A. baumannii* (Visca et al., 2011; Cosgaya et al., 2016; Kishii et al., 2016), u filogenetsku analizu porina CarO i Omp33-36 su uključeni svi predstavnici ovog roda. Aminokiselinske sekvence ovih porina poreklom iz NCBI baze podataka i naše kolekcije, poravnate pomoću „Vector NTI” programa, su korišćene za konstrukciju filogenetskih stabala ML metodom.

ML filogenetska analiza je predstavnike roda *Acinetobacter* prema aminokiselinskoj sekvenci CarO porina podelila u tri osnovne grupe (I-III), koje su prikazane na Slici 15. Grupa I je bila najbrojnija i najraznovrsnija, tako da je dalje podeljena u prethodno opisane četiri varijante (I-IV) (Mussi et al., 2011). U ovoj grupi su se uglavnom našli klinički značajni

predstavnicu vrste *A. baumannii*, kao i izolati poreklom iz Srbije. Izolati *A. baumannii* poreklom iz Srbije, uključeni u ovu analizu (n=28, izolovani u periodu od 2012. do 2014. godine), su bili podeljeni na varijantu I (drugi tip *carO* alela) i varijantu III (prvi tip *carO* alela) grupe I. Pored toga, varijanta I je prethodno opisana kao CarOa, a varijanta III kao CarOb tip CarO kanala (Catel-Ferreira et al., 2011). U grupi II (varijanta V) i III (varijanta VI) su se našle različite vrste roda *Acinetobacter* sa manjom ili većom kliničkom značajnošću. Prisustvo *A. baumannii* je bilo sporadično, i to u grupi II jedan izolat (*A. baumannii* 146457), a u grupi III tri izolata (*A. baumannii* 230853, 1461402 i 348935) (Slika 15).



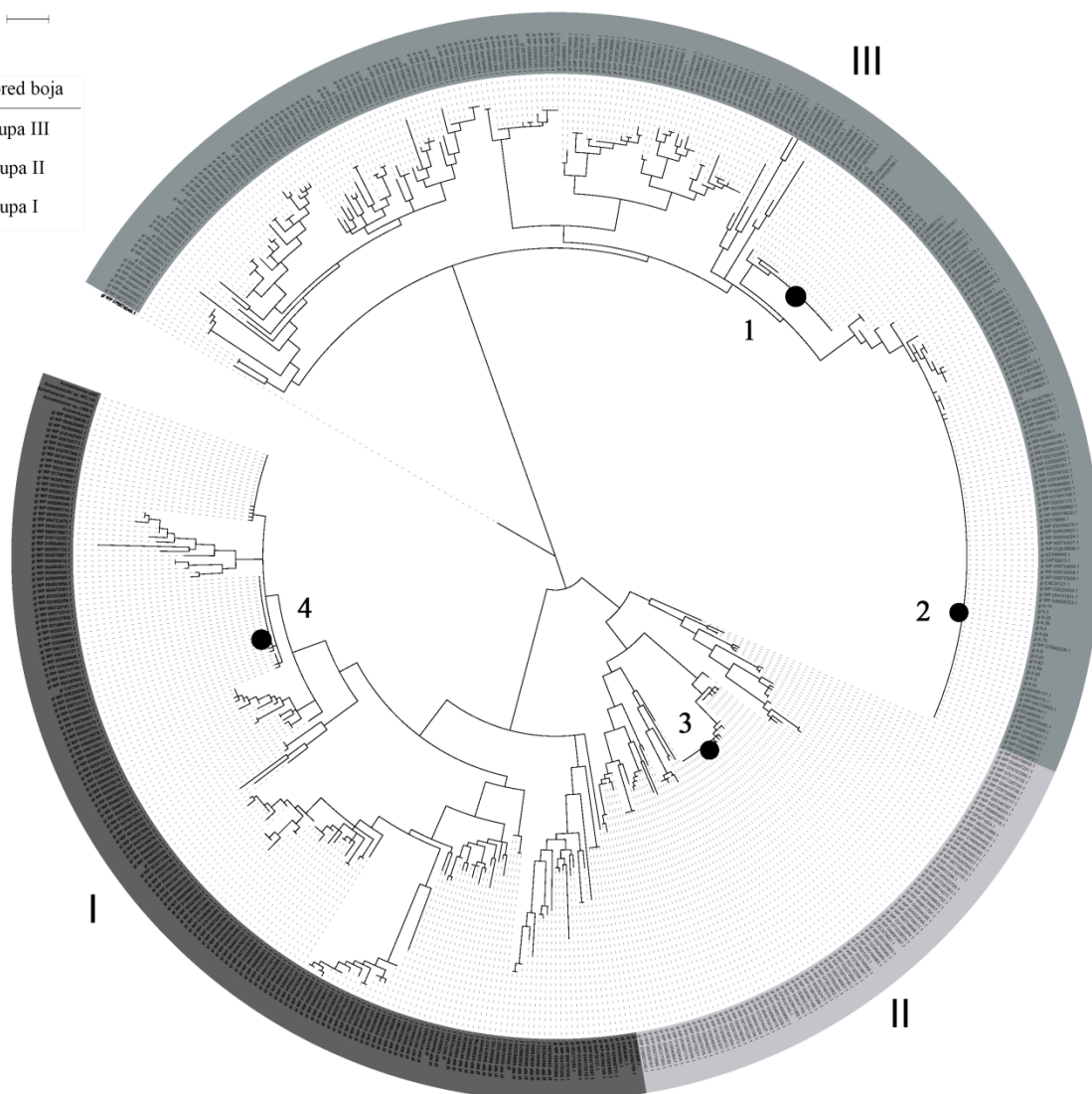
Slika 15. Filogenetski profil CarO porina roda *Acinetobacter*.

Filogenetski profil CarO porina je konstruisan ML metodom koristeći „Jones-Thompson-Taylor” model. Verodostojnost dobijenih stabala je proveravana podešavanjem parametra „bootstrap” na 1 000 ponavljanja. Podebljane sive i crne linije predstavljaju čvorove sa „bootstrap” vrednošću preko 50% i preko 70%, redom. Crni trouglovi su klade koje čine samo izolati *A. baumannii*. Predstavnicu svake od varijanata (I-VI) tri grupe (I-III) su: *A. baumannii* Ab21 (DQ309875) (I/I), *A. baumannii* Ab244 (AY684798) (II/I), *A. baumannii* Ab413 (FJ652395) (III/I), *A. baumannii* Ab253 (EF537047) (IV/I), *A. baumannii* 146457 (EXB49165) (V/II), *A. baumannii* 238053 (EXB72592), *A. baumannii* 1461402 (EXB34375) i *A. baumannii* 348935 (EXA64785) (VI/III). Predstavnik izolata *A. baumannii* poreklom iz Srbije 1995/12 je naznačen u okviru varijante III grupe I.

Kao za CarO, ML analiza Omp33-36 porina je podelila predstavnike roda *Acinetobacter* u tri grupe (I-III), koje su prikazane na Slici 16. Pored toga, ML analiza Omp33-36 predstavnika *A. baumannii* je ovu vrstu grupisala u četiri varijante (1-4) (Slika 17). Omp33-36 grupa III roda *Acinetobacter* je bila najbrojnija i, ujedno, najraznovrsnija, obuhvatajući dve Omp33-36 varijante *A. baumannii* (1 i 2) (Slika 16). Izolati *A. baumannii* poreklom iz Srbije su bili klasifikovani u varijantu 1 (drugi tip *omp33-36* alela) i varijantu 2 (prvi tip *omp33-36* alela) grupe III. Najmalobrojnijoj grupi II je pripadala varijanta 3, a grupi I varijanta 4 (Slika 16).

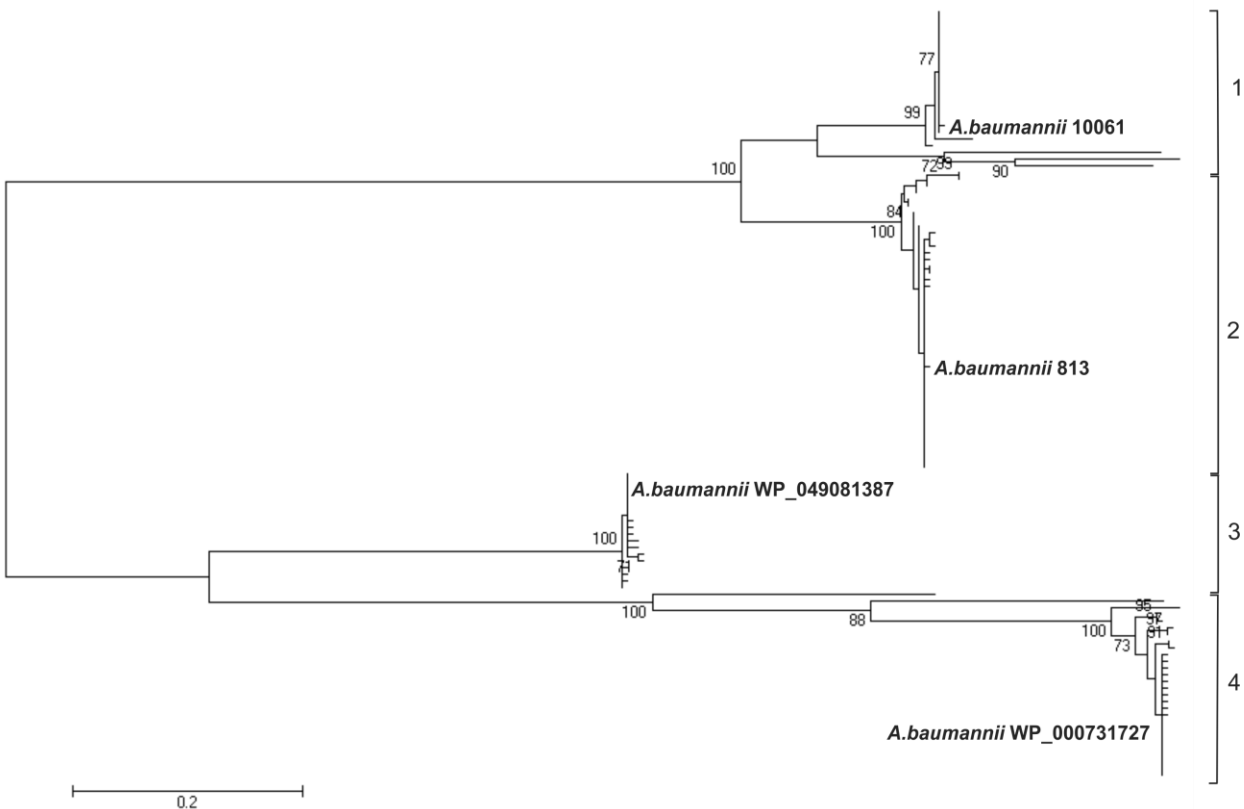
Skala stabla; 0.1

Raspored boja
Grupa III
Grupa II
Grupa I



Slika 16. Filogenetski profil Omp33-36 porina roda *Acinetobacter*.

Filogenetski profil Omp33-36 porina je konstruisan ML metodom koristeći „Jones-Thompson-Taylor” model. Verodostojnost dobijenih stabala je proveravana podešavanjem parametra „bootstrap” na 1 000 ponavljanja. Tri zasenčene boje predstavljaju tri različite grupe (I-III) Omp33-36 roda *Acinetobacter*. Varijante *A. baumannii* su naznačene crnim krugovima u okviru grupa. Varijante 1 i 2 su smeštene u okviru grupe III, varijanta 3 u okviru grupe II, a varijanta 4 u okviru grupe I.

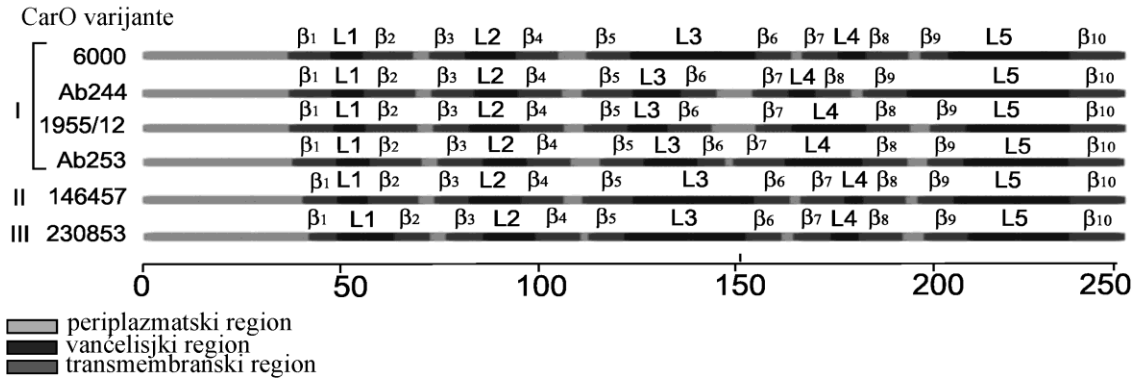


Slika 17. Filogenetski profil Omp33-36 porina vrste *A. baumannii*.

Filogenetski profil Omp33-36 porina je konstruisan ML metodom koristeći „Jones-Thompson-Taylor” model. Verodostojnost dobijenih stabala je proveravana podešavanjem parametra „bootstrap” na 1 000 ponavljanja. Procenat „bootstrap” vrednosti je prikazan na mestima grananja različitih klastera (uračunate su samo vrednosti preko 70%). Navedeni predstavnici četiri Omp33-36 varijante su: *A. baumannii* 10061 (1; soj iz Srbije), *A. baumannii* 813 (2; soj iz Srbije), *A. baumannii* (3; WP_049081387) i *A. baumannii* (4; WP_000731727).

4. 8. 3. Transmembranski topološki profili CarO i Omp33-36 porina

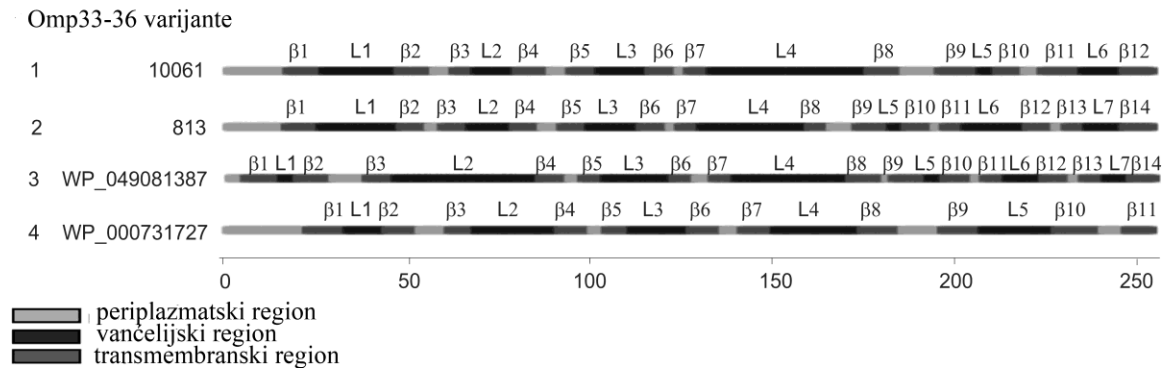
Predikcioni profili transmembranske topologije različitih varijanti CarO i Omp33-36 porina su određeni korišćenjem PRED-TMBB servera. Transmembranske topologije varijanti CarO vrste *A. baumannii* (I-VI), koje su pripadale trima CarO grupama roda *Acinetobacter* (I-III), su se međusobno podudarale. Sve opisane varijante su posedovale deset transmembranskih regiona sastavljenih od β -lanaca (β 1- β 10), kao i pet petlji usmerenih ka vanćelijskoj sredini („Loop”, L1-L5) (Slika 18).



Slika 18. Transmembranski topološki profili CarO porina *A. baumannii*.

Predikcija transmembranskih topoloških profila varijanti CarO porina vrste *A. baumannii* (I-VI), pripadnika tri CarO grupe roda *Acinetobacter* (I-III). Predstavnici grupe I su varijante I (*A. baumannii* 6000, soj iz Srbije), II (*A. baumannii* Ab244), III (*A. baumannii* 1995/12) i IV (*A. baumannii* Ab253), grupe II varijanta V (*A. baumannii* 146457) i grupe III varijanta VI (*A. baumannii* 230853). Na slici su obeleženi periplazmatski regioni, petlje usmerene ka vanćelijskoj sredini (L) i transmembranski regioni u obliku β-lanaca (β).

Transmembranski topološki profili varijanti Omp33-36 porina vrste *A. baumannii* (1-4), predstavnika tri Omp33-36 grupe roda *Acinetobacter* (I-III), su prikazani na Slici 19. Varijantama 2 (grupa III) i 3 (grupa II) je predikcijom ustanovljen isti topološki profil sa četrnaest transmembranskih regiona, koji su posedovali β-lance (β₁-β₁₄), i sedam petlji usmerenih ka vanćelijskoj sredini (L1-L7). Za razliku od prethodnih, varijante 1 (grupa III) i 4 (grupa I) su organizovane u dvanaest i jedanaest transmembranskih regiona (β₁-β₁₂; β₁-β₁₁), kao i šest i pet vanćelijskih petlji (L1-L6; L1-L5), redom.

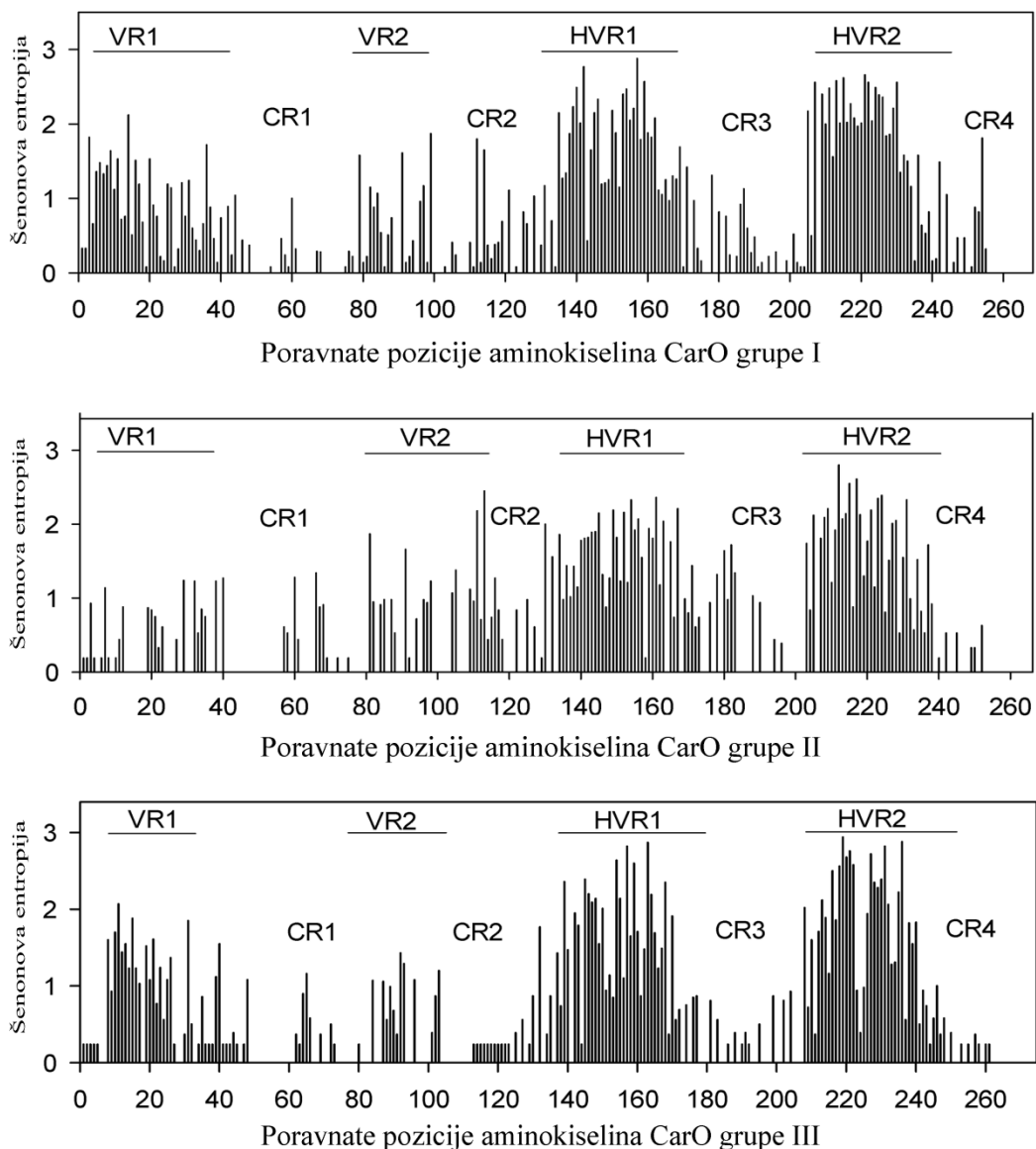


Slika 19. Transmembranski topološki profili Omp33-36 porina *A. baumannii*.

Predikcija transmembranskih topoloških profila varijanti Omp33-36 porina vrste *A. baumannii* (1-4), pripadnika tri Omp33-36 grupe roda *Acinetobacter* (I-III). Predstavnici grupe III su varijanta 1 (*A. baumannii* 10061) i 2 (*A. baumannii* 813), grupe II varijanta 3 (*A. baumannii* WP_049081387) i grupe I varijanta 4 (*A. baumannii* WP_000731727). Na slici su obeleženi periplazmatski region, petlje usmerene ka vančelijskoj sredini (L) i transmembranski region u obliku β -lanaca (β).

4. 8. 4. Polimorfnost CarO i Omp33-36 porina i varijabilnost njihovih regiona

Višestrukim poređenjem CarO i Omp33-36 porina ustanovljeno je da je polimorfnost ovih proteina u proseku 64% i 86% (procenat polimorfni aminokiselinskih pozicija), redom. Šenonova entropija je korišćena kao parametar za određivanje nivoa polimorfnosti svake pojedinačne pozicije aminokiselina. Broj i raspored konzervisanih, varijabilnih i hipervarijabilnih regiona CarO porina tri grupe roda *Acinetobacter* (I-III) su prikazani na Slici 20. Sve tri grupe su posedovale četiri konzervisana („Conserved Region”, CR1-CR4), dva varijabilna („Variable Region”, VR1-VR2) i dva hipervarijabilna regiona („Hypervariable Region”, HVR1-HVR2). Među konzervisanim regionima, CR1 na N-terminusu je pokazao najizraženiju konzervisanost, dok je CR4 na C-terminusu CarO porina bio najvarijabilniji. Dva varijabilna regiona su bila locirana na N-terminusu, dok su hipervarijabilni regiona bili smešteni bliže C-terminusu (HVR1: 135-180 aminokiselina; HVR2: 203-240 aminokiselina). Najmanje polimorfan varijabilni region je bio VR1 CarO grupe II roda *Acinetobacter* sa vrednošću Šenonove entropije uglavnom manjom od 0,6. Motiv CarO porina, koji se pokazao konzervisanim kod različitih grupa roda *Acinetobacter*, je bio AEVGTTGYG na N-terminalnom regionu.

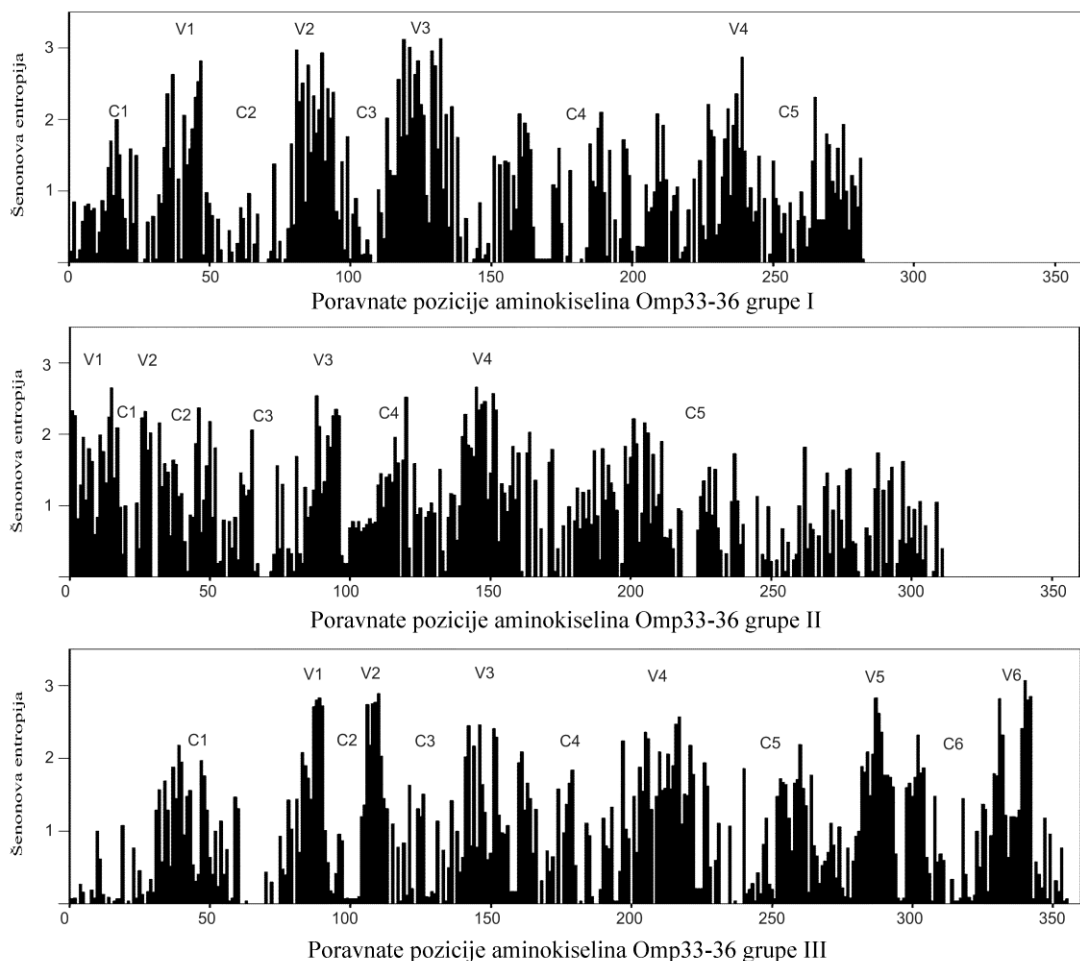


Slika 20. Varijabilnost CarO grupa roda *Acinetobacter*.

Šenonova entropija predstavlja parametar varijabilnosti određene aminokiselinske pozicije CarO grupa roda *Acinetobacter* (I-III). Visina stubića Šenonove entropije je direktno proporcionalna nivou varijabilnosti date aminokiselinske pozicije. Na slici su prikazane pozicije konzerviranih (CR), varijabilnih (VR) i hipervarijabilnih regiona (HVR) CarO grupa roda *Acinetobacter*.

Za razliku od CarO porina, Omp33-36 grupe roda *Acinetobacter* su pokazivale razliku u dužini porina, kao i u broju i rasporedu konzerviranih (C) i varijabilnih regiona (V) (Slika 21). Omp33-36 grupe I i II su posedovale pet konzerviranih (C1-C5) i četiri varijabilna regiona (V1-

V4), koji su bili različito organizovani (Slika 21). Grupu III porina Omp33-36 je činilo šest konzervisanih (C1-C6) i šest varijabilnih regiona (V1-V6). Konzervisani regioni, koji su posedovali najnižu vrednost Šenonove entropije, su C4 grupe I, C5 grupe II i III na C-terminusu, kao i C1 grupe III na N-terminusu. Najizraženiju varijabilnost su pokazivali varijabilni regioni grupe III i V2 i V3 grupe I sa vrednošću Šenonove entropije uglavnom većom od 2,5. Kao i za CarO porin, kod različitih Omp33-36 grupa je uočeno prisustvo konzervisanog motiva na N-terminalnom regionu (PLAEAAFL).



Slika 21. Varijabilnost Omp33-36 grupa roda *Acinetobacter*.

Šenonova entropija predstavlja parametar varijabilnosti određene aminokiselinske pozicije Omp33-36 grupa roda *Acinetobacter* (I-III). Visina stubića Šenonove entropije je direktno proporcionalna nivou varijabilnosti date aminokiselinske pozicije. Na slici su prikazane pozicije konzerviranih (C) i varijabilnih regiona (V) Omp33-36 grupa roda *Acinetobacter*.

4. 8. 5. Predikcija uticaja varijabilnosti aminokiselina CarO i Omp33-36 porina na njihovu biološku ulogu

Uticaj izražene polimorfnosti CarO i Omp33-36 porina na njihovu biološku funkciju je ispitivan pomoću PROVEAN softvera. Poređenje aminokiselinskih sekvenci CarO porina *A. baumannii* predstavnika varijanti II, III i IV (grupa I) sa varijantom I je otkrilo da poseduju 64, 63 i 54 neutralne razlike aminokiselina, redom. Efekat na funkciju CarO porina su ostvarivale

zamene aminokiselina G145N (varijanta III) i G154V (varijanta IV), kao i delecije I135del i V159del (varijanta IV). Grupe II (varijanta V) i III (varijanta VI) su posedovale veći broj aminokiselinskih razlika u odnosu na grupu I (1,7 puta više). U CarO grupi II je detektovano 108 neutralnih i 9 aminokiselinskih razlika koje utiču na biološku ulogu ovog porina (A19F, W57Y, G64S, D79S, D128T, T140L, F177L, P179A i W185I). Predstavnici CarO grupe III su posedovali 97 i 109 razlika u aminokiselinskom sastavu, od kojih je 8 uticalo na funkciju CarO proteina (R5Y, V6Q, W57Y, P104_N110del, K146_N147del, G145N, Y148T i N214_P215insV).

Analizom aminokiselinskih razlika Omp33-36 je ustanovljeno da varijanta 1 (grupa III) ima 22% aminokiselinskih razlika koje ostvaruju efekat na biološku ulogu ovog porina, i to 12 supstitucija, 2 insercije i 2 delecije. Varijanta 2 (grupa III) je posedovala 14 ovakvih razlika aminokiselina (12 zamena aminokiselina i 2 delecije), dok je kod varijante III (grupa II) pronađeno 28,8% razlika sa uticajem na funkciju Omp33-36 (12 aminokiselinskih zamena i 8 delecija). Varijanta 4 (grupa I) je pokazala najizraženiju raznovrsnost razlika u aminokiselinama sa uticajem na biološku ulogu Omp33-36 (49 supstitucija, 3 insercije i 9 delecija), iako je njihova procentualna zastupljenost od ukupnog broja aminokiselinskih razlika slična prethodnim varijantama (21%-29,5%). Sve zamene, insercije i delecije koje utiču na biološku funkciju Omp33-36 porina četiri *A. baumannii* varijante su prikazani u Tabeli 16.

Tabela 16. Spisak aminokiselinskih razlika (supstitucija, insercija i delecija) sa uticajem na biološku funkciju Omp33-36

Omp33-36 varijanta <i>A. baumannii</i>	Tip aminokiselinske razlike	Aminokiselinska razlika
1	Supstitucija	H18Q
		D32E
		N36L
		G46_T47delinsIS
		Y49_F50delinsFL
		F50L
		Y81_T93delinsESGDEIATRKNES
		Y94F
		K123E
		V175_V176delinsAL
Insercija	N36_D37insN	
	N273_A274insYEANL	
Delecija	G246del	
	G246_D248del	
2	Supstitucija	K2R
		Y20F
		Y48F
		F50L
		A55_S56delinsTA
		N71S
		V89_H92delinsYHIG
		V148_A149delinsMT
		D182_K184delinsQNY
		A209V
Delecija	S245_V250delinsGEFRQA	
	L287F	
3	Supstitucija	T282_F293del
		F293del
		M1K
		K2S
		L4_L6delinsFLF
		L6F
		T8_G16delinsIFTAVSAFN
Q25_S28delinsGTMY		
Y30_V31delinsFT		
T33_K38delinsMDGGEV		

		D54_G58delinsETKNY P59S V96_K97delinsIV V155_K173delinsLSESFDPVQASKYGFITSF
	Delecija	M1_G5del M1_A7del P105del Y106del T201del N202del A289_F293del F293del
		M14_G16delinsLGT M14_H18delinsLAVSG G16I G16L H18G H18S Q21K Q27_Y30delinsTIAL Q27_V31delinsSAGLT D54_G58delinsQVKNS K57Y A61N N67S S73_Y76delinsNAHV S73_N77delinsKAQYQ Y76I K80_E83delinsDYDL V89_T93delinsSERHR V89_T93delinsTKDTQ V89_T93delinsYDETTF K97_G98delinsGV G98I P103S A113_K123delinsGTIGNINRDSG A113_S127delinsGSVGRDDSKYD A113_S127delinsGDVGRNEREIDNTNI D129_R133delinsFDETV D129_R133delinsGDTTF D129_R133delinsSKVTT G131L Y152_D157delinsLAGYDN Y152_L161delinsVKGYDN Y152_L161delinsVKGYDEKDGK
4	Supstitucija	

D186V
D186_V188delinsADP
D186_V188delinsVDP
G196_G200delinsTTLSN
N202_F207delinsGNDINL
S245_Y257delinsINNSDVFTIRAKK
S245_Y257delinsPYDSNEFGVSARK
I259_A262delinsLNQQ
P261E
V265_A274delinsLEGRVGFGEI
G266_A274delinsEGSIDFAEE
R280_I285delinsYNKF
T284I
L287G
N288A
N288R

Insercija	H18_A19insAAN H18_A19insTAN H18_A19insTAAH
-----------	--

Delecija	P105del Y106del G125_S127del L161_A163del F164_Q185del G200del T201del K275_D281del T284_F293del
----------	--

5. Diskusija

Vrste roda *Acinetobacter*, pre svih *Acinetobacter baumannii*, su u poslednjih nekoliko decenija postale izuzetno značajan klinički problem na globalnom nivou. Jedan od osnovnih aduta ove grupe patogenih bakterija je višestruka rezistencija na antibiotike (MDR fenotip). Posebnu zabrinutost izaziva postojanje i globalno širenje izolata *A. baumannii* koje su rezistentni na antibiotike poslednjeg izbora, kao što su karbapenemi (Neonakis et al., 2011; Roca Subirà et al., 2012; Abbott et al., 2013; Wong et al., 2017). Nadzor nad patogenim bakterijama, koji obuhvata izučavanje klonalnog rasprostranjenja, kao i mehanizama koji im obezbeđuju rezistenciju na antibiotike, ima za cilj ograničavanje širenja ovih bakterija i korišćenje adekvatne terapije u njihovoj eliminaciji. Evropske države u kojima je ovaj vid unutarbolničkog nadzora nad predstavnicima roda *Acinetobacter* ustanovljen su pripadnice Evropske ekonomske zone (države članice Evropske unije, Island, Lihtenštajn i Norveška). Podaci EARS-Net („European Antimicrobial Resistance Surveillance Network”) iz 2016. godine ukazuju da je procenat *Acinetobacter* spp. rezistentnih na karbapeneme izraženiji u zemljama južne, jugoistočne i istočne Evrope ($\geq 50\%$) (ECDC, 2017). Iako je Republika Srbija geografski pozicionirana u ovom delu Evrope i smatra se jednim od izvora širenja izolata *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme (Pfeifer et al., 2011; Dortet et al., 2016), regulisani rutinski nadzor ove grupe bakterija u Srbiji još uvek nije ustanovljen. Prva studija koja pruža podatke o *A. baumannii* rezistentnim na karbapeneme poreklom iz Srbije (Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić”, tercijarne pedijatrijske bolnice iz Beograda) je deo ove teze. Klinički izolati *A. baumannii* rezistentni na karbapeneme, koji su uključeni u ovu studiju, su pripadali trima klonalnim grupama karakterističnim za Evropu (Evropski klonovi I-III) (Higgins et al., 2009a), sa izuzetkom jednog soja (8778), koji nije pripadao nijednoj od ove tri grupe. Ranije opisan kao najuspešniji bolnički Evropski klon, Evropski klon II (Grupa 1) je bio najzastupljeniji i među izolatima iz Srbije (67,86%) (Turton et al., 2007; Higgins et al., 2009a; Zarrilli et al., 2013; ECDC, 2017). Kao u ovoj studiji, asociranost navedene tri klonalne grupe sa rezistencijom na karbapeneme kod *A. baumannii* je ustanovljena i u prethodnim studijama (Higgins et al., 2009a; Minandri et al., 2012; Zarrilli et al., 2013). Pored genotipizacije izolata *A. baumannii* metodom zasnovanoj na sekvencama tri gena (*ompA*, *csuE* i *bla_{OXA-51}*), ovi izolati su analizirani i

metodom PFGE, koja se smatra zlatnim standardom za ispitivanje klonalnog širenja patogena (Zarrilli et al., 2013). Budući da je PFGE diskriminativnija u odnosu na metodu koja je zasnovana na razlikama u sekvencama tri gena, najbrojnije klonalne Grupe 1 i 3 su bile raspoređene u nekoliko pulsotipova, i to Grupa 1 u sva četiri (A-D), a Grupa 3 u dva pulsotipa (A i D). Iako redak, fenomen da izolati filogenetski srodniji po PFGE pripadaju različitim, a udaljeniji istim klonalnim grupama, je takođe prethodno opisan (Dehbalaei et al., 2017). Rezultati dobijeni ovima metodama ukazuju na izostanak klonalne distribucije izolata *A. baumannii* unutar navedene bolničke ustanove. Takođe, diverzitet analiziranih izolata navodi na zaključak da su ovi izolati različitog porekla.

Pored dve urođene β -laktamaze (AmpC cefalosporinaze i OXA-51 oksacilinaze), kod izolata *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme je uočeno i prisustvo stečenih karbapenemaza klase D (CHDLs). Najrasprostranjenija stečena CHDL među analiziranim izolatima *A. baumannii* je bila oksacilinaza OXA-24 (82,14%). Iako se u većini studija ne javljaju sa najizraženijom učestalošću među stečenim oksacilinazama, oksacilinaze koje pripadaju podfamiliji OXA-24 (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40 i OXA-72) su neretko detektovane kod kliničkih izolata *A. baumannii* poreklom iz država sa kojima se Srbija graniči (Franolic-Kukina et al., 2011; Goic-Barisic et al., 2011; Todorova et al., 2014; Vranic-Ladavac et al., 2014; Georgescu et al., 2016). Prvoopisana i klinički najšire rasprostranjena stečena oksacilinaza (Paton et al., 1993; Poirel et al., 2011; Abbott et al., 2013), OXA-23, se u ovoj studiji javljala sa učestalošću od 57,14%. Stečena oksacilinaza, koja je detektovana u najmanjem procentu među izolatima *A. baumannii*, bila je OXA-58 (39,29%). Ovaj tip oksacilinaza je zahvaljujući isključivoj lokalizaciji na plazmidima globalno rasprostranjen, sa posebnom zastupljenošću u Grčkoj i Italiji (Roca Subirà et al., 2012; Karampatakis et al., 2017). Iako CHDLs karbapenemaze poseduju slabu hidrolitičku aktivnost prema karbapenemima, ekspresija više ovakvih β -laktamaza, a naročito prisustvo insercionih sekvenci (najčešće *ISAbal*) uzvodno od gena koji ih kodiraju, može obezbediti viši nivo rezistencije na karbapeneme datim izolatima *A. baumannii* (Poirel i Nordmann, 2006; Poirel et al., 2011). U ovoj studiji je šest izolata posedovalo sve tri detektovane stečene CHDLs (OXA-23, OXA-24 i OXA-58). Takođe, kod jednog izolata je inserciona sekvenca *ISAbal* pronađena uzvodno od *bla*_{OXA-51}, a kod 10 izolata uzvodno od *bla*_{OXA-23} gena. Ova inserciona sekvenca je detektovana i ispred *bla*_{AmpC} gena kod 13 izolata, obezbeđujući mu potencijalni promotor i viši nivo ekspresije (Poirel i Nordmann, 2006).

Skorije opisane i trenutno uglavnom ograničene na *Acinetobacter* spp. poreklom sa američkih kontinenata (Higgins et al., 2009b; Higgins et al., 2013; Zander et al., 2014), oksacilinaze OXA-143 i OXA-235 nisu uočene kod izolata *A. baumannii* uključenih u ovu studiju. Kao i u prethodnim studijama, stečene CHDLs OXA-24 i OXA-58 izolata *A. baumannii* poreklom iz Srbije su bile distribuirane među pripadnicima različitih Evropskih klonova (I-III), ali i prisutne kod izolata nesvrstanog u navedene klonove (8778). Iako prethodno opisana kod sva tri Evropska klona, oksacilinaza OXA-23 je u ovoj studiji izostala samo kod predstavnika Evropskog klona I (4031) (Turton et al., 2007; Higgins et al., 2009a; Gallego, 2010; Zarrilli et al., 2013). Prisustvo IS*Abal* uzvodno od *bla*_{AmpC} gena je uočeno kod izolata sva tri Evropska klona (Hamidian i Hall, 2011; Hamidian i Hall, 2013; Revathi et al., 2013), ispred *bla*_{OXA-51} gena kod izolata nesvrstanog u Evropske klonove, kao i uzvodno od *bla*_{OXA-23} gena kod pripadnika Evropskog klona II (He et al., 2011; Revathi et al., 2013) i izolata 8778. Pored CHDLs, ispitivana je i uključenost predstavnika karbapenemaza klasa A (KPC) i B (IMP, VIM i NDM-1), hidrolitički aktivnijih prema karbapenemima i daleko ređe opisanih (Poirel i Nordmann, 2006; Abbott et al., 2013; Alkasaby i El Sayed Zaki, 2017; Lee et al., 2017), u rezistenciju na karbapeneme izolata *A. baumannii* poreklom iz Srbije. Navedene karbapenemaze nisu bile prisutne u analiziranoj populaciji *A. baumannii*. Naročito je značajno napomenuti izostanak *bla*_{NDM-1} kod analiziranih *A. baumannii* zbog opisanog prisustva navedenog gena kod *Escherichia coli* poreklom iz iste bolničke ustanove (Novovic et al., 2016), kao i hipoteze da se Srbija smatra izvorom širenja *bla*_{NDM-1} pozitivnih *A. baumannii* (Pfeifer et al., 2011). Pored CHDLs, inaktivaciona ugradnja IS unutar *carO* gena kod dva izolata *A. baumannii* (7342 i 4031) bi mogla da bude dodatni uzročnik rezistencije na karbapeneme. Ovaj vid inaktivacije *carO* gena se smatra najčešćim mehanizmom odgovornim za izostanak ovog porina u spoljašnjoj membrani i ograničen ulazak karbapenema u ćelije *A. baumannii* (Mussi et al., 2005; Lu et al., 2009; He et al., 2011; Lee et al., 2011; Kim et al., 2012). Budući da analizom nukleotidnih sekvenci *omp33-36* gena *A. baumannii* poreklom iz Srbije nije ustanovljen nijedan od tipova mutacija (mutacije uzročnici promene okvira čitanja, insercije i delecije), možemo da smatramo da ovaj porin nije doprineo stečenoj rezistenciji na karbapeneme kod opisanih izolata.

Kada se govori o rezistenciji na antibiotike kod klinički značajnih bakterija uglavnom se misli na urođenu i stečenu rezistenciju na antibiotike. Međutim, reverzibilna rezistencija na antibiotike može odigrati izuzetno važnu ulogu u opstanku patogena, koji menjaju ekspresiju

gena odgovornih za rezistenciju na antibiotike nakon izlaganja određenim uslovima spoljašnje sredine, kao što su različite faze rasta, prisustvo nutrijenata ili subinhibitorne koncentracije antibiotika (Fernández i Hancock, 2012). Za razliku od urođene i stečene, ovaj vid rezistencije na antibiotike se ne može prenositi na naredne generacije bakterija, jer poseduje prolazan karakter (trajanje je određeno dužinom izlaganja signalu iz spoljašnje sredine). Fenomenom reverzibilne rezistencije se može objasniti izostanak eliminacije patogena iz domaćina nakon antibiotske terapije, koja je u *in vitro* uslovima efikasna protiv datih bakterija. Naime, različiti signali poreklom iz domaćina mogu uticati na promenu ekspresije determinanti rezistencije na antibiotike kod patogenih bakterija (Fernández i Hancock, 2012). Pored navedenog, reverzibilna rezistencija na antibiotike prolongirajući preživljavanje bakterija može dovesti do akumulacije faktora stečene rezistencije, nastalih mutacijama u odgovarajućim genima ili dospelih horizontalnim genskim transferom, i porasta rezistencije na određene antibiotike (Fernández i Hancock, 2012). Kao sastavni delovi spoljašnje membrane Gram-negativnih bakterija kroz koje hranljive i toksične materije dospevaju u ćeliju, porini su često opisani kao uzročnici reverzibilne rezistencije patogenih bakterija. Smanjenje ekspresije gena koji kodiraju ove proteine i posledično povećanje rezistencije na određene antibiotike, kao odgovor na prisustvo različitih signala iz spoljašnje sredine (antibiotici, dezinfekciona sredstva, lekovi, osmotski stres, različite temperature, natrijum-hlorid itd.), su opisani u prethodnim studijama (Tavío et al., 2004; Bore et al., 2007; Hood et al., 2010; Jetter et al., 2010).

Jedan od ciljeva ove teze se odnosio na ispitivanje uticaja stresnih uslova spoljašnje sredine (različitih faza rasta, tretmana subinhibitornom koncentracijom karbapenema i hipoksije) na transkripciju gena za porine *A. baumannii* CarO i Omp33-36, odgovornih za rezistenciju na karbapeneme. Transkripcioni odgovor *carO* gena na različite faze rasta i subinhibitorne koncentracije karbapenema u datim fazama rasta je praćen kod soja *A. baumannii* 813, osetljivog na karbapeneme, i soja 1995/12, rezistentnog na karbapeneme (produkcija stečenih oksacilinaza OXA-23, OXA-24 i OXA-58; divlji tip *carO* gena), dok je transkripcija *omp33-36* gena dodatno praćena i kod soja 4031, rezistentnog na karbapeneme (produkcija stečenih oksacilinaza OXA-24 i OXA-58; inserciono inaktiviran *carO* gen). Generalno, transkripcija gena za navedene porine je zavisila od faze rasta bakterijskih ćelija. Kada je u pitanju *carO* gen, odgovor na povećanje broja ćelija je bio različit kod soja osetljivog (pad transkripcije) u odnosu na soj koji je rezistentan na karbapeneme (nakon značajnog porasta, izvestan pad transkripcije u stacionarnoj fazi rasta).

Značajno smanjenje transkripcije *omp33-36* gena je uočeno kod sva tri analizirana soja na prelasku iz rane u srednju eksponencijalnu fazu rasta, dok je trend ekspresije u stacionarnoj fazi rasta bio drugačiji (kod sojeva 813 i 4031 je došlo do porasta, a kod soja 1995/12 do dodatnog pada u transkripciji u odnosu na prethodnu fazu rasta). Fernando i Kumar (2011) su ustanovili da transkripcija *carO* gena soja *A. baumannii* ATCC19606, osetljivog na karbapeneme (Bou et al., 2012), čak $13 \times$ raste u srednjoj eksponencijalnoj fazi rasta, nakon čega blago opada u fazama koje slede. Pored toga, analizom proteoma *A. baumannii* ATCC17978, osetljivog na karbapeneme (Mussi et al., 2011), u različitim fazama rasta uočen je porast ekspresije CarO porina nakon rane eksponencijalne faze rasta ($\sim 2,4 \times$), a zatim blagi pad u narednoj fazi rasta (Soares et al., 2010). Poređenjem sa rezultatima dobijenim za sojeve ATCC19606 i ATCC17978, može se zaključiti da ekspresija *carO* gena soja 1995/12 poseduje sličan trend tokom različitih faza rasta. Studija koja se bavila izučavanjem proteoma *A. baumannii* ATCC17978 je detektovala i da je sa povećanjem gustine bakterijskih ćelija došlo do značajnog smanjenja ekspresije Omp33-36 porina (Soares et al., 2010), kao što je bio slučaj sa transkripcijom *omp33-36* gena soja 1995/12. Takođe, transkripcija *oprD* gena soja ATCC19606 na prelasku iz rane u srednju eksponencijalnu fazu opada, kao što je primećeno za *carO* gen soja 813 i *omp33-36* gen sva tri soja, i održava isti nivo u narednim fazama rasta (Fernando i Kumar, 2011). Iako postoje izvesne sličnosti u ekspresiji gena za date porine kod različitih sojeva, ne može se izvući generalan zaključak na koji način njihova ekspresija zavisi od faze rasta bakterija. Scenario koji se može smatrati najverovatnijim je da ekspresija *carO* i *omp33-36* gena u različitim fazama rasta zavisi od karakteristika pojedinačnih sojeva.

Tretman subinhibitornom koncentracijom karbapenema je ostvario značajan uticaj na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena kod analiziranih sojeva *A. baumannii*. U prisustvu subinhibitornog imipenema ili meropenema, transkripcija *carO* gena je bila na sličan način regulisana kod soja osetljivog i soja rezistentnog na karbapeneme u različitim fazama rasta (izuzetak je bio tretman soja 1995/12 subinhibitornim imipenemom u ranoj eksponencijalnoj fazi rasta). Naime, subinhibitorna koncentracija imipenema je dovela do statistički značajnog smanjenja transkripcije *carO* gena kod oba soja, sa izraženijim efektom na soj osetljiv na imipenem u eksponencijalnoj fazi rasta. Sa druge strane, subinhibitorna koncentracija meropenema je u početnim fazama uticala na smanjenje, a kasnije na povećanje nivoa *carO* iRNK kod oba soja. Na osnovu dobijenih rezultata, ustanovljeno je da je ekspresija CarO porina

daleko više ograničena u prisustvu imipenema, karbapenema za koji poseduje specifično mesto, nego meropenema, karbapenema za koji takvo mesto nije pronađeno unutar CarO porina (Catel-Ferreira et al., 2011). Kada je reč o transkripcionom odgovoru *omp33-36* gena na tretman subinhibitornim koncentracijama imipenema i meropenema, najizraženiji pad je primećen kod soja osetljivog na karbapeneme u fazama koje slede nakon rane eksponencijalne faze rasta. Sojevi rezistentni na karbapeneme takođe pokazuju smanjenje nivoa *omp33-36* iRNK nakon tretmana sa subinhibitornom koncentracijom karbapenema (soj 4031 sa imipenemom), s tim da je odgovor ekspresije *omp33-36* soja 1995/12 na prisustvo datih antibiotika nakon rane eksponencijalne faze izuzetno slab ili izostaje. Kao što je i očekivano, soj koji je bio osetljiv na karbapeneme je u slučaju oba porina pokazao najizraženiji pad transkripcije u prisustvu karbapenema. Ovaj pad može imati za posledicu smanjen broj molekula CarO i Omp33-36 u spoljašnjoj membrani *A. baumannii* i ograničen ulazak karbapenema u ćeliju, što ovim patogenima obezbeđuje prilagođavanje na novonastali stres. Takođe, uticaj subinhibitorne koncentracije karbapenema na transkripciju analiziranih porina kod sojeva rezistentnih na ovu grupu antibiotika može doprineti izraženijoj rezistenciji (povećanju MIK vrednosti) ovih sojeva na karbapeneme. Navedeni rezultati potvrđuju prethodno ustanovljen hormetički efekat koji ostvaruju antibiotici utičući na ekspresiju genetičkih determinanti uključenih u rezistenciju na antibiotike (Davies et al., 2006; Hua et al., 2014). Uticaj subinhibitorne koncentracije antibiotika na smanjenje porina CarO i Omp33-36 u spoljašnjoj membrani *A. baumannii* je prethodno opisan za tetraciklin (Yun et al., 2008). Pored toga, u prethodnim studijama je uočeno da subinhibitorne koncentracije imipenema stimuliše formiranje biofilma, pokretljivost, kao i produkciju proteina za preuzimanje gvožđa kod *A. baumannii* (Nucleo et al., 2009; Dhabaan et al., 2016). Sve navedeno ukazuje na opasnost neadekvatnog korišćenja antibiotika, koje može stimulisati reverzibilnu rezistenciju i virulenciju patogenih bakterija, kao što je *A. baumannii*. Stoga je kontrolisana i ispravna upotreba antibiotika u tretmanu svake pojedinačne infekcije od izuzetnog značaja (Lee et al., 2013).

Stanje snižene koncentracije kiseonika (hipoksija) se javlja u tkivima domaćina tokom inflamacije prouzrokovane bakterijskom infekcijom. Razlog za pojavu hipoksije je povećana potreba za kiseonikom rezidentnih i infiltriranih imunskih ćelija domaćina, kao i bakterija uzročnika infekcije (Schaffer i Taylor, 2015). Pored toga, hronična inflamacija vodi patološkim stanjima krvnih sudova i mikrotrombozama, koje dalje prouzrokuju smanjeni protok krvi i

izraženije hipoksično stanje tkiva (Schaffer i Taylor, 2015). Iako hipoksija pre svega igra ulogu u eliminaciji patogena aktiviranjem urođenog i stečenog imuniteta domaćina, njen uticaj se može ispoljiti i direktno na patogene bakterije. Na koji način će hipoksija delovati na uzročnike infekcije zavisi od prirode patogena i karakteristika infekcije koju izaziva (Schaffer i Taylor, 2015). U prethodnim studijama je ustanovljeno da *Mycobacterium tuberculosis* ima sposobnost prilagođavanja na sniženu koncentraciju kiseonika prelazeći u metabolički latentno stanje, koje mu obezbeđuje opstanak do trenutka kada se nađu u povoljnim uslovima. Pored zaštite od imunskog sistema domaćina, ovo stanje *M. tuberculosis* obezbeđuje i zaštitu od antibiotika čija su meta procesi ćelijskog rasta i deobe (Gomez i McKinney, 2004; Rustad et al., 2009). Marteyn i saradnici (2010) su opisali uticaj hipoksije na virulentni potencijal *Shigella flexneri*, koji ostvaruje preko sekrecionog sistema tipa III izduživanjem igala. Takođe, hipoksična mikrosredina prisutna u plućima pacijenata obolelih od cistične fibroze može doprineti porastu višestruke rezistencije na antibiotike kod *P. aeruginosa* usled promena u nivou ekspresije efluks pumpi (Schaible et al., 2012). Jedina studija koja povezuje *A. baumannii* i hipoksiju je analizirala potrebne minimalne letalne doze *A. baumannii* ATCC17978, rasprostranjenje datih bakterija u organima, kao i nivo preživljavanja domaćina u mišjem modelu peritonitisa. Generalni zaključci ove studije ukazuju na to da hipoksični uslovi vode bržoj eliminaciji patogena (Gil Marqués et al., 2017). Budući da su podaci o uticaju hipoksije na *A. baumannii* ograničeni na ovu studiju, svaki naredni je od izuzetnog značaja, naročito oni koji se odnose na uticaj ovog stanja na molekularnom nivou. Stoga je jedan od ciljeva ove teze bio ispitivanje efekta hipoksije na transkripciju *carO* i *omp33-36* gena soja osetljivog na karbapeneme. Uočeno je da ograničena koncentracija kiseonika statistički značajno smanjuje ekspresiju *omp33-36* gena, što dalje može doprineti reverzibilnoj rezistenciji na karbapeneme u domaćinu. Za razliku od prethodnog, promena transkripcije u hipoksičnim uslovima u odnosu na normoksične uslove je izostala u slučaju *carO* gena.

Pored uloge u rezistenciji na karbapeneme, porin Omp33-36 ispoljava karakteristike značajnog faktora virulencije kod *A. baumannii* (Smani et al., 2012; Smani et al., 2013; Rumbo et al., 2014). Kada je reč o CarO, postoje izvesne indicije da i ovaj porin poseduje virulentan karakter (Fernández-Cuenca et al., 2011; Cabral et al., 2011). Zanimljiva je činjenica da u uslovima koji odgovaraju onima u domaćinu, kao što su telesna temperatura i ograničena koncentracija gvožđa, dolazi do povećanja ekspresije CarO porina (Mussi et al., 2007;

Eijkelkamp et al., 2011; Nwugo et al., 2011). Takođe, uočen je porast aminokiseline ornitin, supstrata CarO porina, kod teških povreda kože domaćina u kojima ova aminokiselina pospešuje zaceljivanje. Ornitin je i sastavni deo dugoživećih proteina kože usled određenih posttranslacionih modifikacija asociраних sa starošću (Mussi et al., 2007). U skladu sa prethodno navedenim, može se pretpostaviti da različiti signali poreklom iz domaćina, zdravog ili narušenog zdravlja, mogu uticati na porast ekspresije CarO porina, koji u domaćinu ostvaruje ulogu faktora virulencije. Budući da je *A. baumannii* značajan uzročnik infekcija rana stečenih na bojnopolju ili u prirodnim katastrofama (Mihu i Martinez, 2011), odgovor ovog patogena na kontakt sa keratinocitama može ukazati na učesnike u inicijalnim koracima infekcije domaćina. Značajan porast transkripcije *carO* i *omp33-36* gena kod sojeva *A. baumannii* sa različitom osetljivošću na karbapeneme nakon kontakta sa keratinocitama, ove porine čini potencijalnim učesnicima u inicijaciji ovog tipa infekcije. Povećanje ekspresije *carO* i *omp33-36* gena je uočeno i nakon kontakta soja *A. baumannii* osetljivog na karbapeneme sa imunskim ćelijama. Iako je prethodno isključeno učešće CarO porina u adheziji *A. baumannii* za epitelne ćelije pluća (Smani et al., 2012), ne može se isključiti njegova uloga u adheziji za druge tipove ćelija. Za razliku od CarO, ustanovljeno je da Omp33-36 omogućava adheziju i invaziju epitelnih ćelija pluća (Smani et al., 2013). Pored toga, uočena je i povećana ekspresija OmpA, izuzetno značajnog porina *A. baumannii* uključenog u virulenciju i rezistenciju na antibiotike (Sugawara i Nikaido, 2012; McConnell et al., 2013; Smani et al., 2014), nakon inkubacije bakterijskih ćelija u uslovima sličnim disajnim putevima čoveka (Méndez et al., 2015). Nivo citotoksičnosti koji sojevi *A. baumannii* ostvaruju na keratinocite i imunske ćelije nije bio povezan sa povećanjem transkripcije *carO* i *omp33-36* gena iako je dokazano da Omp33-36 ostvaruje citotoksičan efekat na epitelne ćelije pluća i makrofage (Smani et al., 2013). Jedan od razloga za ovaj fenomen može ležati u poređenju citotoksičnosti sojeva koji nisu izogeni i potencijalno poseduju faktore virulencije koji ostvaruju različit citotoksičan efekat na ćelije domaćina. Takođe, ne može se isključiti mogućnost regulacije ekspresije *carO* i *omp33-36* gena na posttranskripcionom nivou, kao i sekrecije porina u okviru vezikula spoljašnje membrane.

Porast rezistencije na antibiotike u najvećem broju slučajeva u neselektivnim uslovima, direktno ili indirektno, ostvaruje negativan uticaj na fitnes i virulenciju patogenih bakterija (Beceiro et al., 2013). Međutim, ograničen broj primera da navedeni fenomeni mogu biti pozitivno korelisani predstavlja ozbiljan problem za globalni zdravstveni sistem. Porini

predstavljaju sastavne delove bakterijske ćelije koji mogu imati dvostruku ulogu, faktora uključenih u rezistenciju na antibiotike i virulenciju klinički značajnih patogena (Beceiro et al., 2013). Ograničen ulazak antibiotika u ćeliju može biti omogućen smanjenjem/izostankom molekula porina u spoljašnjoj membrani, a razlog za to je smanjenje/izostanak ekspresije datog porina ili njegovo oslobađanje u vanćelijsku sredinu, najverovatnije u vezikulama spoljašnje membrane. Prisustvo visokih koncentracija natrijum-hlorida upravo ostvaruje navedeni efekat na CarO i Omp33-36 doprinoseći porastu rezistencije na antibiotike (Hood et al., 2010). Za razliku od OmpA porina, koji dokazano ostvaruju ulogu virulentnog faktora transportujući se unutar vezikula spoljašnje membrane (Jin et al., 2011), CarO i Omp33-36 su detektovani u okviru datih struktura i postoji mogućnost da na ovaj način stižu do ciljnih ćelija (Kwon et al., 2009; McConnell et al., 2011b; Rumbo et al., 2014). Rezultati prikazani u ovoj tezi ukazuju da je ekspresija CarO i Omp33-36 porina na precizan način regulisana u zavisnosti od signala koji ćelije *A. baumannii* primaju iz spoljašnje sredine. Signali koji im ugrožavaju opstanak, kao što su subinhibitorne koncentracije karbapenema i hipoksija, usmeravaju ulogu CarO i Omp33-36 u pravcu rezistencije na antibiotike, dok signali koji informišu o prisustvu domaćina, kao što su ćelije domaćina, vode njihovoj virulentnoj prirodi. Naravno, kao što je navedeno u prethodnom pasusu, ne može se isključiti mogućnost regulacije ekspresije *carO* i *omp33-36* gena na nivoima koji slede transkripciju, i samim tim, pozitivan uticaj ispitivanih signala na procese rezistencije na antibiotike i virulencije istovremeno.

Usled ograničenog broja izolata uključenih u analizu diverziteta CarO porina u prethodnim studijama (Catel-Ferreira et al., 2011; Mussi et al., 2011), klasifikacija ovog porina unutar celog roda *Acinetobacter* bila je jedan od ciljeva ove teze. ML filogenetskom analizom izvršeno je grupisanje CarO porina roda *Acinetobacter* u tri grupe (I-III), unutar kojih je smešteno šest varijanti (četiri varijante unutar grupe I i po jedna varijanta unutar grupe II i III). Grupa koja je bila najbrojnija i sadržala najveći broj klinički značajnih izolata *A. baumannii* bila je grupa I sa četiri varijante koje su prethodno opisane (Mussi et al., 2011). Takođe, izolati *A. baumannii* rezistentni na karbapeneme poreklom iz Srbije, koji nisu imali inserciono inaktiviran *carO* gen, su bili predstavnici varijante I i varijante III. Varijanta I je odgovarala prethodno opisanom CarOa, dok je varijanta III predstavljala CarOb kanal (Catel-Ferreira et al., 2011). U malobrojnije grupe II i III su klasifikovani izolati *Acinetobacter* spp. sa različitim kliničkom značajnošću. Topološka predikcija različitih varijanti CarO porina je potvrdila prethodno

ustanovljenu organizaciju ovog porina (deset transmembranskih regiona sastavljenih od β -lanaca i pet petlji usmerenih ka vanćelijskoj sredini) (Mussi et al., 2011). Poređenjem rezultata dobijenih u ovoj u odnosu na prethodnu studiju, uočen je jedan varijabilni region više na N-terminusu CarO porina, pored jednog varijabilnog, dva hipervarijabilna i četiri konzervisana regiona u sve tri *Acinetobacter* spp. grupe (Mussi et al., 2011). Pozicije VR2, HVR1 i HVR2 odgovaraju petljama okrenutim ka spoljašnjoj sredini (L2, L3 i L5) (Mussi et al., 2011), dok se novootkriveni region VR1 nalazi u periplazmatskom regionu. N-terminalno pozicioniran motiv AEVGTXGYG (X je T ili L; u ovoj studiji je aminokiselina X bila T), okarakterisan kao obeležje CarO porina familije *Moraxellaceae* (Mussi et al., 2005), je bio konzervisan kod različitih grupa roda *Acinetobacter* i pozicioniran u okviru periplazmatske petlje (varijante I-IV) ili na prelasku transmembranskog regiona u petlju usmerenu kao spoljašnjoj sredini (varijante V i VI). Ovakav raspored (hiper)varijabilnih i konzervisanih regiona je prethodno opisan kao vid strategije za izbegavanje imunskog odgovora domaćina (Achouak et al., 2001). Pored različitog antigenog kapaciteta, uzrok izražene polimorfности ovog porina (64%) može biti i adaptacija na ekološku nišu u kojoj se nalaze pojedinačni izolati *A. baumannii*, koja vodi specifičnoj ulozi CarO porina (različita specifičnost varijanti za supstrate). Takođe, predložena asortativna rekombinacija različitih varijanti *carO* gena među izolatima *A. baumannii* može predstavljati izuzetno brz oblik prilagođavanja na novonastale uslove spoljašnje sredine (Mussi et al., 2011). Iako je polimorfnost ovog porina izražena, PROVEAN analizom je ustanovljeno da većina aminokiselinskih razlika CarO porina ne bi trebalo da ostvaruje efekat na njegovu biološku ulogu.

Uzevši u obzir značajnu ulogu Omp33-36 porina u patogenom potencijalu vrste *A. baumannii*, izvršena je njegova klasifikacija unutar roda *Acinetobacter*. Kao i CarO, ovaj porin je raspoređen u tri grupe (I-III), koje su obuhvatale četiri varijante Omp33-36 vrste *A. baumannii*. Najbrojnija grupa III je bila podeljena na dve varijante (1 i 2), u koje su, između ostalih, svrstani izolati *A. baumannii* poreklom iz Srbije. Dve preostale grupe (I i II) su sadržale po jednu varijantu Omp33-36 porina *A. baumannii*. Kao izuzetno polimorfan (86%) porin, Omp33-36 je bio topološki različito organizovan u spoljašnjoj membrani predstavnika Omp33-36 varijanti (od jedanaest do četrnaest transmembranskih regiona sastavljenih od β -lanaca i od pet do sedam petlji usmerenih ka vanćelijskoj sredini). Takođe, među različitim grupama *Acinetobacter* spp. se razlikovala dužina porina, kao i broj i raspored varijabilnih (V4-V6) i konzervisanih regiona (C5-

C6). Za razliku od varijanti 2 i 3 Omp33-36 *A. baumannii* koje su bile relativno konzervisane, varijabilni regioni varijanti 1 i 4 su bili smešteni unutar vanćelijskih petlji. Jedini konzervisani motiv kod sve tri Omp33-36 grupe je bio motiv PLAEAAFL pozicioniran na N-terminalnom regionu. Ovaj motiv je prethodno uočen kod Omp25 familije proteina u koju je svrstan i Omp33-36 porin (Siroy et al., 2005). Kod grupe I i III PLAEAAFL motiv je bio pozicioniran u transmembranskom regionu, dok se kod grupe II nalazio u okviru petlje okrenute ka vanćelijskoj sredini (L2). Kao i kod CarO porina, izražena polimorfnost ovog proteina može predstavljati mehanizam odbrane *Acinetobacter* spp. od imunskog sistema domaćina. Takođe, prema PROVEAN analizi većina razlika u aminokiselinskoj sekvenci Omp33-36 porina ne bi trebalo da ostvaruje efekat na funkciju ovog porina.

Za razliku od visoko konzervisanih porina *A. baumannii*, koji poseduju karakteristike pogodne za proizvodnju efikasnih vakcina (Luo et al., 2012; Huang et al., 2015; Huang et al., 2016), porini CarO i Omp33-36 *Acinetobacter* spp. se zbog svoje izražene polimorfnosti i položaja konzervisanih regiona ne mogu smatrati idealnim kandidatima za antigene, koji bi se koristili u formulisanju vakcine. Međutim, peptid Omp33-36 PLAEAAFL može da predstavlja potencijalni antigen za pokretanje imunskog odgovora domaćina protiv *Acinetobacter* spp. smeštenih u grupu II Omp33-36 porina. Prednost peptidnih u odnosu na kompleksnije vakcine leži u sposobnosti indukovanja imunskog odgovora domaćina bez opasnosti od izazivanja alergijskih reakcija (Li et al., 2014). Iako peptidi manje dužine pokreću imunski odgovor slabijeg intenziteta, dužina peptida PLAEAAFL odgovara onoj koju prezentuju MHC molekuli prilikom aktivacije limfocita (Patronov i Doytchinova, 2013; Li et al., 2014; Skwarczynski i Toth, 2016). Stoga bi uloga peptida PLAEAAFL u aktivnoj i pasivnoj imunizaciji domaćina protiv *Acinetobacter* spp. trebalo da bude ispitivana u budućim studijama.

6. Zaključci

Zaključci koji se mogu izvesti iz rezultata dobijenih u ovoj tezi su:

1. Metodama genotipizacije (metodom zasnovanom na sekvencama tri gena i PFGE) je ustanovljeno odsustvo klonalnog širenja izolata *A. baumannii* rezistentih na karbapeneme uzorkovanih na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić” u periodu od 2012. do 2014. godine.

1a. Analizirani izolati *A. baumannii* rezistenti na karbapeneme su bili svrstani u tri najčešća klonalne grupe u Evropi (Evropski klonovi I-III), sa izuzetkom jednog izolata koji nije bio svrstan ni u jednu od ove tri klonalne grupe. Najzastupljeniji su bili predstavnici Evropskog klona II.

1b. PFGE metodom su izolati *A. baumannii* rezistenti na karbapeneme grupisani u dva klastera, koja su obuhvatala četiri pulsotipa. Sličnost izolata se kretala od 85% do skoro 100%.

2a. Pored urođenih determinanti rezistencije na β -laktamske antibiotike (AmpC cefalosporinaza i OXA-51 oksacilinaza), izolati *A. baumannii* rezistenti na karbapeneme su posedovali i karbapenemaze klase D (OXA-23, OXA-24 i OXA-58), insercionu sekvencu IS*Abal* pozicioniranu uzvodno od *bla*_{AmpC}, *bla*_{OXA-51} i *bla*_{OXA-23}, kao i *carO* gen inaktiviran insercijom. Među opisanim učesnicima u rezistenciji na karbapeneme najčešća je bila oksacilinaza OXA-24.

2b. Stečene karbapenemaze klase A (KPC), B (IMP, VIM i NDM-1) i D (OXA-143 i OXA-235), i porin Omp33-36 nisu bili učesnici u rezistenciju na karbapeneme kod izolata *A. baumannii* poreklom iz Srbije.

3a. Transkripcija *carO* i *omp33-36* gena zavisi od faze rasta bakterija na način koji je specifičan za pojedinačne sojeve *A. baumannii*.

3b. Subinhibitorne koncentracije karbapenema dovode do smanjenja transkripcije *carO* i *omp33-36* gena u izraženijoj meri kod izolata osetljivih na karbapeneme u odnosu na izolate koji su rezistentni na ovu grupu antibiotika.

3c. Hipoksični uslovi ne ostvaruju uticaj na transkripciju *carO* gena, ali dovode do smanjenja transkripcije *omp33-36* gena.

3d. Kontakt *A. baumannii* sa keratinocitama čoveka i imunskim ćelijama pacova stimuliše transkripciju *carO* i *omp33-36* gena.

3e. Citotoksični efekat pojedinačnih sojeva *A. baumannii* na keratinocite i imunске ćelije ne koreliše sa transkripcijom *carO* i *omp33-36* gena.

3f. Transkripcija *carO* i *omp33-36* gena regulisana signalima iz spoljašnje sredine može doprineti ulozi ovih porina u rezistenciji na antibiotike (subinhibitorna koncentracija karbapenema i hipoksija) ili u virulenciji (kontakt sa ćelijama domaćina) *A. baumannii*.

4a. Izolati *A. baumannii* uključeni u ovu studiju su posedovali 5 različitih tipova alela *carO* gena (prvi tip alela je posedovalo 12 izolata, drugi 14, a treći, četvrti i peti tip alela je imao po jedan izolat). Za razliku od tri, preostala dva tipa alela *carO* gena su bili inaktivirani ugradnjom različitih insercionih sekvenci. Pored toga, kod analiziranih izolata *A. baumannii* je ustanovljeno prisustvo dva tipa alela *omp33-36* gena (prvi tip *omp33-36* alela je posedovalo 16 izolata, a drugi 13 izolata).

4b. Porini CarO i Omp33-36 roda *Acinetobacter* su klasifikovani u tri grupe, a vrste *A. baumannii* u šest i četiri varijante, redom.

4c. Izolati *A. baumannii* poreklom iz Srbije su grupisani u CarO varijante I i III (grupa I) (izuzetak su *A. baumannii* sa inserciono inaktiviranim *carO* genom i 813 koji je naknadno uključen u studiju), kao i Omp33-36 varijante 1 i 2 (grupa III).

4d. Predikcijom transmembranske topologije je ustanovljena organizacija CarO porina od 10 transmembranskih regiona sastavljenih od β -lanaca (β 1- β 10) i 5 petlji usmerenih ka vanćelijskoj sredini (L1-L5) za sve opisane varijante, dok se organizacija Omp33-36 razlikovala među varijantama od 11 (β 1- β 11) do 14 transmembranskih regiona sastavljenih od β -lanaca (β 1- β 14) i od pet (L1-L5) do sedam petlji usmerenih ka vanćelijskoj sredini (L1-L7).

4e. CarO i Omp33-36 porini su se pokazali izuzetno polimorfnim (64% i 86%, redom). Broj varijabilnih i hipervarijabilnih regiona je iznosio po 2, a konzerviranih 4 za sve tri CarO grupe.

Različite grupe Omp33-36 su posedovale od 4 do 6 varijabilnih regiona, kao i 4 ili 5 konzervisanih regiona.

4f. Konzervisan motiv kod sve tri CarO grupe je bio AEVGTTGYG, a kod sve tri Omp33-36 grupe PLAEAAFL (oba pozicionirana na N-terminusu). Potencijalni antigen koji bi mogao biti iskorišćen za proizvodnju vakcine je isključivo PLAEAAFL motiv Omp33-36 grupe II, budući da je samo u ovoj grupi bio lokalizovan u petlji okrenutoj ka spoljašnjoj sredini (L2).

4g. PROVEAN analizom je utvrđeno da većina aminokiselinskih razlika među CarO, kao i Omp33-36 porinama, ne bi trebalo da utiče na biološku funkciju datih proteina.

7. Literatura

- Abbott, I., Cerqueira, G.M., Bhuiyan, S., Peleg, A.Y. 2013. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **11** (4): 395-409.
- Achouak, W., Heulin, T., Pagès, J.M. 2001. Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiol. Lett.* **199** (1): 1-7.
- Al-Agamy, M.H., Jeannot, K., El-Mahdy, T.S., Shibl, A.M., Kattan, W., Plésiat, P., Courvalin, P. 2017. First detection of GES-5 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolate. *Microb. Drug Resist.* **23** (5): 556-562.
- Al Atrouni, A., Joly-Guillou, M.L., Hamze, M., Kempf, M. 2016. Reservoirs of non-*baumannii* *Acinetobacter* species. *Front. Microbiol.* **7**: 49.
- Alkasaby, N.M., El Sayed Zaki, M. 2017. Molecular Study of *Acinetobacter baumannii* Isolates for Metallo- β -Lactamases and Extended-Spectrum- β -Lactamases Genes in Intensive Care Unit, Mansoura University Hospital, Egypt. *Int. J. Microbiol.* 2017.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25** (17): 3389-3402.
- Ambler, R.P. 1980. The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* **289**: 321-331.
- Badmasti, F., Ajdary, S., Bouzari, S., Fooladi, A.A.I., Shahcheraghi, F., Siadat, S.D. 2015. Immunological evaluation of OMV (PagL) + Bap (1-487aa) and AbOmpA (8-346aa) + Bap (1-487aa) as vaccine candidates against *Acinetobacter baumannii* sepsis infection. *Mol. Immunol.* **67** (2): 552-558.
- Bagos, P.G., Liakopoulos, T.D., Spyropoulos, I.C., Hamodrakas, S.J. 2004. A Hidden Markov Model method, capable of predicting and discriminating β -barrel outer membrane proteins. *BMC Bioinformatics* **5** (1): 29.

- Beceiro, A., Dominguez, L., Ribera, A., Vila, J., Molina, F., Villanueva, R., Eiros, J.M., Bou, G. 2004. Molecular characterization of the gene encoding a new AmpC β -lactamase in a clinical strain of *Acinetobacter* genomic species 3. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48** (4): 1374-1378.
- Beceiro, A., Pérez, A., Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Vila, J., Rodríguez-Bano, J., Cisneros, J.M., Pachón, J., Bou, G. 2009. Genetic variability among *ampC* genes from *Acinetobacter* genomic species 3. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53** (3): 1177-1184.
- Beceiro, A., Tomás, M., Bou, G. 2013. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin. Microbiol. Rev.* **26** (2): 185-230.
- Bentancor, L.V., O'Malley, J.M., Bozkurt-Guzel, C., Pier, G.B., Maira-Litrán, T. 2012a. Poly-N-acetyl- β -(1-6)-glucosamine is a target for protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infections. *Infect. Immun.* **80** (2): 651-656.
- Bentancor, L.V., Routray, A., Bozkurt-Guzel, C., Camacho-Peiro, A., Pier, G.B., Maira-Litrán, T. 2012b. Evaluation of the trimeric autotransporter Ata as a vaccine candidate against *Acinetobacter baumannii* infections. *Infect. Immun.* **80** (10): 3381-3388.
- Bergogne-Berezin, E., Towner, K.J. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* **9** (2): 148-165.
- Bogaerts, P., Naas, T., El Garch, F., Cuzon, G., Deplano, A., Delaire, T., Huang, T.D., Lissior, B., Nordmann, P., Glupczynski, Y. 2010. GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54** (11): 4872-4878.
- Bonnin, R.A., Nordmann, P., Potron, A., Lecuyer, H., Zahar, J.R., Poirel, L. 2011. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55** (1): 349-354.

- Bonnin, R.A., Poirel, L., Nordmann, P. 2014. New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*: a novel paradigm for spreading antibiotic resistance genes. *Future Microbiol.* **9** (1): 33-41.
- Bontron, S., Nordmann, P., Poirel, L. 2016. Transposition of Tn125 encoding the NDM-1 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60** (12): 7245-7251.
- Bore, E., Hebraud, M., Chafsey, I., Chambon, C., Skjæret, C., Moen, B., Møretrø, T., Langsrud, Ø., Rudi, K., Langsrud, S. 2007. Adapted tolerance to benzalkonium chloride in *Escherichia coli* K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. *Microbiology* **153** (4): 935-946.
- Bou, G., Cerveró, G., Dominguez, M.A., Quereda, C., Martínez-Beltrán, J. 2000. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases. *J. Clin. Microbiol.* **38** (9): 3299-3305.
- Bou, G., Otero, F.M., Santiso, R., Tamayo, M., del Carmen Fernández, M., Tomás, M., Gosálvez, J., Fernández, J.L. 2012. Fast assessment of resistance to carbapenems and ciprofloxacin of clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **50** (11): 3609-3613.
- Briers, Y., Walmagh, M., Van Puyenbroeck, V., Cornelissen, A., Cenens, W., Aertsen, A., Oliveira, H., Azeredo, J., Verween, G., Pirnay, J.P., Miller, S. 2014. Engineered endolysin-based “Artilysins” to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. *MBio* **5** (4): e01379-14.
- Bulens, S.N., Yi, S.H., Walters, M.S., Jacob, J.T., Bower, C., Reno, J., Wilson, L., Vaeth, E., Bamberg, W., Janelle, S.J., Lynfield, R. 2018. Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii*, 8 US Metropolitan Areas, 2012–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **24** (4): 727.

- Bush, K., Jacoby, G.A. 2010. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54** (3): 969-976.
- Cabral, M.P., Soares, N.C., Aranda, J., Parreira, J.R., Rumbo, C., Poza, M., Valle, J., Calamia, V., Lasa, Í., Bou, G. 2011. Proteomic and functional analyses reveal a unique lifestyle for *Acinetobacter baumannii* biofilms and a key role for histidine metabolism. *J. Proteome Res.* **10** (8): 3399-3417.
- Catel-Ferreira, M., Coadou, G., Molle, V., Mugnier, P., Nordmann, P., Siroy, A., Jouenne, T., Dé, E. 2011. Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **66** (9): 2053-2056.
- Catel-Ferreira, M., Nehmé, R., Molle, V., Aranda, J., Bouffartigues, E., Chevalier, S., Bou, G., Jouenne, T., Dé, E. 2012. Deciphering the function of the outer membrane protein OprD homologue of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56** (7): 3826-3832.
- Chen, W. 2015. Current advances and challenges in the development of *Acinetobacter* vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* **11** (10): 2495-2500.
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G., Orange, N., Dufour, A., Cornelis, P. 2017. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol. Rev.* **41** (5): 698-722.
- Chiang, M.H., Sung, W.C., Lien, S.P., Chen, Y.Z., Lo, A.F.Y., Huang, J.H., Kuo, S.C., Chong, P. 2015. Identification of novel vaccine candidates against *Acinetobacter baumannii* using reverse vaccinology. *Hum. Vaccin. Immunother.* **11** (4): 1065-1073.
- Chihi, H., Bonnin, R.A., Bourouis, A., Mahrouki, S., Besbes, S., Moussa, M.B., Belhadj, O., Naas, T. 2016. GES-11-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Tunisian hospitals: long-term dissemination of GES-type carbapenemases in North Africa. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **5**: 47-50.

- Choi, Y., Chan, A.P. 2015. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* **31** (16): 2745-2747.
- Clark, R.B. 1996. Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane protein. *J. Antimicrob. Chemother.* **38** (2): 245-251.
- Clemmer, K.M., Bonomo, R.A., Rather, P.N. 2011. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology* **157** (9): 2534-2544.
- CLSI 2010. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Eighth Edition. CLSI document M07-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cosgaya, C., Marí-Almirall, M., Van Assche, A., Fernández-Orth, D., Mosqueda, N., Telli, M., Huys, G., Higgins, P.G., Seifert, H., Lievens, B., Roca, I. 2016. *Acinetobacter dijkschoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66** (10): 4105-4111.
- Costa, S.F., Woodcock, J., Gill, M., Wise, R., Barone, A.A., Caiaffa, H., Levin, A.S.S. 2000. Outer-membrane proteins pattern and detection of β -lactamases in clinical isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil. *Int. J. Antimicrob. Agents* **13** (3): 175-182.
- Coyne, S., Rosenfeld, N., Lambert, T., Courvalin, P., Péricchon, B. 2010. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54** (10): 4389-4393.
- Cray, J.A., Bell, A.N., Bhaganna, P., Mswaka, A.Y., Timson, D.J., Hallsworth, J.E. 2013. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? *Microb. Biotechnol.* **6** (5): 453-492.
- Davies, J., Spiegelman, G.B., Yim, G. 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* **9** (5): 445-453.

- Defraigne, V., Schuermans, J., Grymonprez, B., Govers, S.K., Aertsen, A., Fauvart, M., Michiels, J., Lavigne, R., Briers, Y. 2016. Efficacy of artilysin Art-175 against resistant and persistent *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60** (6): 3480-3488.
- Dehbalaei, M.A., Najar-Peerayeh, S., Taherikalani, M., Behmanesh, M. 2017. Clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Tehran hospitals: Pulsed-field Gel Electrophoresis characterization, clonal lineages, antibiotic susceptibility, and biofilm-forming ability. *Jundishapur J. Microbiol.* **10** (7).
- del Mar Tomás, M., Beceiro, A., Pérez, A., Velasco, D., Moure, R., Villanueva, R., Martínez-Beltrán, J., Bou, G. 2005. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33-to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49** (12): 5172-5175.
- Delany, I., Rappuoli, R., De Gregorio, E. 2014. Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol. Med.* **6** (6): 708-720.
- Demain, A.L., Elander, R.P. 1999. The β -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek* **75** (1-2): 5-19.
- Deng, M., Zhu, M.H., Li, J.J., Bi, S., Sheng, Z.K., Hu, F.S., Zhang, J.J., Chen, W., Xue, X.W., Sheng, J.F., Li, L.J. 2014. Molecular epidemiology and mechanisms of tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Chinese university hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58** (1): 297-303.
- Dexter, C., Murray, G.L., Paulsen, I.T., Peleg, A.Y. 2015. Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **13** (5): 567-573.
- Dhabaan, G.N., AbuBakar, S., Cerqueira, G.M., Al-Haroni, M., Pang, S.P., Hassan, H. 2016. Imipenem treatment induces expression of important genes and phenotypes in a resistant *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60** (3): 1370-1376.

- Dortet, L., Bonnin, R.A., Bernabeu, S., Escaut, L., Vittecoq, D., Girlich, D., Imanci, D., Fortineau, N., Naas, T. 2016. First occurrence of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Serbia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60** (10): 5724-5730.
- Dupont, M., Pagès, J.M., Lafitte, D., Siroy, A., Bollet, C. 2005. Identification of an OprD Homologue in *Acinetobacter baumannii*. *J. Proteome Res.* **4** (6): 2386-2390.
- Eijkelpamp, B.A., Hassan, K.A., Paulsen, I.T., Brown, M.H. 2011. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics* **12** (1): 126.
- Elsherif, R., Ismail, D., Elawady, S., Jastaniah, S., Al-Masaudi, S., Harakeh, S., Karrouf, G. 2016. Boronic acid disk diffusion for the phenotypic detection of polymerase chain reaction-confirmed, carbapenem-resistant, gram-negative bacilli isolates. *BMC Microbiol.* **16** (1): 135.
- Essack, S.Y. 2001. The development of β -lactam antibiotics in response to the evolution of β -lactamases. *Pharm. Res.* **18** (10): 1391-1399.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017.
- Fajardo Bonin, R., Chapeaurouge, A., Perales, J., Silva, J.G., do Nascimento, H.J., D'Alincourt Carvalho Assef, A.P., Senna, M., Procópio, J. 2014. Identification of immunogenic proteins of the bacterium *Acinetobacter baumannii* using a proteomic approach. *Proteomics Clin. Appl.* **8** (11-12): 916-923.
- Fattahian, Y., Rasooli, I., Gargari, S.L.M., Rahbar, M.R., Astaneh, S.D.A., Amani, J. 2011. Protection against *Acinetobacter baumannii* infection via its functional deprivation of biofilm associated protein (Bap). *Microb. Pathog.* **51** (6): 402-406.
- Fernández, L., Hancock, R.E. 2012. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **25** (4): 661-681.

- 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*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51** (3): 565-574.
- Fernández-Cuenca, F., Smani, Y., Gómez-Sánchez, M.C., Docobo-Pérez, F., Caballero-Moyano, F.J., Domínguez-Herrera, J., Pascual, A., Pachón, J. 2011. Attenuated virulence of a slow-growing pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* is associated with decreased expression of genes encoding the porins CarO and OprD-like. *Int. J. Antimicrob. Agents* **38** (6): 548-549.
- Fernando, D., Kumar, A. 2011. Growth phase-dependent expression of RND efflux pump-and outer membrane porin-encoding genes in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. *J. Antimicrob. Chemother.* **67** (3): 569-572.
- Fournier, P.E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, K., Mangenot, S., Abergel, C., Nordmann, P., Weissenbach, J., Raoult, D., Claverie, J.M. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* **2** (1): e7.
- Franolic-Kukina, I., Bedenic, B., Budimir, A., Herljevic, Z., Vranes, J., Higgins, P.G. 2011. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-72-positive *Acinetobacter baumannii* in a Croatian university hospital. *Int. J. Infect. Dis.* **15** (10): e706-e709.
- Gallego, L. 2010. Analysis of plasmids as genetic support of the class D carbapenemase OXA-40 in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Hospital* **1** (2): 5.
- García-Quintanilla, M., Pulido, M.R., López-Rojas, R., Pachón, J., McConnell, M.J. 2013. Emerging therapies for multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Trends Microbiol.* **21** (3): 157-163.
- García-Quintanilla, M., Pulido, M.R., Pachón, J., McConnell, M.J. 2014. Immunization with lipopolysaccharide-deficient whole cells provides protective immunity in an experimental mouse model of *Acinetobacter baumannii* infection. *PLoS One* **9** (12): e114410.

- Garg, N., Singh, R., Shukla, G., Capalash, N., Sharma, P. 2016. Immunoprotective potential of *in silico* predicted *Acinetobacter baumannii* outer membrane nuclease, NucAb. *Int. J. Med. Microbiol.* **306** (1): 1-9.
- Gehrlein, M., Leying, H., Cullmann, W., Wendt, S., Opferkuch, W. 1991. Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy* **37** (6): 405-412.
- Georgescu, M., Gheorghe, I., Dudu, A., Czobor, I., Costache, M., Cristea, V.C., Lazăr, V., Chifiriuc, M.C. 2016. First report of OXA-72 producing *Acinetobacter baumannii* in Romania. *New Microbes New Infect.* **13**: 87-88.
- Ghai, I., Ghai, S. 2018. Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infect. Drug Resist.* **11**: 523.
- Giammanco, A., Calà, C., Fasciana, T., Dowzicky, M.J. 2017. Global assessment of the activity of tigecycline against multidrug-resistant Gram-negative pathogens between 2004 and 2014 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *mSphere* **2** (1): e00310-16.
- Gil Marqués, M.L., Smani, Y., Pachon-Diaz, J., Pachon-Ibáñez, M.E. 2017. *In vivo* effect of hypoxia on infections caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in different murine models. 27th ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases), Vienna, Austria, April 22nd-25th, poster, book of abstracts, P0536.
- Goic-Barisic, I., Towner, K.J., Kovacic, A., Sisko-Kraljevic, K., Tonkic, M., Novak, A., Punda-Polic, V. 2011. Outbreak in Croatia caused by a new carbapenem-resistant clone of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-72 carbapenemase. *J. Hosp. Infect.* **77** (4): 368-369.
- Gomez, J.E., McKinney, J.D. 2004. *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis* **84** (1): 29-44.

- Gordon, N.C., Wareham, D.W. 2010. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35** (3): 219-226.
- Hamidian, M., Hall, R.M. 2011. AbaR4 replaces AbaR3 in a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate belonging to global clone 1 from an Australian hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **66** (11): 2484-2491.
- Hamidian, M., Hall, R.M. 2013. Tn6168, a transposon carrying an IS*AbaI*-activated *ampC* gene and conferring cephalosporin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **69** (1): 77-80.
- Harding, C.M., Hennon, S.W., Feldman, M.F. 2018. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat. Rev. Microbiol.* **16** (2): 91.
- He, C., Xie, Y., Fan, H., Kang, M., Tao, C., Zhang, R., Hu, Y., Chen, Z., Wang, L. 2011. Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* of European clone II in Western China. *Int. J. Antimicrob. Agents* **38** (3): 257-260.
- Higgins, P.G., Dammhayn, C., Hackel, M., Seifert, H. 2009a. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **65** (2): 233-238.
- Higgins, P.G., Poirel, L., Lehmann, M., Nordmann, P., Seifert, H. 2009b. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53** (12): 5035-5038.
- Higgins, P.G., Lehmann, M., Seifert, H. 2010. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35** (3): 305.
- Higgins, P.G., Pérez-Llarena, F.J., Zander, E., Fernández, A., Bou, G., Seifert, H. 2013. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57** (5): 2121-2126.
- Hood, M.I., Jacobs, A.C., Sayood, K., Dunman, P.M., Skaar, E.P. 2010. *Acinetobacter baumannii* increases tolerance to antibiotics in response to monovalent cations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54** (3): 1029-1041.

- Hou, P.F., Chen, X.Y., Yan, G.F., Wang, Y.P., Ying, C.M. 2012. Study of the correlation of imipenem resistance with efflux pumps AdeABC, AdeIJK, AdeDE and AbeM in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy* **58** (2): 152-158.
- Hua, X., Chen, Q., Li, X., Yu, Y. 2014. Global transcriptional response of *Acinetobacter baumannii* to a subinhibitory concentration of tigecycline. *Int. J. Antimicrob. Agents* **44** (4): 337-344.
- Huang, W., Wang, S., Yao, Y., Xia, Y., Yang, X., Long, Q., Sun, W., Liu, C., Li, Y., Ma, Y. 2015. OmpW is a potential target for eliciting protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infections. *Vaccine* **33** (36): 4479-4485.
- Huang, W., Yao, Y., Wang, S., Xia, Y., Yang, X., Long, Q., Sun, W., Liu, C., Li, Y., Chu, X., Bai, H. 2016. Immunization with a 22-kDa outer membrane protein elicits protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci. Rep.* **6**: 20724.
- Jeong, S., Hong, J.S., Kim, J.O., Kim, K.H., Lee, W., Bae, I.K., Lee, K., Jeong, S.H. 2016. Identification of *Acinetobacter* species using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Ann. Lab. Med.* **36** (4): 325-334.
- Jetter, M., Spaniol, V., Troller, R., Aebi, C. 2010. Down-regulation of porin M35 in *Moraxella catarrhalis* by aminopenicillins and environmental factors and its potential contribution to the mechanism of resistance to aminopenicillins. *J. Antimicrob. Chemother.* **65** (10): 2089-2096.
- Jin, J.S., Kwon, S.O., Moon, D.C., Gurung, M., Lee, J.H., Kim, S.I., Lee, J.C. 2011. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PLoS One*, **6** (2): e17027.
- Jovcic, B., Begovic, J., Lozo, J., Topisirovic, L., Kojic, M. 2009. Dynamics of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Arch. Biol. Sci.* **61** (2): 159-164.
- Kahan, J.S., Kahan, F.M., Goegelman, R., Currie, S.A., Jackson, M., Stapley, E.O., Miller, T.W., Miller, A.K., Hendin, D., Mochales, S., Hernandez, S., Woodruff, H.B., Birnbaum, J.

1979. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J. Antibiot.* **32** (1): 1-12.
- Karampatakis, T., Antachopoulos, C., Tsakris, A., Roilides, E. 2017. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Greece: an extended review (2000-2015). *Future Microbiol.* **12** (9): 801-815.
- Kempf, M., Rolain, J.M. 2012. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int. J. Antimicrob. Agents* **39** (2): 105-114.
- Kim, Y.J., Kim, S.I., Kim, Y.R., Hong, K.W., Wie, S.H., Park, Y.J., Jeong, H., Kang, M.W. 2012. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: diversity of resistant mechanisms and risk factors for infection. *Epidemiol. Infect.* **140** (1): 137-145.
- Kimme, J.M., Stallings, C.L. 2016. Bacterial pathogens versus autophagy: implications for therapeutic interventions. *Trends Mol. Med.* **22** (12): 1060-1076.
- Kishii, K., Kikuchi, K., Tomida, J., Kawamura, Y., Yoshida, A., Okuzumi, K., Moriya, K. 2016. The first cases of human bacteremia caused by *Acinetobacter seifertii* in Japan. *J. Infect. Chemother.* **22**: 342-345.
- Koebnik, R., Locher, K.P., Van Gelder, P. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **37** (2): 239-253.
- Kojic, M., Strahinic, I., Topisirovic, L. 2005. Proteinase PI and lactococcin A genes are located on the largest plasmid in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. diacetylactis S50. *Can. J. Microbiol.* **51** (4): 305-314.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**: 1870-1874.
- Kwon, S.O., Gho, Y.S., Lee, J.C., Kim, S.I. 2009. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* **297** (2): 150-156.

- Lee, C.R., Cho, I.H., Jeong, B.C., Lee, S.H. 2013. Strategies to minimize antibiotic resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **10** (9): 4274-4305.
- Lee, C.R., Lee, J.H., Park, M., Park, K.S., Bae, I.K., Kim, Y.B., Cha, C.J., Jeong, B.C., Lee, S.H. 2017. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**: 55.
- Lee, Y., Kim, C.K., Lee, H., Jeong, S.H., Yong, D., Lee, K. 2011. A novel insertion sequence, IS*Aba10*, inserted into IS*Aba1* adjacent to the *bla*_{OXA-23} gene and disrupting the outer membrane protein gene *carO* in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55** (1): 361-363.
- Letunic, I., Bork, P. 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* **44** (W1): W242-W245.
- Li, W., Joshi, M.D., Singhania, S., Ramsey, K.H., Murthy, A.K. 2014. Peptide vaccine: progress and challenges. *Vaccines* **2** (3): 515-536.
- Limansky, A.S., Mussi, M.A., Viale, A.M. 2002. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J. Clin. Microbiol.* **40** (12): 4776-4778.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* **25** (4): 402-408.
- Llarrull, L.I., Testero, S.A., Fisher, J.F., Mobashery, S. 2010. The future of the β -lactams. *Curr. Opin. Microbiol.* **13** (5): 551-557.
- Lu, P.L., Doumith, M., Livermore, D.M., Chen, T.P., Woodford, N. 2009. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J. Antimicrob. Chemother.* **63** (4): 641-647.
- Luo, G., Lin, L., Ibrahim, A.S., Baquir, B., Pantapalangkoor, P., Bonomo, R.A., Doi, Y., Adams, M.D., Russo, T.A., Spellberg, B. 2012. Active and passive immunization protects against

- lethal, extreme drug resistant-*Acinetobacter baumannii* infection. *PLoS One* **7** (1): e29446.
- Marck, C. 1988. 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res.* **16** (5): 1829-1836.
- Marteyn, B., West, N.P., Browning, D.F., Cole, J.A., Shaw, J.G., Palm, F., Mounier, J., Prévost, M.C., Sansonetti, P., Tang, C.M. 2010. Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen *in vivo*. *Nature* **465** (7296): 355.
- McConnell, M.J., Pachón, J. 2010. Active and passive immunization against *Acinetobacter baumannii* using an inactivated whole cell vaccine. *Vaccine* **29** (1): 1-5.
- McConnell, M.J., Domínguez-Herrera, J., Smani, Y., López-Rojas, R., Docobo-Pérez, F., Pachón, J. 2011a. Vaccination with outer membrane complexes elicits rapid protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infect. Immun.* **79** (1): 518-526.
- McConnell, M.J., Rumbo, C., Bou, G., Pachón, J. 2011b. Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Acinetobacter baumannii*. *Vaccine* **29** (34): 5705-5710.
- McConnell, M.J., Actis, L., Pachón, J. 2013. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol. Rev.* **37** (2): 130-155.
- Meletis, G. 2016. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther. Adv. Infect. Dis.* **3** (1): 15-21.
- Méndez, J.A., Mateos, J., Beceiro, A., Lopez, M., Tomás, M., Poza, M., Bou, G. 2015. Quantitative proteomic analysis of host-pathogen interactions: a study of *Acinetobacter baumannii* responses to host airways. *BMC Genomics* **16** (1): 422.
- Mihu, M.R., Martinez, L.R. 2011. Novel therapies for treatment of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* skin infections. *Virulence* **2** (2): 97-102.

- Minandri, F., D'Arezzo, S., Antunes, L.C., Pourcel, C., Principe, L., Petrosillo, N., Visca, P. 2012. Evidence of diversity among epidemiologically related carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* strains belonging to international clonal lineage II. *J. Clin. Microbiol.* **50** (3): 590-597.
- Morán-Barrio, J., Cameranesi, M.M., Relling, V., Limansky, A.S., Brambilla, L., Viale, A.M. 2017. The *Acinetobacter* outer membrane contains multiple specific channels for carbapenem β -lactams as revealed by kinetic characterization analyses of imipenem permeation into *Acinetobacter baylyi* cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61** (3): e01737-16.
- Moriel, D.G., Beatson, S.A., Wurpel, D.J., Lipman, J., Nimmo, G.R., Paterson, D.L., Schembri, M.A. 2013. Identification of novel vaccine candidates against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* **8** (10): e77631.
- Mussi, M.A., Limansky, A.S., Viale, A.M. 2005. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of β -barrel outer membrane proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49** (4): 1432-1440.
- Mussi, M.A., Relling, V.M., Limansky, A.S., Viale, A.M. 2007. CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for L-ornithine uptake. *FEBS Lett.* **581** (29): 5573-5578.
- Mussi, M.A., Limansky, A.S., Relling, V., Ravasi, P., Arakaki, A., Actis, L.A., Viale, A.M. 2011. Horizontal gene transfer/assortative recombination within the *Acinetobacter baumannii* clinical population provides genetic diversity at the single *carO* gene encoding a major outer membrane protein channel. *J. Bacteriol.* JB-01533.
- Nakae, T. 1976. Identification of the outer membrane protein of *E. coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **71** (3): 877-884.
- Neonakis, I.K., Spandidos, D.A., Petinaki, E. 2011. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. *Int. J. Antimicrob. Agents* **37** (2): 102-109.

- Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67** (4): 593-656.
- Novovic, K., Mihajlovic, S., Vasiljevic, Z., Filipic, B., Begovic, J., Jovicic, B. 2015. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: revision of CarO classification. *PLoS One* **10** (3): e0122793.
- Novovic, K., Vasiljevic, Z., Kuzmanovic, M., Lozo, J., Begovic, J., Kojic, M., Jovicic, B. 2016. Novel *E. coli* ST5123 containing *bla*_{NDM-1} carried by IncF plasmid isolated from a pediatric patient in Serbia. *Microb. Drug Resist.* **22** (8): 707-711.
- Nucleo, E., Steffanoni, L., Fugazza, G., Migliavacca, R., Giacobone, E., Navarra, A., Pagani, L., Landini, P. 2009. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol.* **9** (1): 270.
- Nwugo, C.C., Gaddy, J.A., Zimble, D.L., Actis, L.A. 2011. Deciphering the iron response in *Acinetobacter baumannii*: a proteomics approach. *J. Proteom.* **74** (1): 44-58.
- Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A. 2011. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55** (11): 4943-4960.
- Paton, R., Miles, R.S., Hood, J., Amyes, S.G.B. 1993. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2** (2): 81-87.
- Patronov, A., Doytchinova, I. 2013. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biol.* **3** (1): 120139.
- Peng, C., Zong, Z., Fan, H. 2012. *Acinetobacter baumannii* isolates associated with community-acquired pneumonia in West China. *Clin. Microbiol. Infect.* **18** (12): E491-E493.
- Pfeifer, Y., Wilharm, G., Zander, E., Wichelhaus, T.A., Göttig, S., Hunfeld, K.P., Seifert, H., Witte, W., Higgins, P.G. 2011. Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J. Antimicrob. Chemother.* **66** (9): 1998-2001.

- Piddock, L.J. 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **19** (2): 382-402.
- Pitout, J.D., Gregson, D.B., Poirel, L., McClure, J.A., Le, P., Church, D.L. 2005. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamases in a large centralized laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **43** (7): 3129-3135.
- Poirel, L., Nordmann, P. 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **12** (9): 826-836.
- Poirel, L., Bonnin, R.A., Nordmann, P. 2011. Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. *IUBMB life* **63** (12): 1061-1067.
- Quale, J., Bratu, S., Landman, D., Heddurshetti, R. 2003. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin. Infect. Dis.* **37** (2): 214-220.
- Queenan, A.M., Bush, K. 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **20** (3): 440-458.
- Qureshi, Z.A., Hittle, L.E., O'hara, J.A., Rivera, J.I., Syed, A., Shields, R.K., Pasculle, A.W., Ernst, R.K., Doi, Y. 2015. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. *Clin. Infect. Dis.* **60** (9): 1295-1303.
- Revathi, G., Siu, L.K., Lu, P.L., Huang, L.Y. 2013. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in East Africa. *Int. J. Infect. Dis.* **17** (12): e1255-e1258.
- Robledo, I.E., Aquino, E.E., Santé, M.I., Santana, J.L., Otero, D.M., León, C.F., Vázquez, G.J. 2010. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54** (3): 1354-1357.
- Roca Subirà, I., Espinal, P., Vila-Farrés, X., Vila Estapé, J. 2012. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front. Microbiol.* **3**: 148.

- Rumbo, C., Tomás, M., Moreira, E.F., Soares, N.C., Carvajal, M., Santillana, E., Beceiro, A., Romero, A., Bou, G. 2014. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect. Immun.* **82** (11): 4666-4680.
- Russo, T.A., Beanan, J.M., Olson, R., MacDonald, U., Cox, A.D., Michael, F.S., Vinogradov, E.V., Spellberg, B., Luke-Marshall, N.R., Campagnari, A.A. 2013. The K1 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* is a potential therapeutic target via passive immunization. *Infect. Immun.* **81** (3): 915-922.
- Rustad, T.R., Sherrid, A.M., Minch, K.J., Sherman, D.R. 2009. Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. *Cell. Microbiol.* **11** (8): 1151-1159.
- Ruzin, A., Keeney, D., Bradford, P.A. 2007. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J. Antimicrob. Chemother.* **59** (5): 1001-1004.
- Sánchez, M.B. 2015. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front. Microbiol.* **6**: 658.
- Santajit, S., Indrawattana, N. 2016. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res. Int.* 2016.
- Sarikhani, Z., Nazari, R., Rostami, M.N. 2017. First report of OXA-143-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* in Qom, Iran. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **20** (11): 1282.
- Schaffer, K., Taylor, C.T. 2015. The impact of hypoxia on bacterial infection. *FEBS J.* **282** (12): 2260-2266.
- Schaible, B., Taylor, C.T., Schaffer, K. 2012. Hypoxia increases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* through altering the composition of multidrug efflux pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56** (4): 2114-2118.
- Shannon, C.E. 1948. A Mathematical Theory of Communication. *Bell Syst. Tech. J.* **27**: 379-423; 623-656.

- Singh, R., Garg, N., Shukla, G., Capalash, N., Sharma, P. 2016. Immunoprotective efficacy of *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein, FilF, predicted *in silico* as a potential vaccine candidate. *Front. Microbiol.* **7**: 158.
- Siroy, A., Molle, V., Lemaître-Guillier, C., Vallenet, D., Pestel-Caron, M., Cozzone, A.J., Jouenne, T., Dé, E. 2005. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49** (12): 4876-4883.
- Skwarczynski, M., Toth, I. 2016. Peptide-based synthetic vaccines. *Chem. Sci.* **7** (2): 842-854.
- Smani, Y., McConnell, M.J., Pachón, J. 2012. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *PLoS One* **7** (4): e33073.
- Smani, Y., Dominguez-Herrera, J., Pachón, J. 2013. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *J. Infect. Dis.* **208** (10): 1561-1570.
- Smani, Y., Fàbrega, A., Roca, I., Sánchez-Encinales, V., Vila, J., Pachón, J. 2014. Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58** (3): 1806-1808.
- Soares, N.C., Cabral, M.P., Gayoso, C., Mallo, S., Rodriguez-Velo, P., Fernández-Moreira, E., Bou, G. 2010. Associating growth-phase-related changes in the proteome of *Acinetobacter baumannii* with increased resistance to oxidative stress. *J. Proteome Res.* **9** (4): 1951-1964.
- Sugawara, E., Nikaido, H. 2012. OmpA is the principal nonspecific slow porin of *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* **194** (15): 4089-4096.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30** (12): 2725-2729.
- Tavío, M.M., Vila, J., Perilli, M., Casañas, L.T., Maciá, L., Amicosante, G., de Anta, M.T.J. 2004. Enhanced active efflux, repression of porin synthesis and development of Mar

- phenotype by diazepam in two enterobacteria strains. *J. Med. Microbiol.* **53** (11): 1119-1122.
- Teo, J., Ngan, G., Balm, M., Jureen, R., Krishnan, P., Lin, R. 2012. Molecular characterization of NDM-1 producing *Enterobacteriaceae* isolates in Singapore hospitals. *Western Pac. Surveill. Response J.* **3** (1): 19.
- Thawal, N.D., Yele, A.B., Sahu, P.K., Chopade, B.A. 2012. Effect of a novel podophage AB7-IBB2 on *Acinetobacter baumannii* biofilm. *Curr. Microbiol.* **65** (1): 66-72.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22** (22): 4673-4680.
- Todorova, B., Velinov, T., Ivanov, I., Dobрева, E., Kantardjiev, T. 2014. First detection of OXA-24 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Bulgaria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30** (4): 1427-1430.
- Topisirović, Lj., Jovčić, B. 2013. Antibiotici: molekularni mehanizmi delovanja i rezistencije. Beograd: Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Turton, J.F., Gabriel, S.N., Valderrey, C., Kaufmann, M.E., Pitt, T.L. 2007. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* **13** (8): 807-815.
- Visca, P., Seifert, H., Towner, K. J. 2011. *Acinetobacter* infection-an emerging threat to human health. *IUBMB Life* **63** (12): 1048-1054.
- Vranic-Ladavac, M., Bedenic, B., Minandri, F., Istok, M., Bosnjak, Z., Francula-Zaninovic, S., Ladavac, R., Visca, P. 2014. Carbapenem resistance and acquired class D beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Croatia 2009-2010. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33** (3): 471-478.
- Walker, C.B. 1996. Selected antimicrobial agents: mechanisms of action, side effects and drug interactions. *Periodontol. 2000* **10** (1): 12-28.

- WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017. Available from: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf
- Wilke, M.S., Lovering, A.L., Strynadka, N.C. 2005. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 525-533.
- Wolter, D.J., Khalaf, N., Robledo, I.E., Vázquez, G.J., Santé, M.I., Aquino, E.E., Goering, R.V., Hanson, N.D. 2009. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53** (4): 1660-1664.
- Wong, D., Nielsen, T.B., Bonomo, R.A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., Spellberg, B. 2017. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* **30** (1): 409-447.
- Woodford, N., Ellington, M.J., Coelho, J.M., Turton, J.F., Ward, M.E., Brown, S., Amyes, S.G., Livermore, D.M. 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* **27** (4): 351-353.
- Yele, A.B., Thawal, N.D., Sahu, P.K., Chopade, B.A. 2012. Novel lytic bacteriophage AB7-IBB1 of *Acinetobacter baumannii*: isolation, characterization and its effect on biofilm. *Arch. Virol.* **157** (8): 1441-1450.
- Yun, S.H., Choi, C.W., Park, S.H., Lee, J.C., Leem, S.H., Choi, J.S., Kim, S., Kim, S.I. 2008. Proteomic analysis of outer membrane proteins from *Acinetobacter baumannii* DU202 in tetracycline stress condition. *J. Microbiol.* **46** (6): 720-727.
- Zander, E., Bonnin, R.A., Seifert, H., Higgins, P.G. 2014. Characterization of *bla*_{OXA-143} variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58** (5): 2704-2708.
- Zarrilli, R., Pournaras, S., Giannouli, M., Tsakris, A. 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int. J. Antimicrob. Agents* **41** (1): 11-19.

- Zeana, C., Larson, E., Sahni, J., Bayuga, S.J., Wu, F., Della-Latta, P. 2003. The epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* does the community represent a reservoir? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **24** (4): 275-279.
- Zeka, A.N., Poirel, L., Sipahi, O.R., Bonnin, R.A., Arda, B., Özinel, M., Ulusoy, S., Bor, C., Nordmann, P. 2014. GES-type and OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. *J. Antimicrob. Chemother.* **69** (4): 1145-1146.
- Zhanel, G.G., Wiebe, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D.J., Noreddin, A.M., Karlowsky, J.A. 2007. Comparative review of the carbapenems. *Drugs* **67** (7): 1027-1052.

8. Prilozi

Prilog 1.

Nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK izolata 813:

TGGAATTTCTTGAGCTTAAAACATGCGTAGGCGGTTTATTAAGTTGGATGTGAGATC
CCCGAGTTTAACTTGGGAATTGCATTCGAGCTGGTGAGCTAGAGTATGGGAGAGAT
GGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGGAATACCGATG
GCGAAGGCAGCCATCTGGCCTTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAAGCATGGGGAG
CAAACAGGATTTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTT
GGGGCCTTTTGGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGA
GTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATACTAG
AAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCCTTCGGGAATCTAGATACAGGTGCTGCATGGC
TGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
TTCCTTACTTGCCAGCATTTCGGATGGGAACTTTAAGGATACTGCCAGTGACAAACT
GGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCAA
AAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATG
CTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
GCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTAGCTAGCCTAACTGCAAAGA
GGGCGGTTACCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCGAAGCATTGAGTGCAT
CGTCCTC

Prilog 2.

Nukleotidna sekvenca gena za CarO porin soja 813:

ATGAAAGTATTACGTGTTTTAGTGACAACTACAGCTTTACTTGCTGCTGGTGCCGCA
ATGGCAGATGAAGCTGTCGTTTCATGACAGCTATGCATTTGACCAAAAACAATTACTT
CCTGTAGGGGTGCGTGCTGAGGTAGGTACAACCTGGTTACGGTGGTGCTTTATTATGG
CAAGCCAACCCATATGTAGGTTTGGCTCTGGGTTATAACGGCGGTGACATTTTCGTGG
ACAGATGACGTCTCTGTAAATGGTACTAAATATGACCTAGATATGGATAACAATAAT
ATTTATCTAAATGCTGAAATACGTCCTTGGGGCGCTAGTTCTAATCCATGGGCTCAA
GGCTTATATGTAGCTGCGGGTGCTGCTTATTTAGATAATGATTATGACTTAGCTAAA
CGTATTGGTAATGGCGAAACATTATCAATTGATGGTAAAAACTATCAACAAGCAGTT
GCTGGCCAAGAAGGTGGTGTAAAGAGGTAAGATGAATTATGAAAATAATATCGCCCC
TTATGTAGGTTTTGGTTTTGCACCGAAATTTAATAAAAATTGGGGTGTATTTGGTGA

AGTAGGTGCTTACTATACAGGTAATCCAAAAGTTCAGTTAACTCAATATAATCTTGC
TCCTGTGAATGGTAACCCAACGTCTGCTCAAGATGCAGTAGATAAGGAAGAAAATG
AAATTCGTAATGACGATAAATACAAATGGTTACCAGTTGGTAAGGTTGGTGTGAACT
TCTACTGG

Prilog 3.

Nukleotidna sekvenca prvog tipa *omp33-36* alela:

ATGAAAAAACTTGGTTTAGCCACTGCTGTATTATTAGCCATGACCGGTGCTCATGCT
TATCAATTTGAAGTTCAAGGTCAATCTGAATATGTTGACACAACCTGCAAATGATAAA
AACTTCACTGGTGACGTTGCTGGTACATTCTATTTGAAAAATGTTGATACAGCTAAG
GGTCCTTTAGCTGAAGCAGCTTTCTTAAACCAAGCTTCTAGCGTGTCTTTAGGTTATA
GCTATCAACAATATGACCAAAAACAACGTAAACTACCACATTGGTACATACGGTGTTA
AAGGTGAGGCATACGTTCCAACCTTACCTTCCTGTATATGCTAGCGCAACTTACA
ACCACACTGATGTTGATGGTAAAAACAACCTTCTCTAAAGATGACAACGGTGACCGTT
ATGCATTAGAAGTTGGTGCTATGTTGTTACCTAACTTCTTAATGACTGTTGGTTATAC
AAGTGTGCTAACCAATTCGCTTTAGATAACTTCGGTATCATCGGTAACGGTATCTA
CTCTGCTGTTAACCAAACTGCTGCTATCCAAAACGACCAAGATGCTGTTACAGCACG
TGCTAAATATGTTGGTCCAATCGATGGAACATAACATGGCAATCGGTTTTGAAGCTGC
TGGTGCATTCGGTCAAGAAAACCAATACGGTTTTAAAACTGACCTTTACTTAACTCC
TAAGTTAAGTGTGGCGCTACTTTCGTTGGTAACGATGGCGAAGCTGACATCAAAGG
TAATGACCTTGGTGAATTCGCCAAGCTTGGGGTGGTAACGTAAACTACTTCATCAC
TCCTGCTTTAGCAGTTGGTGCATCTTACATGAAAGCTGACGTTAAAAAGTCTAGCTA
CGATACACAACTATCGGCTTAAATGCTAAATTCCGTTTCT

Nukleotidna sekvenca drugog tipa *omp33-36* alela:

ATGAAAAAACTTGGTTTAGCCACTGCTGTATTATTAGCCATGACCGGTGCTCATGCT
TATCAATTTGAAGTTCAAGGTCAATCTGAATATGTTGACACAACCTGCAAATGATAAA
AACTTCACTGGTACTGCTCAAGGTACTTATTACTTCAAAAATGTTGATGCATCTAAA
GGTCCTTTAGCTGAAGCAGCTTTCTTAAACCAAGCATCTAACGTTTCTGTTGCTTATA
ACTATATCAAATATGATGAGAAAGACACTGTAAATGTTGAATCTCATACTTATGGTG
TTAAAGGTGAAGCATACCTTCCAACCTTACTTACCAGTTTATGCTAGCGCATCTTA
TAACCACACTATCAATGATTTTAAAGATGGCGTGAGCGATGACAACGGTGACCGTTA
TGCATTAGAAGCTGGTGCAATGTTGTTACCTAACTTCTTAGTTGCAGTTGGTTATACA
AGCGTTGCTGATCAAATTTCTTTAGATGCGTTCGGTGTTAACAATAACGGAATCGCT
AAAGCAGTTGGTGAATCAGTTGCTATTGATGAAAAACAAGATGCTGTAACCTGCTCGT
ACTAAATATGTTGGCAACATCGATGGCACTAACATGGCTATTGGTTTTGAAGCATT
GGTGTATTTGCTGAAGACAACGCTTACGGTATGAAAACCTGACCTTTTCGTAACCTCCT
AAGTTAAGTGTGGTGCATCTTTTGC GGATGTGTCTGCATTTAATTCTGGTTACGACC

ATGTTTGGGGTGGTCACACTCAATACTTCATCACTCCTGCTGTAGCAGTTGGTGCTG
ACTTCGTTAAAGCAAATGCGAAAGATGGCAACCCACGTGATACACAAACTATCGGC
TAAATGCTAAATTCCGTTTCT

Biografija autora

Katarina D. Novović je rođena 23.12.1989. godine u Beogradu, Srbija. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija) upisala je 2008. godine, a osnovne akademske studije završila je 2012. godine. Master akademske studije upisala je iste godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, modul Genetičko inženjerstvo i biotehnologija). Master studije završila je 2013. godine odbranom master rada pod nazivom „Molekularni mehanizmi rezistencije na antibiotike kliničkog izolata *Acinetobacter baumannii* IMD1865”, koji je uradila u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju (u tom periodu Laboratorija za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama) Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Godine 2013. upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu (studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija prokariota). Katarina Novović je izradu doktorske teze otpočela u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu na projektu Osnovnih Istraživanja-Biologija OI 173019 „Izučavanje gena i molekularnih mehanizama u osnovi probiotičke aktivnosti bakterija mlečne kiseline izolovanih sa područja Zapadnog Balkana”. Od 15. decembra 2013. godine do 1. marta 2015. godine, Katarina Novović je bila zaposlena na projektu SERBORDISinn na poziciji tehničar sa iskustvom, a 1. marta 2015. godine je zaposlena u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju (LMM) kao istraživač pripravnik. Odlukom Naučnog veća Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo 26. marta 2015. godine Katarina Novović je izabrana u zvanje istraživač saradnik. U toku dosadašnjeg naučnog rada Katarina Novović je objavila dvanaest (12) radova: jedan (1) rad u međunarodnom časopisu M21a kategorije, sedam (7) radova u časopisima M21 kategorije, dva (2) rada u časopisima M22 kategorije, jedan (1) rad u časopisu M23 kategorije i jedan (1) rad u časopisu bez impakt faktora. Na međunarodnim kongresima ima četrnaest (14) saopštenja štampanih u izvodu. Na domaćim kongresima ima jedno (1) saopštenje štampano u izvodu.

Član je Udruženja mikrobiologa Srbije i Srpskog društva za molekularnu biologiju.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Катарина Нововић

Број индекса M3009/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Регулација генске експресије и диверзитет *CarO* и *Omp33-36* порина рода

Acinetobacter spp.

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 30.08.2018.

Катарина Нововић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Катарина Нововић _____

Број индекса _____ M3009/2013 _____

Студијски програм _____ Молекуларна биологија _____

Наслов рада _____ Регулација генске експресије и диверзитет CarO и Omp33-36
порина рода *Acinetobacter* spp. _____

Ментор др Бранко Јовчић, ванредни професор, Биолошки факултет, Универзитет
у Београду _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској
верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму
Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског
назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум
одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне
библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 30.08.2018.

Катарина Нововић

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Регулација генске експресије и диверзитет CarO и Omp33-36 порина рода

Acinetobacter spp.

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 30.08.2018.

Катерина Ђобило

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

RESEARCH ARTICLE

Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: Revision of CarO Classification

Katarina Novovic¹, Sanja Mihajlovic¹, Zorica Vasiljevic², Brankica Filipic^{1,3}, Jelena Begovic¹, Branko Jovcic^{1,4*}

1 Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, **2** Institute for Mother and Child Health Care of Serbia "Dr Vukan Čupić", Belgrade, Serbia, **3** Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, **4** Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

* bjovcic@bio.bg.ac.rs



OPEN ACCESS

Citation: Novovic K, Mihajlovic S, Vasiljevic Z, Filipic B, Begovic J, Jovcic B (2015) Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: Revision of CarO Classification. PLoS ONE 10(3): e0122793. doi:10.1371/journal.pone.0122793

Academic Editor: Feng Gao, Tianjin University, CHINA

Received: October 16, 2014

Accepted: February 23, 2015

Published: March 30, 2015

Copyright: © 2015 Novovic et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: 16S rDNA sequences are available at European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/LN611347-LN611374>, accession No. LN611347-LN611374) sequences of carO genes (accession No. LN611375-LN611402), oxacillinase genes and ISAb_a1 (accession No. LN611403-11410) will be available at European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/LN611375-LN611416>).

Funding: This work was supported by grant No. 173019 from the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia. The funders had no role in study design, data

Abstract

Carbapenem-resistant *A. baumannii* present a significant therapeutic challenge for the treatment of nosocomial infections in many European countries. Although it is known that the gradient of *A. baumannii* prevalence increases from northern to southern Europe, this study provides the first data from Serbia. Twenty-eight carbapenem-resistant *A. baumannii* clinical isolates were collected at a Serbian pediatric hospital during a 2-year period. The majority of isolates (67.68%) belonged to the sequence type Group 1, European clonal complex II. All isolates harbored intrinsic OXA-51 and AmpC cephalosporinase. OXA-23 was detected in 16 isolates (57.14%), OXA-24 in 23 isolates (82.14%) and OXA-58 in 11 isolates (39.29%). Six of the isolates (21.43%) harbored all of the analyzed oxacillinases, except OXA-143 and OXA-235 that were not detected in this study. Production of oxacillinases was detected in different pulsotypes indicating the presence of horizontal gene transfer. NDM-1, VIM and IMP were not detected in analyzed clinical *A. baumannii* isolates. ISAb_a1 insertion sequence was present upstream of OXA-51 in one isolate, upstream of AmpC in 13 isolates and upstream of OXA-23 in 10 isolates. *In silico* analysis of carO sequences from analyzed *A. baumannii* isolates revealed the existence of two out of six highly polymorphic CarO variants. The phylogenetic analysis of CarO protein among *Acinetobacter* species revised the previous classification CarO variants into three groups based on strong bootstraps scores in the tree analysis. Group I comprises four variants (I-IV) while Groups II and III contain only one variant each. One half of the Serbian clinical isolates belong to Group I variant I, while the other half belongs to Group I variant III.

Introduction

Acinetobacter baumannii has become one of the most prominent pathogens which cause a wide range of serious infections, especially in intensive care units. Morbidity and mortality

collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

associated with *A. baumannii* infection are increasing, thus *A. baumannii* is emerging as a major threat for the treatment of infections [1,2]. One of the reasons why *A. baumannii* is in the spotlight of the medical and scientific community is its remarkable ability to acquire and accumulate determinants of resistance to antibiotics, which consequently leads to the emergence of multidrug-resistant strains and outbreaks [3]. Carbapenem resistance in *A. baumannii* is increasingly observed worldwide and constitutes a signal for immediate investigation and response. Having that in mind it is not surprising that carbapenem-resistant *A. baumannii* is considered a significant health problem because of the limited options for antibiotic treatment [4]. Resistance to carbapenems in *A. baumannii* principally involves the serine oxacillinases of the Ambler class D OXA-type and the metallo- β -lactamases (Ambler class B). The OXA-58-type was most frequently found in Europe during *A. baumannii* outbreaks, followed by the OXA-23-type. In addition, OXA-24 was detected in Europe but appeared to be more sporadic [5]. Although these enzymes weakly hydrolyze carbapenems, they can confer high resistance when *bla*_{OXA} genes are overexpressed, as a result of their association with mobile elements, such as *ISAbal*, which carries a strong promoter [6]. Furthermore, strains of *A. baumannii* have two intrinsic β -lactamases in their genome, an AmpC β -lactamase and an OXA-51 serine-type oxacillinase, which contribute to the natural resistance of these bacteria to several β -lactams. Nevertheless, resistance to carbapenems can often be explained by other mechanisms, such as porin modification or loss or by modification of penicillin-binding proteins [7]. The loss of membrane permeability, due to alterations in specific porins, is an intrinsic carbapenem resistance mechanism in *A. baumannii*. Changes in the primary structure or loss of a 25/29-kDa outer-membrane protein (OMP), named CarO (carbapenem-associated outer membrane protein), currently are the best characterized causes of intrinsic *A. baumannii* carbapenem resistance [8,9]. In most cases, these changes are the result of *carO* gene disruption by the various insertion elements [8]. Based on the variable domains of CarO, this channel is classified in two groups, CarOa and CarOb, where CarOb has been shown to be twice as specific for imipenem than CarOa [10].

Epidemiological and clinical information on the prevalence of carbapenem resistance in different European countries was difficult to obtain until recently because *A. baumannii* antimicrobial resistance was not monitored by the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) until the year 2012. However, studies published so far suggest that an increase in carbapenem resistant strains has been observed in Europe and it is emphasized that the gradient of prevalence increases from northern to southern Europe. Although these studies describe the emergence and indicate a trend of carbapenem-resistant *A. baumannii* prevalence in Europe the lack of data from southeast Europe (including Serbia) is more than obvious. This is of huge importance since there are well-documented cases of carbapenem-resistant *A. baumannii* spreading from these countries to other European countries, as was described for Germany [11] and Switzerland [12].

The aim of this study was to investigate the clonal dissemination and genetic basis of β -lactam antibiotic resistance among carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates collected from June 2012 to February 2014 at The Institute for Mother and Child Health Care of Serbia "Dr. Vukan Cupic" in Belgrade, Serbia and to give insight into the role of CarO in rise of carbapenem-resistance among them. Study revealed differences among the prevalence oxacillinases, where OXA-24 predominated and resulted with a novel classification of CarO porin, one of the crucial players in the emergence of resistance to carbapenems among *A. baumannii* strains.

Materials and Methods

Bacterial strains and species identification

Twenty-eight consecutive, non-duplicate multidrug-resistant and carbapenem-resistant *A. baumannii* clinical isolates were collected over a 21-month period (June 2012–February 2014) at the Institute for Mother and Child Health Care "Dr. Vukan Čupić", a tertiary care paediatric hospital in Belgrade, Serbia. The isolates were initially identified by standard biochemical tests [13] or with a Vitek 2 automated system (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France). The strain identification was confirmed by 16S rRNA gene amplification [14] and sequencing (Macrogen DNA sequencing service, Netherlands). Resulting sequences were deposited in European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/LN611347-LN611374>, accession No. LN611347-LN611374)

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

The preparation of samples was performed as previously described [15]. DNA restriction was done with *ApaI* enzyme (Thermo Scientific, Lithuania) at 37°C for 3 hours. PFGE was performed with a 2015 Pulsafor unit (LKB Instruments, Bromma, Sweden) equipped with a hexagonal electrode array for 16h at 300V at 9°C. The gels were stained with ethidium bromide and photographed under UV illumination. A dendrogram was derived from the Ward linkage of correlation coefficients between PFGE patterns of different genotypes by using SPSS cluster analysis software (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

Multiplex PCRs for identification of sequence type groups

Multiplex PCR for identification of *A. baumannii* sequence type groups were performed as previously described [16]. Identification of an isolate as a member of sequence type Group 1 or Group 2 required amplification of all three fragments in the corresponding multiplex PCR and the absence of amplification in other multiplex PCR. Sequence type Group 3 isolates were those that gave amplification of *csuE* and OXA-51-like in the Group1 PCR and only *ompA* fragment in the Group 2 multiplex PCR (Table 1).

Antimicrobial susceptibility testing

The isolates were initially screened for antimicrobial susceptibilities with a Vitek 2 system. Sensitivities were confirmed by a CLSI agar disk method (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Antibiotic susceptibility profiles were also determined in cation-adjusted Mueller-Hinton broth by microdilution testing following the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. <http://www.eucast.org>.) criteria using their susceptibility and resistance breakpoints. Fifty percent inhibitory concentration (IC50) values to antimicrobial agents were calculated by Microsoft Excel software. IC50 values were determined from an individual curve equation specific for each sample. The IC50s reported are the results of three independent experiments. Additionally, imipenem MIC values were determined by microdilution testing for selected isolates: 4031, 7342, 6051/12, 6077/12, 6344/12, 1995/12, 8761 and 8778.

Molecular detection of resistance genes

Detection of genes encoding different oxacillinases (OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-143 and OXA-235), New Delhi metallo- β -lactamase, VIM and IMP metallo- β -lactamase, KPC carbapenemase, AmpC cephalosporinase, and outer-membrane

Table 1. Primers used in this study.

Primer	Sequence	Length (bp)	Reference
Oxa-23-like-F	5'-GATCGGATTGGAGAACCAGA-3'	501	[20]
Oxa-23-like-R	5'-ATTCTGACCGCATTTCAT-3'		
Oxa-24-like-F	5'-GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA-3'	246	[20]
Oxa-24-like-R	5'-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT-3'		
Oxa-51-like-F	5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3'	353	[20]
Oxa-51-like-R	5'-TGGATTGCACCTTCATCTGG-3'		
Oxa-58-like-F	5'-AAGTATTGGGGCTTGCTG-3'	599	[20]
Oxa-58-like-R	5'-CCCCTCTGCGCTCTACATAC-3'		
Oxa-235-F	5'-TTGTTGCCTTACTTAGTTGC-3'	768	[21]
Oxa-235-R	5'-CAAAATTTAAGACGGATCG-3'		
Oxa-143-F	5'-TGGCACTTTCAGCAGTTCCT-3'	149	[22]
Oxa-143-R	5'-TAATCTTGAGGGGGCCAACC-3'		
Ndm-1 Full-F	5'-ATGGAATTGCCAATATTATG-3'	815	[19]
Ndm-1 Full-R	5'-TCAGCGCAGCTTGTCGGCC-3'		
IMPF	5'-GAAGGYGTTTATGTTTCAT-3'	587	[23]
IMPR	5'-GTAMGTTTCAAGAGTGAT-3'		
VIM-2F	5'-GTTTGGTTCGCATATCGCA-3'	510	[23]
VIM-2R	5'-AATGCGCAGCACCAGGAT-3'		
KPCF	5'-GTATCGCCGTCTAGTTCTGC-3'	637	[24]
KPCR	5'-GGTCGTGTTTCCCTTAGCC-3'		
AmpC-F	5'-ACTTACTTCAACTCGCGACG-3'	663	[17]
AmpC-R	5'-TAAACACCACATATGTTCCG-3'		
carO-F	5'-ATTGTAGAAAGCTGAGACAT-3'	1300	[18]
carO-R	5'-ATTTCTYTATGCTCACCTGA-3'		
IS <i>Aba1</i> -F	5'-AAAGGATCCCTCTGTACACGACAAATTCAC-3'		[17]
<i>ampInt</i> -R	5'-GCCGACTTGATAGAA-3'		
33-36Omp-F	5'-ATGAAAAAATTGGTTTAGCCAC-3'	880	This study
33-36Omp-R	5'-AGAAACGGAATTTAGCA-3'		
Primers used in multiplex PCRs for identification of sequence type groups			
Group1ompAF306	5'-GATGGCGTAAATCGTGGTA-3'	355	[16]
Group1and2ompAR660	5'-CAACTTTAGCGATTTCTGG-3'		
Group1csuEF	5'-CTTTAGCAAACATGACCTACC-3'	702	[16]
Group1csuER	5'-TACACCCGGTTAATCGT-3'		
Gp1OXA66R647	5'-GCGCTTCAAAATCTGATGTA-3'	559	[16]
Gp1OXA66R647	5'-GCGTATATTTGTTTCCATTC-3'		
Group2ompAF378	5'-GACCTTCTTATCACAAACGA-3'	343	[16]
Group1and2ompAR660	5'-CAACTTTAGCGATTTCTGG-3'		
Group2csuEF	5'-GGCGAACATGACCTATTT-3'	580	[16]
Group2csuER	5'-CTTCATGGCTCGTTGGTT-3'		
Gp2OXA69F169	5'-CATCAAGGTCAAACCAA-3'	162	[16]
Gp2OXA69R330	5'-TAGCCTTTTTTCCCATC-3'		

doi:10.1371/journal.pone.0122793.t001

protein CarO was performed as previously described [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24]. Also, the 33–36 kDa porin was amplified (Table 1.) and the PCR conditions were 94°C for 5 min, 30 cycles of 94°C for 30 s, 48°C for 30 s and 72°C for 45 s, followed by a final extension of 10 min. The presence of insertion sequence IS*Aba1* upstream of *bla*_{AmpC} was determined as previously

described [17]. The presence of this insertion sequence upstream from oxacillinase genes was performed by combining a reverse primer from the pairs used for detection of each oxacillinase gene [20] with IS*Aba1-F* primer [17] (see Table 1.). Representative PCR amplicons were selected and sequenced in order to confirm the specificity of the reaction. Sequencing was performed by the MacroGen DNA Sequencing Service (Amsterdam, Netherlands). Resulting sequences of *carO* genes (accession No. LN611375-LN611402), oxacillinase genes and IS*Aba1* (accession No. LN611403-11410) were deposited in European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/LN611375-LN611416>).

Database search and data analysis

DNA and protein sequences were aligned using DNA Strider version 1.4f7 [25] and Clustal W version 1.7 [26]. Database searches for DNA or protein sequence similarities were done using the BLAST facility (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). To build the CarO protein profile the PSI-BLAST [27] homology searches were restricted to Moraxelaceae and e-value cutoff of 1e-4. All hits that exhibited at least 47% identity and over 68% of the query fragment length were retained for further analysis. As a CarO prototype, CarO variant I (DQ309875) was used. The protein hits with sequence sizes very dissimilar from the average were removed.

Phylogenetic analysis

The phylogenetic inferences were obtained by MEGA version 6.0 [28]. Multiple protein sequence alignments were performed using Clustal W with default parameters. All columns in the multiple alignment matrix with more than 80% gaps were eliminated. The construction of a CarO phylogenetic tree was conducted by the maximum-likelihood (ML) method using a Jones-Taylor-Thornton (JTT) model. The Serbian *A. baumannii* isolates were included in this analysis. Bootstrapping of 1000 replicates was used to infer confidence levels of ML trees. An ML tree with the protein accession numbers is included as the supporting information (S1 Fig).

Topology prediction and analysis of the CarO isoforms

Transmembrane topology predictions of the CarO isoforms were performed by PRED-TM (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB>) [29].

The amino acid changes observed in the different CarO variants relative to the canonical CarO variant I were analyzed by the software PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/>), which predicts whether an amino acid substitution, insertion or deletion has any impact on the biological function of a protein.

The Shannon entropy [30] of each amino acid position in CarO multiple alignments of the three main CarO groups were calculated using the following equation:

$$H = - \sum_{i=1}^M P_i \log_2 P_i$$

where P_i is the frequency of amino acid residue i in that site and M is the number of amino acid types. Shannon entropy (H) ranges from 0 (only one residue is represented in a given position) to 4.32 (all 20 residues are equally represented in a given position).

Ethics Statement

Since the analysis was performed retrospectively on isolates collected through routine clinical work and patient identifiable information was anonymized, no ethical approval was necessary for this study. The authors had no contact or interaction with the patients. Patient

demographics anonymization was performed in two steps; first, personal data was coded by the head of the clinical microbiology laboratory (ZV) at the Institute for Mother and Child Health Care where the isolates were obtained from, and secondly by assigning a different code by the principal investigator at the Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering (BJ) where the molecular analysis was conducted.

Results

Twenty-eight unique isolates were recovered from blood ($n = 4$), central venous catheter tip swabs ($n = 1$), endotracheal aspirates ($n = 15$), bronchoalveolar lavage fluid ($n = 3$) and wound exudates ($n = 5$) during the study period. All of the isolates were confirmed as *A. baumannii* based on 16S rRNA gene sequencing.

Genotyping reveals four major pulsotypes

PFGE analysis carried out with 28 isolates from the 28 patients resulted in 30 major bands for each isolate. The dendrogram produced by SPSS software (Fig 1) showed rates of genomic similarity ranging from 75 to almost 100%. Two major clusters with differences up to 25% appeared. Cluster I encompassed 19 strains with genetic similarity varying from 85 to almost 100%. Cluster II encompassed 9 strains with genetic differences among them less than 5%. Based on these results a total of 4 pulsotypes that comprised genetically indistinguishable or closely related isolates were observed by PFGE (Fig 1). Pulsotypes B and D were predominant, comprising 18 isolates identified at different time points during the study period. Pulsotypes A and C were possibly related to pulsotype B, and all three pulsotypes are encompassed in cluster I. Pulsotype D belongs to cluster II. The algorithmic analysis correlated well with the visual appraisal when the criteria of Tenover and co-workers were applied [31].

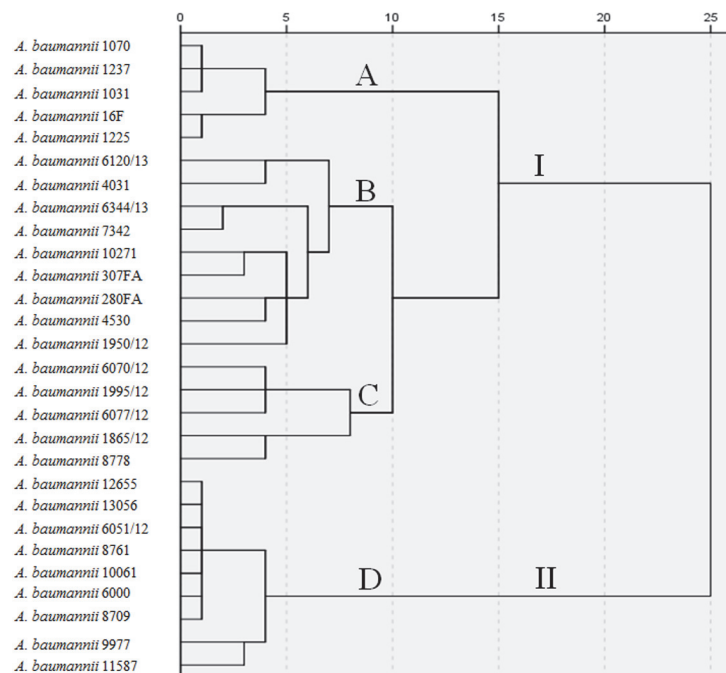


Fig 1. Dendrogram derived from *Apal* PFGE patterns showing the relatedness of *A. baumannii* isolated in Serbia. The dendrogram was constructed using SPSS software. Letters A, B, C and D indicate different pulsotypes, while I and II designate two major clusters.

doi:10.1371/journal.pone.0122793.g001

The majority of *A. baumannii* isolates from Serbia belong to sequence type Group 1, European clonal complex II

Multiplex PCR that was used for identification of *A. baumannii* sequence type groups revealed that 19 isolates (67.86%) belonged to the sequence type Group 1 that corresponds to European clonal complex II (isolates 6070/12, 6051/12, 6120/13, 6344/13, 6000, 1995/12, 6077/12, 7342, 10271, 280FA, 10061, 307FA, 4530, 16F, 1031, 1070, 1225, 1865/12 and 1950/12). Only one isolate (4031) belonged to the sequence type Group 2 (European clonal complex I). The sequence type Group 3 (European clonal complex III) encompassed seven isolates (8761, 8709, 9977, 11587, 12655, 13056 and 1237). The isolate 8778 didn't belong to any of analyzed sequence type groups.

Antimicrobial susceptibilities

All of the strains when analyzed by the Vitek2 system showed resistance to ampicillin (MIC ≥ 32 mg/L), amoxicillin/clavulanate (MIC ≥ 32 mg/L), piperacillin (MIC ≥ 128 mg/L), piperacillin/tazobactam (MIC ≥ 128 mg/L), cefoxitin (MIC ≥ 64 mg/L), ceftazidime (MIC ≥ 64 mg/L), cefotaxime (MIC ≥ 64 mg/L), cefepime (MIC ≥ 64 mg/L), aztreonam (MIC ≥ 64 mg/L), imipenem (MIC ≥ 16 mg/L), and meropenem (MIC ≥ 16 mg/L) (Table 2). Additionally, microdilution tests confirmed that all *A. baumannii* isolates were resistant to imipenem (IC₅₀ > 16 μ g/mL) as well as piperacillin (IC₅₀ varying from 99.41 ± 3.52 μ g/mL to > 256 μ g/mL) and a combination of piperacillin and tazobactam (IC₅₀ varying from 63.15 ± 4.89 μ g/mL to > 256 μ g/mL). IC₅₀ values for ceftazidime revealed that 92.86% of strains express high levels of resistance, while 7.14% have low cutoff values (32 μ g/mL). IC₅₀ values for aztreonam varied from 11.68 ± 0.97 μ g/mL to 207.79 ± 12.56 μ g/mL, whereas 53.57% of analyzed strains showed IC₅₀ values higher than 32 μ g/mL (Table 2). MIC values determined by microdilution testing for the strains that harbor insertion in the *carO* gene and the strains that carry multiple oxacillinases were higher than 256 μ g/ml.

Molecular basis of carbapenem resistance the indicates presence of oxacillinases but not NDM-1 among *A. baumannii* isolates from Serbia

PCR and sequencing experiments detected an intrinsic OXA-51 β -lactamase gene among all analyzed isolates. Moreover, one of the isolates (*A. baumannii* 8778) had an IS*Aba1* insertion sequence upstream of the OXA-51 gene (Fig 2). In general, oxacillinase OXA-23 was detected in 16 isolates (57.14%), OXA-24 in 23 isolates (82.14%) and OXA-58 in 11 isolates (39.29%). OXA-143 and OXA-235 were not detected in any of analyzed isolates. Interestingly, six (21.43%) clinical isolates (*A. baumannii* 6077/12, 1995/12, 6344/13, 7342, 8761 and 8778) gave a positive PCR signal for all of the analyzed oxacillinases, except OXA-143 and OXA-235. Among analyzed strains, five (17.86%) were positive for OXA-23 and OXA-24 but not for OXA-58 (*A. baumannii* 1950/12, 10061, 10271, 11587 and 16F). In addition, five strains (17.86%) were positive for OXA-24 and OXA-58 (*A. baumannii* 6051/12, 6070/12, 6120/13, 6000 and 4031) but not for OXA-23. Seven strains (25%) were positive only for OXA-24 (*A. baumannii* 1865/12, 8709, 280FA, 9977, 12655, 13056 and 1237) and five strains (17.86%, *A. baumannii* 307FA, 4530, 1031, 1070, and 1225) were positive only for OXA-23 (besides intrinsic OXA-51). All of the strains carried AmpC cephalosporinase, of which 13 strains (46.43%) had an IS*Aba1* insertion sequence upstream of the *ampC* gene. IS*Aba1* insertion sequence was also found upstream of the OXA-23 gene in 10 (56.25% of total OXA-23 positive) strains (*A. baumannii* 6344/13, 7342, 8778, 10271, 307FA, 4530, 16F, 1031, 1070, and 1225). Insertion sequence IS*Aba1* was not found upstream of OXA-24 or OXA-58 genes in the analyzed strains.

Table 2. IC50 values, genotyping results and CarO variants for *A. baumannii* isolates from Serbia.

Isolate	Piperacilin (µg/ml)	Piperacilin/Tazobactam (µg/ml)	Ceftazidime(µg/ml)	Aztreonam(µg/ml)	Imipenem(µg/ml)	Pulsotype	CarO group/variant
1865/12	194.99 ± 0.74	110.93 ± 8.15	209.07 ± 20.41	11.68 ± 0.97	>16	C	I/1
1950/12	> 256	221.44 ± 7.13	93.87 ± 3.28	11.95 ± 1.29	>16	B	I/1
6120/13	> 256	195.20 ± 9.96	180.48 ± 1.81	20.48 ± 2.64	>16	B	I/1
6000	123.20 ± 2.26	63.79 ± 9.10	82.56 ± 0.90	12.69 ± 1.72	>16	D	I/1
8709	> 256	202.24 ± 7.24	> 256	193.28 ± 7.24	>16	D	I/1
280FA	132.22 ± 2.94	117.44 ± 1.36	225.71 ± 6.05	19.12 ± 1.24	>16	B	I/1
9977	107.95 ± 12.48	68.80 ± 9.50	31.76 ± 8.56	11.73 ± 2.25	>16	D	I/1
10061	> 256	229.55 ± 8.52	> 256	32.37 ± 6.98	>16	D	I/1
11587	224 ± 27.69	114.56 ± 3.89	106.05 ± 21.52	15.47 ± 0.72	>16	D	I/1
12655	103.36 ± 0.96	63.15 ± 4.89	76.80 ± 1.81	15.20 ± 1.84	>16	D	I/1
13056	99.41 ± 3.52	91.73 ± 1.33	31.47 ± 6.58	11.89 ± 1.18	>16	D	I/1
16F	> 256	179.84 ± 4.48	136.32 ± 0.91	16.75 ± 2.08	>16	A	I/1
1237	209.07 ± 15.16	111.15 ± 6.66	> 256	19.04 ± 1.27	>16	A	I/1
8761	> 256	176.43 ± 14.74	113.07 ± 14.46	13.92 ± 1.58	>16	D	I/1
6051/12	> 256	> 256	> 256	183.89 ± 6.31	>16	D	I/3
6070/12	> 256	184.74 ± 28.21	> 256	207.79 ± 12.56	>16	C	I/3
6077/12	> 256	109.01 ± 5.59	> 256	193.28 ± 6.4	>16	C	I/3
6344/13	227.84 ± 1.28	183.04 ± 34.42	> 256	46.40 ± 1.69	>16	B	I/3
8778	112,64 ± 1.86	88.75 ± 11.74	125.87 ± 21.32	33.55 ± 3.96	>16	C	I/3
10271	> 256	200.45 ± 8.90	192.85 ± 39.33	50.99 ± 2.06	>16	B	I/3
307FA	155.31 ± 38.41	106.24 ± 5.29	67.30 ± 0.13	32.64 ± 7.84	>16	B	I/3
4530	237.23 ± 13.69	213.33 ± 16.11	108.80 ± 1.81	51.95 ± 5.64	>16	B	I/3
1031	216.32 ± 5.12	100.48 ± 2.31	193.71 ± 10.35	94.40 ± 9.28	>16	A	I/3
1070	> 256	> 256	193.71 ± 9.69	62.33 ± 7.34	>16	A	I/3
1225	211.63 ± 5.77	205.44 ± 6.34	192 ± 13.36	73.99 ± 2.67	>16	A	I/3
1995/12	> 256	202.24 ± 7.24	> 256	193.28 ± 7.24	>16	C	I/3
7342	229.55 ± 5.33	195.20 ± 6.34	> 256	36.91 ± 3.86	>16	B	47 bp insertion
4031	168.96 ± 25.21	100.16 ± 0.32	> 256	14.35 ± 1.30	>16	B	860 bp insertion

doi:10.1371/journal.pone.0122793.t002

None of the isolates gave positive results for the presence of the NDM-1, VIM, IMP or KPC beta-lactamases.

CarO porin analyses reveal the need for revision of classification

In this study analysis of 28 complete *carO* and 33–36 kDa porin nucleotide sequences was performed. The sequencing results revealed that Serbian isolates analysed in this study carried genes for 33–36kDa porin that were identical to corresponding genes of *A. baumannii* IOMTU433 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AP014649.1>) and *A. baumannii* AB031 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP009256.1>). A total of 15 isolates carried the gene for 33–36kDa porin identical to *A. baumannii* IOMTU433 (6070/12, 6051/12, 6344/13, 1995/12,

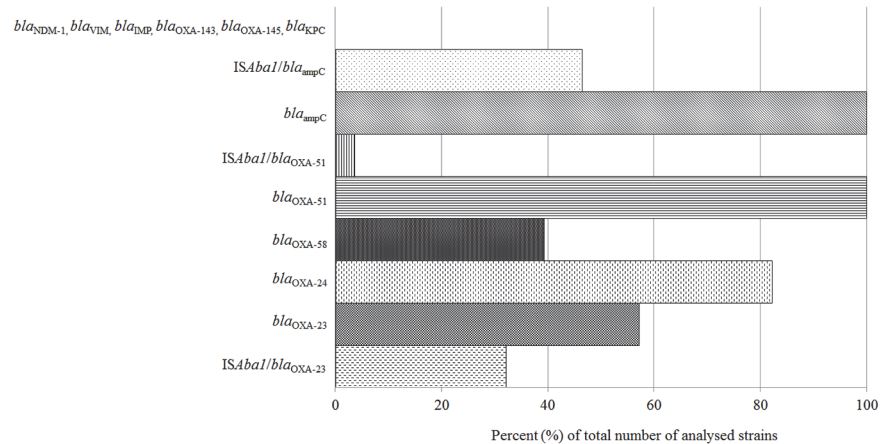


Fig 2. Representation of β -lactamases detected in carbapenem-resistant *A. baumannii* clinical isolates from Serbia.

doi:10.1371/journal.pone.0122793.g002

6077/12, 7342, 8778, 10271, 307FA, 4530, 1031, 1070, 1225, 1865/12, 1950/12), while the rest of 13 isolates carried the gene for 33–36kDa porin identical to *A. baumannii* AB031 (6120/13, 8761, 8709, 6000, 4031, 9977, 280FA, 10061, 11587, 12655, 13056, 16F, 1237). None of the sequenced genes carried any type of frameshift mutations, insertions or deletions. The sequencing of *carO* genes revealed the presence of 4 distinct *carO* alleles. The sequences were designated as different if they had at least one nucleotide change. Translation of the *carO* alleles resulted in two distinct CarO protein variants excluding the two alleles which harbor insertion. *A. baumannii* 4031 had an insertion of 860 bp (starting at +278, ending at +1137 of this *carO* gene) which generated a stop codon (TAA) at position 400–402 in the nucleotide sequence of the *carO* gene. Alignment of this sequence with the BLAST algorithm revealed that a proximal part of the insertion (from 1 to 142 of the inserted sequence) showed 96% identity with a transposase fragment from *A. baumannii* SDF (sequence ID: CU468230.2, from position 2386025 to 2385884). The distal part of the insertion (from 454 to 860 of inserted sequence) showed 97% identity with the same transposase fragment (sequence ID: CU468230.2, from position 2385885 to 2385479). The central region of the inserted sequence (from 149 to 412) showed 71% identity with the IS4 family of transposases from *Psychrobacter* sp. PRwf-1 (sequence ID: CP000713, from position 380979 to 380716). *A. baumannii* 7342 had an insertion of 47 bp (starting at +32,1 ending at +367 of this *carO* gene) which generated a stop codon (TAG) at position 400–402 in the nucleotide sequence of the *carO* gene. Alignment of this sequence with the BLAST algorithm revealed that this insertion is 100% identical to region 250–292 of *A. baumannii* AbPK-2's partial sequence of insertion sequence IS*Aba1* and *carO* gene, partial sequence (gb:HQ020497.1).

Given the rapid increase in the incidence of serious infections caused by *Acinetobacter* spp. other than *A. baumannii* [32], we included in the maximum likelihood (ML) phylogenetic analysis of CarO proteins from the entire *Acinetobacter* genus. ML phylogenetic analysis separated CarO proteins into three distinct groups (Fig 3). The largest but less conserved Group I includes mainly *A. baumannii* strains. Additionally, this group includes all four variants of *A. baumannii* clinical isolates that were previously reported [18] as well as the Serbian clinical isolates (Fig 3). One half of the Serbian clinical isolates belong to variant I (Table 2) or the previously defined CarOa group [8] while the other half belongs to variant III (Table 2) or CarOb group [8]. Groups II and III consist of distinct *Acinetobacter* spp. of clinical and nonclinical importance (Fig 3, S1 Fig). Only one isolate, *A. baumannii* 146457, belongs to group II, while

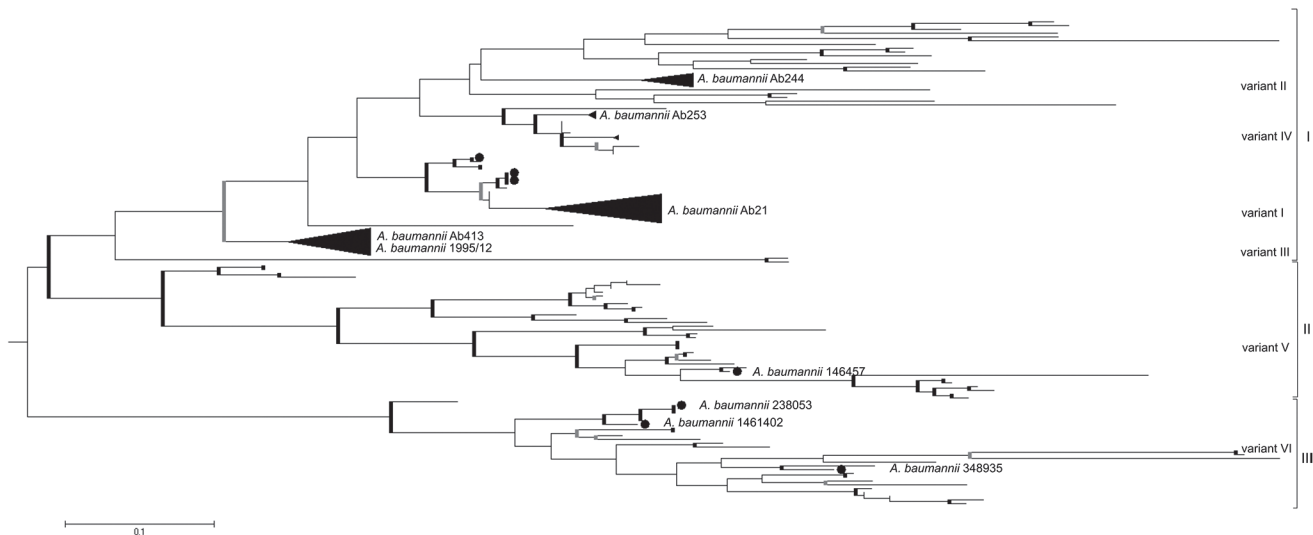


Fig 3. Phylogenetic inferences of CarO protein among *Acinetobacter* spp. A phylogenetic tree of CarO proteins was constructed with the maximum likelihood (ML) method using a Jones-Taylor-Thornton (JTT) model distance matrix. The confidence levels were calculated from 1000 bootstrap resamples of alignment used for phylogenetic inferences by ML method. Bold gray and bold black lines represent the nodes with a support bootstrap value of $\geq 50\%$ and $\geq 70\%$, respectively. The black triangles represent the clade consisting of only *A. baumannii* strains from the database. Gene bank accession numbers for all tree members are given in [S1 Fig](#) Representatives and variants (I-VI) of each group (I-III) are the following: *A. baumannii* Ab21 (DQ309875), *A. baumannii* Ab244 (AY684798), *A. baumannii* Ab413 (FJ652395), *A. baumannii* Ab253 (EF537047), *A. baumannii* 146457 (EXB49165), *A. baumannii* 238053 (EXB72592), *A. baumannii* 1461402 (EXB34375), *A. baumannii* 348935 (EXA64785). The Serbian clinical isolates *A. baumannii* 6000 and *A. baumannii* 1995/12 are indicated.

doi:10.1371/journal.pone.0122793.g003

three *A. baumannii* isolates belong to group III (*A. baumannii* 238053, 1461402, 348935). Multiple sequence alignment comparisons revealed that 64% of *carO* alleles are polymorphic (160 out of a total of almost 250 amino acids positions). The polymorphic regions as well as conserved regions are well defined in all three CarO groups. Each group has two variable regions (VR1, VR2) at the N terminus and two hypervariable regions (HVR1, HVR2) between the amino acid positions 135–180, and 203–240 ([Fig 4A](#)). Among variable regions, amino acids of the VR1 of group II are the least polymorphic, with H mainly less than 0.6. Concerning the four conserved regions (C1–C4), the C1 region at the N terminus is the most conserved region while the C4 region at the C terminus is the least conserved among all three CarO groups.

Transmembrane topology predictions for CarO groups II and III showed the same topology scores as obtained for the variants of CarO group I [[18](#)]. Ten β -strand spanning regions (β 1– β 10) and five external loops (L1–L5) were predicted in all the different variants of CarO groups ([Fig 4B](#)). The CarO variants showed the presence of AEVGTGTYG motif at their N terminal region that is conserved among the CarO protein family [[33](#)].

In order to verify whether the CarO primary structure has an impact on imipenem resistance, *in silico* PROVEAN analysis was applied to all three CarO groups. The representatives of group I (variants II–IV) showed that 64, 63 and 56 amino acid substitutions or deletion had a neutral impact on protein function, respectively. A deleterious effect on protein function resulted from one amino acid substitution, G145N, in the CarO variant III, while in CarO variant IV two deletions, I135del and V159del, as well as one substitution, G154V, had deleterious impact. Although there are differences in the primary structure of Serbian isoforms, there was no correlation between the CarO isoforms and imipenem resistance/susceptibility phenotype ([Table 2](#)). The PROVEAN analysis of groups II and III revealed a 1.7 fold higher number of amino acid changes compared to group I. CarO group II had 108 neutral and 9 deleterious (A19F, W57Y, G64S, D79S, D128T, T140L, F177L, P179A, W185I) amino acid changes. The

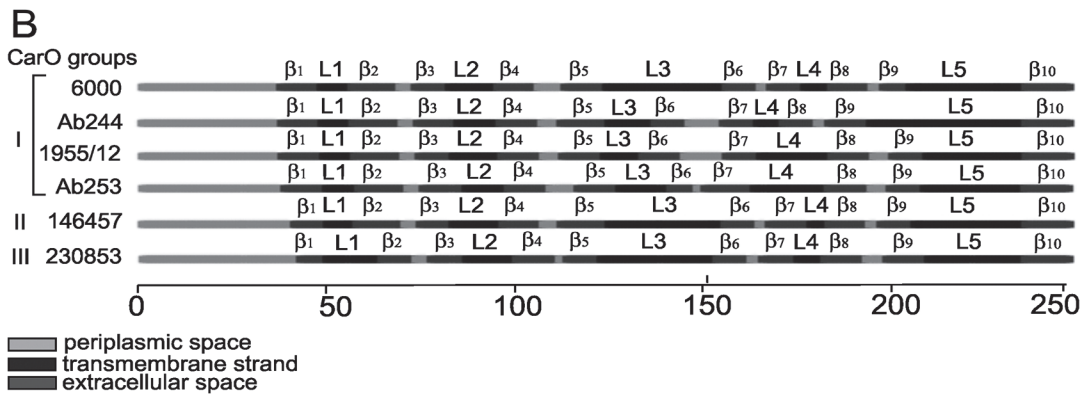
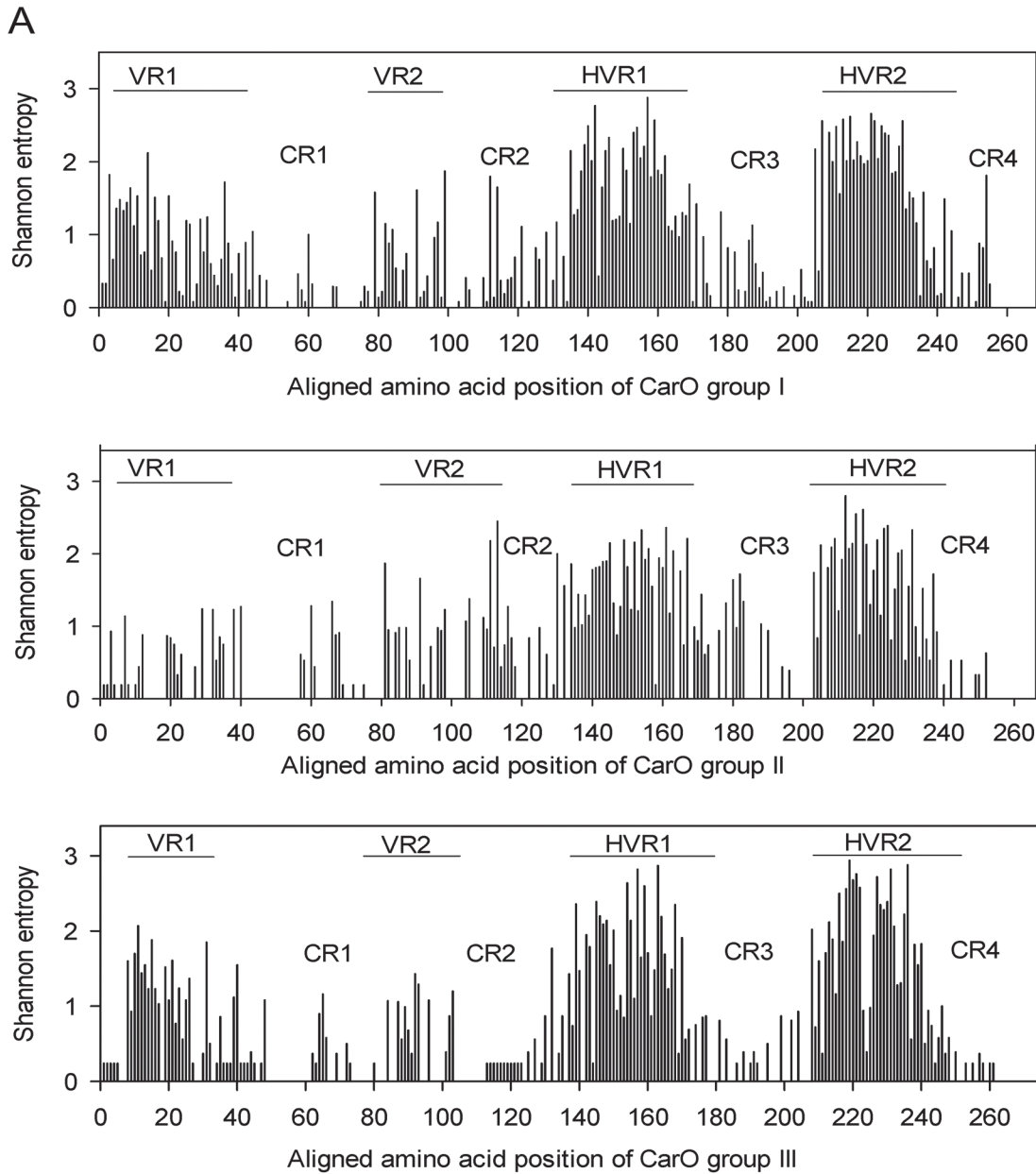


Fig 4. Distinct structural CarO variants among the *Acinetobacter* spp. population. (A) Shannon variability of CarO sequences within groups I, II, and III. The height of each bar represents the entropy of an amino acid residue at a given position. The signal CarO peptide sequence is included in this analysis. The conserved (C1-C4) regions, variable (VR1, VR2) and hypervariable (HVR1, HVR2) regions are shown. (B) Predicted transmembrane topology of the different *A. baumannii* CarO variants from CarO groups I, II and III. External loops (L1-L5), transmembrane spanning regions (β 1- β 10) and periplasmic regions are depicted.

doi:10.1371/journal.pone.0122793.g004

representative of group III, *A. baumannii* 348935, had 4 deleterious changes (R5Y, V6Q, P104_n110del, G145N) out of a total of 97 amino acid changes. One hundred nine amino acid substitutions, insertions or deletions were observed for both of CarO isoforms, *A. baumannii* 1461402 and *A. baumannii* 230853. In addition, the aforementioned isoforms showed the same type of deleterious amino acid changes, W57Y, P104_N110del, K146_N147del, and Y148T, whereas *A. baumannii* 1461402 had one additional deleterious insertion, N214_P215insV. The results of PROVEAN analysis suggest that high polymorphism of *carO* alleles does not interfere with CarO function.

Discussion

Carbapenem-resistant *A. baumannii* has emerged as an important clinical problem due to increase in the prevalence of *Acinetobacter* species, including *A. baumannii*, as nosocomial pathogens. International transfer of patients infected with *A. baumannii* has led to the introduction and subsequent epidemic spread of carbapenem-resistant *A. baumannii* [5, 34]. Currently, carbapenem-resistant *A. baumannii* is an important problem in many European countries. It appears that carbapenem resistance rates are higher in Turkey, Greece, Italy, Spain, and England, and are still rather low in northern countries (e.g. Germany and the Netherlands) [35]. Data from countries that lack routine surveillance, including Serbia, are necessary in order to understand and prevent dissemination of carbapenem-resistant strains of species that are in epidemiological expansion, like *A. baumannii*, as previous reports showed that patients from Serbia are one of the routes of dissemination of carbapenem-resistant *A. baumannii* in Europe [11, 36]. Indeed, molecular typing of isolates analyzed in this study revealed that majority of the Serbian isolates belongs to pan-European clonal complexes II and III. This study was conducted in order to define the genetic basis of carbapenem resistance in *A. baumannii* isolated in Serbia and to complement the data from other European countries.

Our results show that production of OXA-24, described by Boue and colleagues [37], is the most frequent mechanism of carbapenem resistance in *A. baumannii* isolates from Serbia, although production of OXA-23 was previously reported to be a common mechanism of carbapenem resistance in *A. baumannii* worldwide [38]. More than half of the analysed isolates belonged to the two major clonal types, i.e., pulsotypes B and D, as evidenced by PFGE (Fig 1). Production of oxacillinases was detected in different pulsotypes, indicating that these genes are likely disseminating among *A. baumannii* strains by means of horizontal transfer as well as clonal spread. Interestingly, the IS*AbaI* sequence was found upstream of the OXA-23 gene in 10 isolates, of OXA-51 in one isolate, and upstream of AmpC in 13 isolates. It is difficult to distinguish what the contribution is of insertion sequences which are upstream of oxacillinase genes to carbapenem-resistance of our strains. It has been shown that IS*AbaI* is one of most prevalent insertion sequences in *A. baumannii* and it can provide additional promoters to enhance transcription levels of oxacillinase or *bla*_{ampC} genes [39].

The second goal of our work was to determine the presence of metallo- β -lactamase producing carbapenem-resistant *A. baumannii*, with the emphasis on the NDM-1 producing isolates. Although there are studies confirming the transfer of NDM-1 producing *A. baumannii* from Serbia to some European countries, we did not detect *bla*_{NDM-1} gene in any of the strains collected during a period of two years. This is not surprising, since up to now NDM-1

producing strains in Serbia were mainly associated with one hospital [40, 41]. Having in mind the importance of CarO in *A. baumannii* imipenem resistance development we performed detailed analyses of this porin in our strains and compared the results with amino acid sequences present in the BLAST database. We found two out of six polymorphic *A. baumannii* CarO variants. Notably, the polymorphism obtained among different isoforms of the CarO groups was concentrated in four well-defined variables and four well-conserved regions (Fig 4). The predicted positions of five surface-exposed loops (L1-L5) completely overlaid the variable and hypervariable regions of the corresponding CarO variants. Although *A. baumannii* has a narrow ecological niche, at least six distinct *carO* variants coexist in the *A. baumannii* population. Given that identical types of CarO changes exist in other *Acinetobacter* species (Fig 3, Fig 4) and isolates of non-clinical sources, the alterations of *carO* gene are probably a consequence of rapid adaptation to diverse habitats and hosts.

Our ML phylogenetic analysis of CarO protein among *Acinetobacter* spp. revised the previous classification of CarO variants [18]. The CarO variants are clearly separated into three groups based on strong bootstraps scores in the tree analysis (Fig 3). As the most diverse, Group I comprises four variants (I-IV) while Groups II and III contain only one variant each (Fig 3). CarO porin can generate imipenem resistance if there is a gene disruption resulting in the lack of porin formation in the outer membrane, if there are changes in amino acid composition that could lead to altered porin, and if there is a decrease in expression of the *carO* gene. Therefore, we assessed the *carO* nucleotide and deduced amino acid sequences in the analyzed strains. Our results showed unclear correlation between a specific CarO variants and reduced carbapenem sensitivity because all Serbian *A. baumannii* clinical isolates were carbapenem-resistant. Moreover, *A. baumannii* 4031 and 7342 demonstrated increased imipenem MIC (>256 µg/ml), which is in correlation with other *A. baumannii* clinical isolates carrying insertions in the *carO* gene [33, 42, 43]. In contrast to the other *A. baumannii* isolates carrying *carO* interrupted with insertion elements, *A. baumannii* AC60-MA [44] showed high susceptibility to imipenem. Therefore, the *A. baumannii* imipenem resistance/susceptibility phenotype involves mechanisms other than just imipenem uptake by CarO porin, or they may act cumulative or synergistically.

Supporting Information

S1 Fig. Phylogenetic inferences of CarO protein among *Acinetobacter* spp. A phylogenetic tree of CarO proteins was constructed with the maximum likelihood (ML) method using a Jones-Taylor-Thornton (JTT) model distance matrix. The confidence levels were calculated from 1000 bootstrap resamples of alignment used for phylogenetic inferences by ML method. The CarO protein accession numbers are given. (PDF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BJ SM. Performed the experiments: KN SM ZV. Analyzed the data: BF KN. Contributed reagents/materials/analysis tools: JB. Wrote the paper: JB JB SM.

References

1. Baang JH, Axelrod P, Decker BK, Hujer AM, Dash G, Truant AR et al. Longitudinal epidemiology of multidrug-resistant (MDR) *Acinetobacter* species in a tertiary care hospital. *Am J Infect Control*. 2012; 40: 134–137. doi: [10.1016/j.ajic.2011.04.326](https://doi.org/10.1016/j.ajic.2011.04.326) PMID: [21835501](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21835501/)

2. Chung DR, Song JH, Kim SH, Thamlikitkul V., Huang SG, Wang H et al. High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 184: 1409–1417. doi: [10.1164/rccm.201102-0349OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201102-0349OC) PMID: [21920919](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21920919/)
3. Lockhart SR, Abramson MA, Beekmann SE, Gallagher G, Riedel S, Diekema DJ et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 3352–3359. PMID: [17715376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17715376/)
4. Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 39: 105–114. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2011.10.004](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.10.004) PMID: [22113193](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22113193/)
5. Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Ctries*. 2009; 3: 481–489.
6. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM et al. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006; 258: 72–77. PMID: [16630258](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16630258/)
7. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12: 826–836. PMID: [16882287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16882287/)
8. Catel-Ferreira M, Coadou G, Molle V, Mugnier P, Nordmann P, Siroy A et al. Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66: 2053–2056. doi: [10.1093/jac/dkr267](https://doi.org/10.1093/jac/dkr267) PMID: [21705362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21705362/)
9. Mussi MA, Relling VM, Limansky AS, Viale AM. CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for L-ornithine uptake. *FEBS Letters*. 2007; 581: 5573–5578. PMID: [17997983](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17997983/)
10. Siroy A, Molle V, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Pestel-Caron M, Cozzone A, et al. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005; 49: 4876–4883. PMID: [16304148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16304148/)
11. Gottig S, Pfeifer Y, Wichelhaus TA, Zacharowski K, Bingold T, Averhoff B et al. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase 1. *Lancet Infect Dis*. 2010; 10: 828–829. doi: [10.1016/S1473-3099\(10\)70274-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70274-7) PMID: [21109168](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21109168/)
12. Poirel L, Bonnin RA, Boulanger A, Schrenzel J, Kaase M, Nordmann P. Tn125-related acquisition of bla_{NDM}-like genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56: 1087–1089. doi: [10.1128/AAC.05620-11](https://doi.org/10.1128/AAC.05620-11) PMID: [22143526](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22143526/)
13. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative Gram-negative rods, in: Murray PR, Baron EJ, Tenover JC, Tenover FC, (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2003; pp. 749–779.
14. Jovcic B, Begovic J, Lozo J, Topisirovic L, Kojic M. Dynamics of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Arch Biol Sci*. 2009; 61: 159–164.
15. Kojic M, Strahinic I, Topisirovic L. Proteinase PI and lactococcin A genes are located on the largest plasmid in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. diacetyllactis S50. *Can J Microbiol*. 2005; 51: 305–314. PMID: [15980892](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15980892/)
16. Turton FJ, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13: 807–815. PMID: [17610600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17610600/)
17. Beceiro A, Perez A, Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Pascual A, Vila J et al. Genetic variability among ampC genes from *Acinetobacter* genomic species 3. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 1177–1184. doi: [10.1128/AAC.00485-08](https://doi.org/10.1128/AAC.00485-08) PMID: [19029333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19029333/)
18. Mussi MA, Limansky AS, Relling V, Ravasi P, Arakaki A, Actis LA et al. Horizontal gene transfer and assortative recombination within the *Acinetobacter baumannii* clinical population provide genetic diversity at the single carO gene, encoding a major outer membrane protein channel. *J Bact*. 2011; 193: 4736–4748. doi: [10.1128/JB.01533-10](https://doi.org/10.1128/JB.01533-10) PMID: [21764928](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21764928/)
19. Teo J, Ngan G, Balm M, Jureen R, Krishnan P, Lin R. Molecular characterization of NDM-1 producing Enterobacteriaceae isolates in Singapore hospitals. *Western Pac Surveill Response*. 2012; 3: 19–24. doi: [10.5365/WPSAR.2011.2.4.010](https://doi.org/10.5365/WPSAR.2011.2.4.010) PMID: [23908903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23908903/)
20. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57: 154–155. PMID: [16284100](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16284100/)
21. Higgins P, Perez-Llarena PJ, Zander E, Fernandez A, Bou G, Sifert H. OXA-235 a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(5): 2121–2126. doi: [10.1128/AAC.02413-12](https://doi.org/10.1128/AAC.02413-12) PMID: [23439638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23439638/)

22. Higgins P, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35(3): 305. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2009.10.018](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.10.018) PMID: [20031376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20031376/)
23. Ellington M J, Kistler J, Livermore DM, Woodford M. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59:321–322. PMID: [17185300](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17185300/)
24. Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, Vazquez GJ, Sante MI, Aquino EE et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rico medical center hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 β -lactamases. 2009; *Antimicrob Agents Chemother* 53(4): 1660–1664. doi: [10.1128/AAC.01172-08](https://doi.org/10.1128/AAC.01172-08) PMID: [19188398](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19188398/)
25. Marck C. 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16: 1829–1836. PMID: [2832831](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2832831/)
26. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22: 4673–4680. PMID: [7984417](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7984417/)
27. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25: 3389–3402. PMID: [9254694](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9254694/)
28. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013; 30: 2725–2729. doi: [10.1093/molbev/mst197](https://doi.org/10.1093/molbev/mst197) PMID: [24132122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24132122/)
29. Bagos PG, Liakopoulos TD, Spyropoulos IC, Hamodrakas SJ. A Hidden Markov Model method, capable of predicting and discriminating beta-barrel outer membrane proteins. *BMC Bioinformatics*. 2004; 5: 29. PMID: [15070403](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15070403/)
30. Shannon CE. A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J*. 1948; 27: 379–423, 623–656.
31. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 2233–2239. PMID: [7494007](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7494007/)
32. Turton JF, Shah J, Ozongwu C, Pike R. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 1445–1449. doi: [10.1128/JCM.02467-09](https://doi.org/10.1128/JCM.02467-09) PMID: [20181894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20181894/)
33. Mussi MA, Limansky AS, Viale AM. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 1432–1440. PMID: [15793123](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15793123/)
34. Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A, Tripodi MF, Bagattini M, Cuccurullo S et al. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13: 481–489. PMID: [17430339](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17430339/)
35. Mezzatesta ML, D'Andrea MM, Migliavacca R, Giani T, Gona F, Nucleo E et al. Epidemiological characterization and distribution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Italy. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18: 160–166. doi: [10.1111/j.1469-0691.2011.03527.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03527.x) PMID: [21722261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21722261/)
36. Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Göttig S, Hunfeld KP et al. Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66: 1998–2001. doi: [10.1093/jac/dkr256](https://doi.org/10.1093/jac/dkr256) PMID: [21693460](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21693460/)
37. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(6): 1556–1561. PMID: [10817708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10817708/)
38. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51: 3471–3484. PMID: [17646423](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17646423/)
39. Roca I, Espinal P, Vila-Farres X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front Microbiol*. 2012; 3: 148. doi: [10.3389/fmicb.2012.00148](https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00148) PMID: [22536199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22536199/)
40. Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L et al. Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 3929–3931. doi: [10.1128/AAC.00226-11](https://doi.org/10.1128/AAC.00226-11) PMID: [21646490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21646490/)
41. Mirovic V, Tomanovic B, Lepsanovic Z, Jovcic B, Kojic M. Isolation of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 metallo-beta-lactamase from the urine of an outpatient baby boy receiving antibiotic prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56: 6062–6063. doi: [10.1128/AAC.00838-12](https://doi.org/10.1128/AAC.00838-12) PMID: [22908159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22908159/)

42. Lee Y, Kim CK, Lee H, Jeong SH, Yong D, Lee K. A novel insertion sequence, IS*Aba10*, inserted into IS*Aba1* adjacent to the *bla*(OXA-23) gene and disrupting the outer membrane protein gene *carO* in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 361–363. doi: [10.1128/AAC.01672-09](https://doi.org/10.1128/AAC.01672-09) PMID: [20937784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20937784/)
43. Lu P-L, Doumith M, Livermore DM, Chen T-P, Woodford N. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63: 641–647. doi: [10.1093/jac/dkn553](https://doi.org/10.1093/jac/dkn553) PMID: [19182237](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19182237/)
44. Fonseca EL, Scheidegger E, Freitas FS, Cipriano R, Vicente AC. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil: role of *carO* alleles expression and *bla*_{OXA-23} gene. *BMC Microbiol*. 2013; 13: 245. doi: [10.1186/1471-2180-13-245](https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-245) PMID: [24195496](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24195496/)

RESEARCH ARTICLE

Acinetobacter spp. porin Omp33-36: Classification and transcriptional response to carbapenems and host cells

Katarina Novović¹, Sanja Mihajlović¹, Miroslav Dinić¹, Milka Malešević¹, Marija Miljković¹, Milan Kojić¹, Branko Jovčić^{1,2*}

¹ Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia,

² Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

* bjovcic@bio.bg.ac.rs



OPEN ACCESS

Citation: Novović K, Mihajlović S, Dinić M, Malešević M, Miljković M, Kojić M, et al. (2018) *Acinetobacter* spp. porin Omp33-36: Classification and transcriptional response to carbapenems and host cells. PLoS ONE 13(8): e0201608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201608>

Editor: Zhi Ruan, Zhejiang University, CHINA

Received: April 28, 2018

Accepted: July 18, 2018

Published: August 2, 2018

Copyright: © 2018 Novović et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development, Grant No. 173019 to MK, <http://www.mpn.gov.rs/>. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Acinetobacter baumannii has been recognized as one of the most challenging pathogens in clinical settings worldwide. Outer membrane porins play a significant role in *Acinetobacter* antibiotic resistance and virulence. *A. baumannii* carbapenem resistance and virulence factor porin Omp33-36 was the subject of this study. We investigated the *omp33-36* gene transcriptional response in the growth phase, its response to carbapenems, and the effect of contact with host cells. Additionally, the cytotoxic effect of *A. baumannii* towards keratinocytes was assessed, as well as correlation between *omp33-36* gene transcription and cytotoxicity. Further, *Acinetobacter* spp. Omp33-36 was classified and its characteristics relevant for vaccine candidature were determined. The level of the *omp33-36* gene transcription varied between growth phases, but a common pattern could not be established among different strains. Treatment with subinhibitory concentrations of carbapenems decreased, while contact with keratinocytes increased *omp33-36* expression in the analysed *A. baumannii* strains. Variations in *omp33-36* mRNA levels did not correlate with cytotoxicity levels. Decrease of *omp33-36* mRNA during treatment with subinhibitory concentrations of carbapenems, indicated the importance of transcriptional changes in reversible resistance to carbapenems due to the absence of Omp33-36. The transcription of *omp33-36* increased after contact with keratinocytes, indicating the important role of *de novo* transcription during the initial phase of *A. baumannii* infection. Primary structural analysis of *Acinetobacter* spp. Omp33-36 revealed three distinct groups (among four *A. baumannii* variants). Although we have shown that Omp33-36 was highly polymorphic, we propose a potential antigen (PLAEAAFL motif) for vaccine development. According to PROVEAN analysis, the highly polymorphic structure of Omp33-36 porin should not influence its function significantly.

Introduction

Acinetobacter spp. are causative agents of infections that are predominantly nosocomial in origin, although community-acquired infections are increasingly reported as well [1]. Although

species of the genus *Acinetobacter* are predominantly non-pathogenic, pathogenic members have been recognized as one of the most challenging in clinical settings. *Acinetobacter baumannii* causes the vast majority of *Acinetobacter* infections, followed by *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* [2].

The pathogenic success of *Acinetobacter* species has been enabled by intrinsic resistance to a number of antibiotics, disinfectants and desiccation, as well as by its ability to easily acquire antibiotic resistance and virulence via horizontal gene transfer [1]. The increasing resistance to last resort antibiotics effective against *Acinetobacter*, such as carbapenems, has significantly limited therapeutic options [3]. Furthermore, reported pandrug-resistant *A. baumannii* strains make the situation more alarming [4]. Due to these findings, the World Health Organization (WHO) has positioned carbapenem-resistant *A. baumannii* on the top of the list compiled of pathogens for which new antibiotics are urgently needed [5]. In addition to new antibiotics, active and passive immunization, among other approaches, have been proposed for eradication of *Acinetobacter* infections [1].

The porins involved in the carbapenem resistance of *A. baumannii* are carbapenem resistance-associated outer membrane protein (CarO) and Omp33-36 [6,7]. CarO porin forms a channel with a binding site specific for imipenem, while specific binding sites for carbapenems in Omp33-36 porin have not been described so far [7]. It has been established that Omp33-36 porin participates in *A. baumannii* virulence and fitness [8]. The Omp33-36 porin facilitates adherence, invasion and cytotoxicity of *A. baumannii*, enabling survival in different organs and progression of infection within the host [8]. Additionally, Omp33-36 ability to modulate autophagy of human cells in order to survive within the host represents another aspect of its virulence [9]. Recently, several studies have assessed various outer membrane-associated vaccine candidates against *A. baumannii*, with promising results [10–16]. According to these studies, the Omp33-36 porin could be taken into account as a convenient target candidate for a preventive or therapeutic vaccine effective against *Acinetobacter* infections. It has been shown that cell density, treatment with subinhibitory concentrations of antibiotics and interaction with eukaryotic cells affect *A. baumannii* pathogenicity [17–21]. Although of significance, the role of Omp33-36 in those processes was not sufficiently studied.

In our previous study we revised the CarO porin classification of genus *Acinetobacter* [22]. Accordingly, the aim of this study was to investigate the prevalence and conservation of Omp33-36 porin among the genus *Acinetobacter* in order to establish whether it could be considered a good candidate for vaccine development. Furthermore, the dependence of *omp33-36* transcription on cell density, the effects of carbapenem treatment, and contact with keratinocytes were studied in carbapenem-susceptible and carbapenem-resistant *A. baumannii* in order to assess the contribution of Omp33-36 to the overall pathogenic potential of *A. baumannii*.

Materials and methods

Bacterial strains and species identification

One carbapenem-susceptible (813) and two carbapenem-resistant *A. baumannii* clinical strains (1995/12 –resistance due to oxacillinases production and 4031 –resistance due to oxacillinase production and inactivated *carO* gene) were isolated at the Institute for Mother and Child Health Care "Dr. Vukan Čupić", a tertiary care paediatric hospital in Belgrade, Serbia. The carbapenem-resistant strains were identified by a Vitek 2 automated system (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and amplification of genes for 16S rRNA [23] in our previous study [22], while identification of carbapenem-susceptible strain 813 was done in this study by the same methods.

The *carO* and the *omp33-36* gene analysis

The amplification and analysis of the *carO* and *omp33-36* genes were carried out as previously described [22,24]. The PCR products were purified with a GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Lithuania) and sequenced by the MacroGen service (MacroGen Inc., Netherlands).

Carbapenem susceptibility testing

Carbapenem susceptibility of the strains used in this study was analyzed by the microdilution method, according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing recommendations (<http://www.eucast.org>) [25].

Subinhibitory carbapenem treatment

Bacterial cells were grown in Mueller-Hinton (MH) broth at 37°C with shaking overnight. Strains 813 and 1995/12 were grown in the presence of a subinhibitory concentration (1/10 of minimal inhibitory concentration—MIC—value) of meropenem or imipenem, while strain 4031 was incubated only with 1/10 MIC of imipenem. The selection of antibiotics was based on the role of CarO porin in imipenem resistance [7]. The bacterial cell density at 600nm (OD₆₀₀) was monitored and stopped in different growth phases (early, middle, late exponential and stationary phase). The collected cells were centrifuged at 4500 *x g* for 5 min and used for RNA isolation. As controls, bacterial cells were cultivated in the absence of carbapenems. Experiments were done in triplicate.

HaCaT keratinocyte infection with *A. baumannii*

A HaCaT keratinocyte cell line was cultured in high glucose DMEM supplemented with 2mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS), 100U/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin (Gibco, Life Technologies). For treatment, 1x10⁶ of HaCaT cells were plated in T25 cell culture flasks (Sarstedt, Germany) and incubated at 37°C with 5% CO₂ overnight. Before infection the cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and suspended in the aforementioned medium without antibiotics.

Bacterial cultures were grown in MH broth at 37°C with shaking overnight. The cells (1x10⁸ CFU/ml) were harvested and washed in PBS. After centrifugation at 4500 *x g* for 5 min, the pellets were suspended in high glucose DMEM containing 2mM L-glutamine and 10% FBS.

Infection of HaCaT keratinocytes with *A. baumannii* was performed by addition of the bacterial cell suspension to a flask with HaCaT cells (multiplicity of infection was 100). The HaCaT and *A. baumannii* cells were coincubated at 37°C with 5% CO₂ for 21h. After treatment, the cell culture medium with bacterial cells was centrifuged at 405 *x g* for 5 min to pellet residual non-adherent HaCaT cells. For harvesting bacterial cells, supernatant was centrifuged at 4500 *x g* for 5 min and used for RNA isolation. Controls were incubated and purified as described above, but in the absence of HaCaT cells. Experiments were done in triplicate.

Transcriptional analysis by real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

The total RNA from *A. baumannii* cells was isolated with an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany), with a modified lysis step [26]. DNase I treatment was performed by an Ambion DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Reverse transcription was done with a RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. RT-qPCR was used for determination of *omp33-36* expression level. Primers and conditions applied for RT-qPCR are listed in Table 1 [27]. RT-qPCR was

Table 1. List of primers and conditions used in RT-qPCR.

Primer name	Sequence (5'-3')	Cycling condition	Reference
Omp33-RT_F	GCTTATCAATTTGAAGTTCAAGGTC	95°C/3 min	This study
Omp33-RT_R	GCTTGGTTTAAGAAAGCTGC	95°C/15 s-	
RpoB_For	TCCGCACGTAAAGTAGGAAC	60°C/60s	[27]
RpoB_Rev	ATGCCGCTGAAAAAGTAAC	[40 cycles]	

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201608.t001>

performed with a KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KAPA Biosystems, MA, USA) in a 7500 Real Time PCR System thermocycler (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, MA, USA). Normalization was done against the *rpoB* gene using the $\Delta\Delta C_T$ method (relative) [28]. The obtained values were then normalized against those from the early exponential phase in the absence of carbapenem. Also, the results from each growth phase were compared to those reached in the same phase without carbapenem treatment. Additionally, dependence of *omp33-36* transcription on contact with HaCaT cells was determined by normalization against values acquired from incubation without HaCaT cells. RT-qPCR experiments were done in triplicate.

Cytotoxicity Assay

The cytotoxicity levels after infection of HaCaT keratinocytes with *A. baumannii* cells were measured with a lactate dehydrogenase (LDH) Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Scientific, Lithuania). Quantitative determination of LDH released from dead cells was measured in the collected supernatants according to the manufacture's protocol. The absorbance was measured at 490 nm in a microplate reader (Tecan Austria, GmbH, Austria). Experiments were done in triplicate.

Database search and data analysis

To build the Omp33-36 protein profile the PSI-BLAST [29] homology searches were restricted to either *Moraxellaceae* or *A. baumannii* with an e-value cutoff of $1e-4$. All hits that exhibited at least 27% identity and over 71% of the query fragment length were retained for further analysis. As an Omp33-36 prototype, Omp33-36 CAH40841.2 was used. Proteins with sequence sizes significantly different from the average were removed. Amino acid sequences of Omp33-36 from the NCBI database (S1 File) and sequences from Serbian strains were aligned using Clustal W version 1.7 [30].

Phylogenetic analysis

Phylogenetic trees were constructed using MEGA version 7.0 [31]. The Clustal W multiple sequence alignments were performed using default parameters. The maximum-likelihood (ML) method, using a Jones-Taylor-Thornton (JTT) distance matrix, was used for the construction of an Omp33-36 porin phylogenetic tree. The *A. baumannii* strains from this study were also involved in analysis. A bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates was taken to deduce confidence levels for the ML trees. An online tool (iTOL, v3) for the display and annotation of the tree was used [32].

Topology prediction and analysis of Omp33-36 porin isoforms

Four *A. baumannii* Omp33-36 porin variants were included as representatives of *Acinetobacter* spp. Omp33-36 groups. Transmembrane topology predictions for the Omp33-36 isoforms were performed by PRED-TMBB (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB>) [33].

The Shannon entropy [34] of each amino acid position in Omp33-36, multiple alignments of the three main Omp33-36 groups among *Moraxellaceae*, was calculated using the following equation:

$$H = -\sum_{i=1}^M P_i \log_2 P_i$$

where the P_i is the frequency of amino acid residue i in that site and M is the number of amino acid types. Shannon entropy (H) ranges from 0 (only one residue is represented in a given position) to 4.32 (all 20 residues are equally represented in a given position). The amino acid changes observed in the different Omp33-36 variants relative to the canonical Omp33-36 variant 1 were analyzed using PROVEAN software (<http://provean.jcvi.org/>), which predicts whether an amino acid substitution, insertion or deletion has any impact on the biological function of a protein.

Statistical analysis

All results are presented as mean values \pm standard deviations. One-way ANOVA, followed by Tukey's *post hoc* test, was used to compare multiple treatments. In experiments with HaCaT cells, a Student's *t*-test was performed to compare differences between the control and experimental groups. Values at p 0.05 or less were considered to be statistically significant. All data were analyzed using SPSS 20.0 v.

Results

The strains used in this study were identified as *A. baumannii*. The selection of strains was based on carbapenem resistance phenotype.

The *carO* and *omp33-36* gene analyses

The nucleotide alignment of the *carO* gene (S2 File) in carbapenem-susceptible strain 813, compared to the BLAST database, revealed 99% identity to the corresponding gene of the clinical strain *A. baumannii* C71 from China (KX517489.1), while the nucleotide sequence of *omp33-36* was 100% identical to an outer membrane protein gene of clinical strain *A. baumannii* IOMTU433 from Nepal (AP014649.1, from 219 644 to 218 747 bp). The *carO* and *omp33-36* nucleotide sequences of carbapenem-resistant strains 1995/12 and 4031 were determined in our previous study [22]. Nucleotide sequences of *omp33-36* genes from strains used in this study are reported in S3 File.

Carbapenem susceptibility

The carbapenem susceptibility testing was performed for all strains, with the exception of 4031, which was not tested against meropenem due to its lack of functional CarO porin (Table 2).

Table 2. MIC values determined by microdilution method.

Strain	Imipenem MIC (μ g/ml)	Meropenem MIC (μ g/ml)
813	0.1 (S)	0.1 (S)
1995/12	16 (R)	32 (R)
4031	32 (R)	NT

S-susceptible; R-resistant; NT-not tested.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201608.t002>

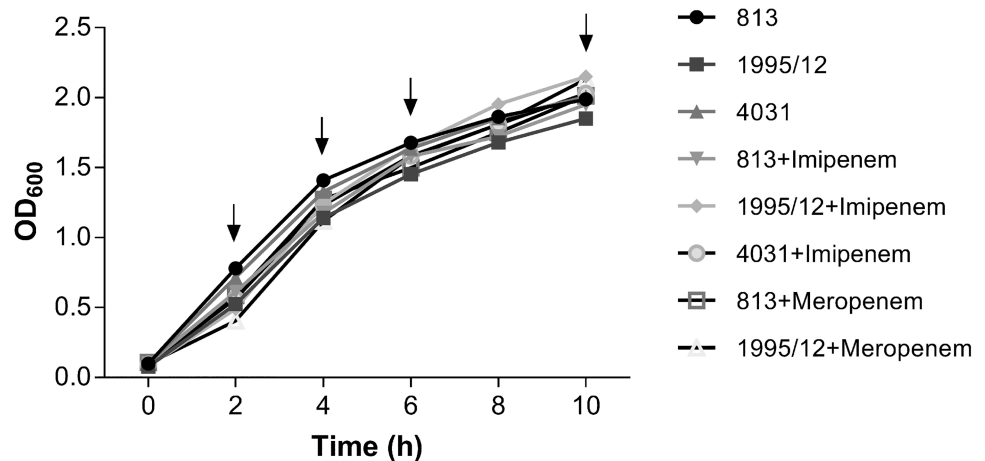


Fig 1. The growth curves of *A. baumannii* strains, untreated or treated with subinhibitory carbapenems (1/10 of MIC value). *A. baumannii* strains were incubated in the presence of a subinhibitory concentration of imipenem (813, 1995/12 and 4031) or meropenem (813 and 1995/12). The arrows indicate time points (2h, 4h, 6h and 10h) in which aliquots were collected for expression analysis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201608.g001>

Effects of growth phase and carbapenems on *omp33-36* gene transcription

The growth curves of carbapenem-treated and untreated strains are presented in Fig 1. Time points corresponding to early (2h), middle (4h), late exponential (6h) and stationary growth phase (10h) were chosen according to measured OD₆₀₀ values. Changes in the *omp33-36* mRNA levels during growth phases and exposure to carbapenems, investigated by RT-qPCR, are presented in Fig 2.

According to the obtained results, transcriptional expression of the *omp33-36* gene varied during different growth phases. All strains have shown a trend of *omp33-36* mRNA level decrease in transition from early to middle exponential phase (Fig 2). After this decrease, strains 813 and 4031 slowly returned to the *omp33-36* mRNA levels starting point (Fig 2A and 2C). In contrast, *omp33-36* mRNA levels showed a constant decline in strain 1995/12 (Fig 2B).

Subinhibitory concentrations of carbapenems reduced *omp33-36* gene transcription throughout growth phases in all strains (Fig 2). The change was most expressive in carbapenem-susceptible strain 813 (Fig 2A). The exception was meropenem treatment in the early exponential phase compared to the untreated control (Fig 2A).

Effect of contact with keratinocytes on the *omp33-36* gene transcription

The impact of contact with HaCaT keratinocytes to the *omp33-36* gene transcription was investigated by RT-qPCR. All strains significantly increased their *omp33-36* mRNA levels after contact with HaCaT keratinocytes (Fig 3). The change was the most prominent in carbapenem-susceptible strain 813, while moderate in carbapenem-resistant strains 1995/12 and 4031 (Fig 3).

Cytotoxic effect of *A. baumannii* strains on HaCaT keratinocytes

The results obtained from an LDH assay demonstrated that the most prominent cytotoxic potential was observed for carbapenem-resistant strain 4031 (56,97 ± 2,9%) followed by carbapenem-resistant strain 1995/12 (28,41 ± 4,7%). Carbapenem-susceptible strain 813 showed the weakest cytotoxicity on HaCaT cells (12,6 ± 1,34%) (Fig 4).

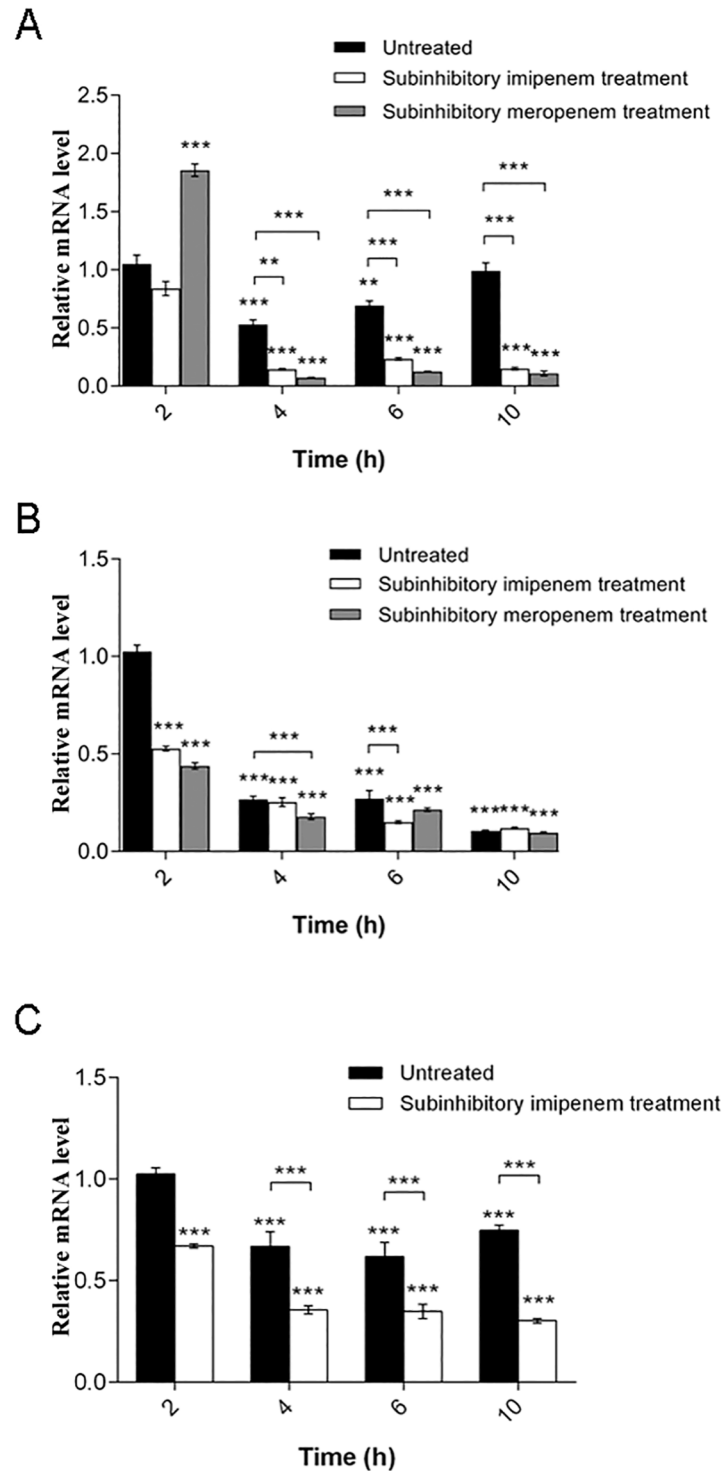


Fig 2. Changes of *omp33-36* mRNA levels during exposure to carbapenems through growth phases. (A) Carbapenem-susceptible strain 813. (B) Carbapenem-resistant strain 1995/12. (C) Carbapenem-resistant strain 4031. All expression results were normalized relative to *rpoB* by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Values are the means from results obtained in triplicate. Error bars represent the standard deviation of the mean value. One-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test was used to compare the gene expression results relative to the expression of the *omp33-36* gene in the early exponential phase of an untreated strain and to the expression of the untreated strain for each time point (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201608.g002>

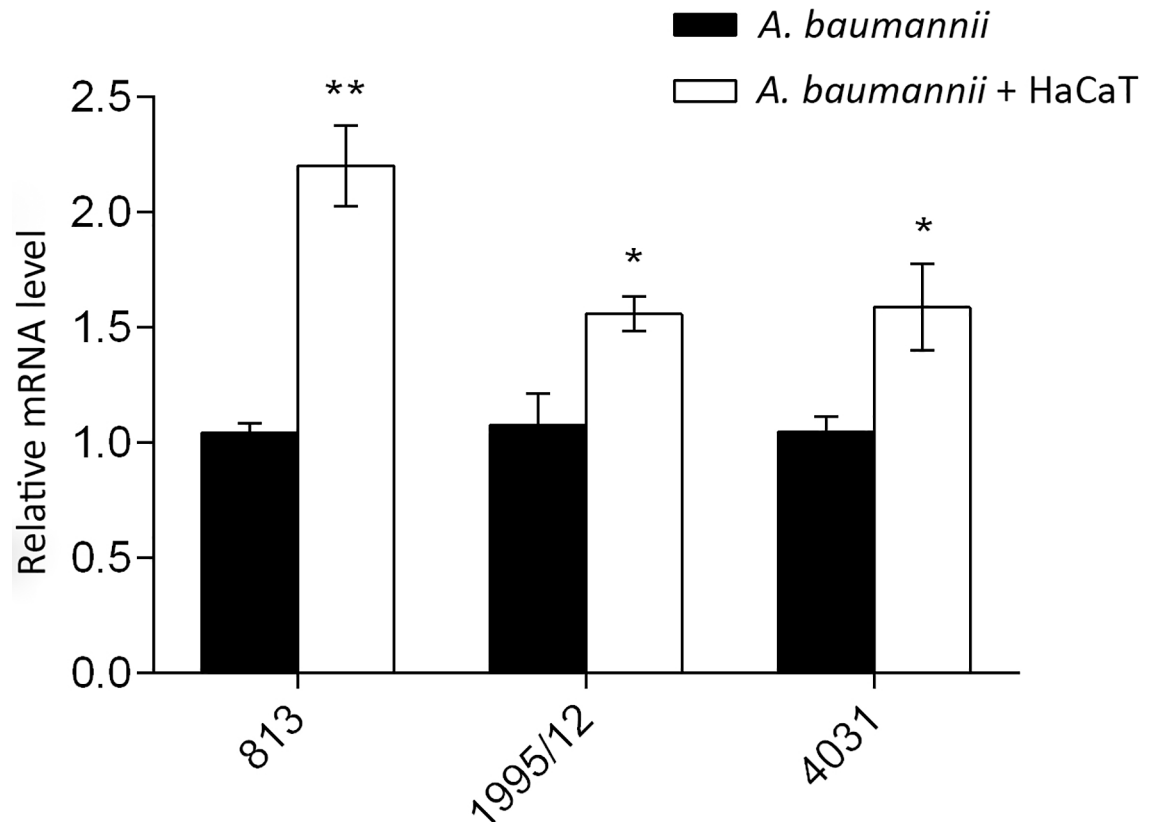


Fig 3. Inducibility of the *omp33-36* gene expression after contact with HaCaT keratinocytes. All expression results were normalized relative to *rpoB* by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Values are the means of results obtained in triplicate. Error bars represent the standard deviation of the mean value. A Student's *t*-test was used to compare the experimental group to the control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201608.g003>

Phylogenetic analysis and polymorphism determination of Omp33-36 porin

The maximum likelihood (ML) phylogenetic analysis of Omp33-36 porins from the *Acinetobacter* genus separated Omp33-36 into three groups (I-III) (Fig 5). Furthermore, ML analysis of only *A. baumannii* species separated Omp33-36 into four clearly distinct isoform groups, referred to as *A. baumannii* Omp33-36 variants 1 to 4 (Fig 6). The most comprehensive, but least conserved, group III, was divided into two *A. baumannii* variants (1 and 2) (Fig 5). The Omp33-36 porin of carbapenem-susceptible strain 813 and carbapenem-resistant strain 1995/12 was classified as variant 2, while the Omp33-36 of carbapenem-resistant strain 4031 belonged to variant 1. The smallest, group II, includes Omp33-36 variant 3, while group I includes variant 4 (Fig 5). Multiple sequence alignment comparisons revealed that 86% of the amino acid positions of Omp33-36 porins were polymorphic. The polymorphic regions, as well as conserved regions, were well defined in all three Omp33-36 groups (Fig 7A). There were 87% polymorphic amino acid positions of Omp33-36 in group I (245 out of 284 amino acid positions), 83% in group II (260 out of 311 amino acid positions), and 87% in group III (310 out of 355 amino acid positions). Omp33-36 group I and II had four variable (V1-V4) and five conserved regions (C1-C5), while group III had six variable (V1-V6) and six conserved regions (C1-C6). Among variable regions, the amino acids of group III and V2 and V3

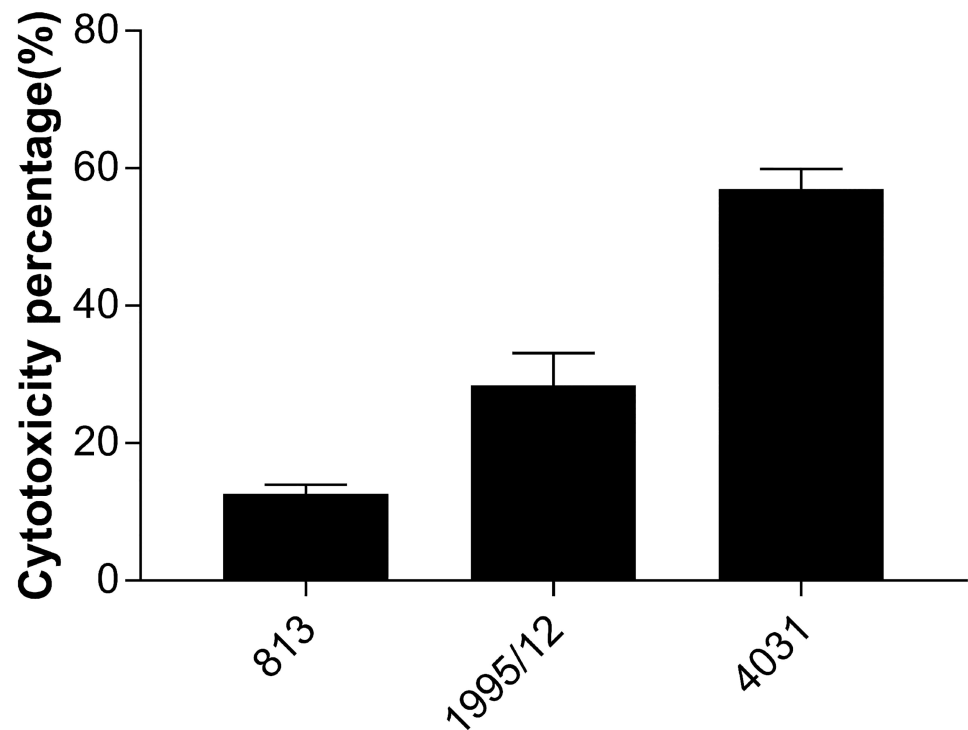


Fig 4. Cytotoxic effect of carbapenem-susceptible and carbapenem-resistant *A. baumannii* strains on HaCaT keratinocyte cells. Cytotoxic levels caused by carbapenem-susceptible strain 813 and carbapenem-resistant strains 1995/12 and 4031 on HaCaT cells were measured by LDH assay. Values are the means from results obtained in triplicate. Error bars represent the standard deviation of the mean value.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201608.g004>

of group I were the most polymorphic, with H mainly higher than 2.5. Regarding the conserved regions, the C4 of group I, C5 of groups II and III at the C terminus, as well as the C1 of group III at the N terminus were the most conserved regions (Fig 7A). Also, the Omp33-36 variants showed the presence of PLAEAAFL motif at their N terminal region, which was conserved among all the analyzed *Acinetobacter* Omp33-36 porins (S4 File).

Transmembrane topology of Omp33-36 porin

Transmembrane topology predictions for Omp33-36 variants 2 and 3 showed the same topology scores, 14 β -strand-spanning regions (β 1- β 14) and seven external loops (L1-L7). However, for the Omp33-36 variants 1 and 4, 12 and 11 β -strand-spanning regions, as well as 6 and 5 external loops were predicted, respectively (Fig 7B).

PROVEAN analysis

In order to correlate Omp33-36 porin with carbapenem resistance, besides expression level, the Omp33-36 primary sequence also has to be considered. PROVEAN analysis was applied to all four *A. baumannii* Omp33-36 variants to reveal whether the change in the primary structure could have an impact on carbapenem resistance. A deleterious effect on variant 1's protein function resulted from 11 distinct amino acid substitutions and 2 deletions. Omp33-36 variant 2 had 22% deleterious amino acid exchanges, 13 amino acid substitutions, 2 deletions and 1 insertion. The PROVEAN analysis of variant 3 revealed that 28.8% of the mutations had a deleterious effect, 13 amino acid substitutions and 8 deletions. Results for members of variant 4

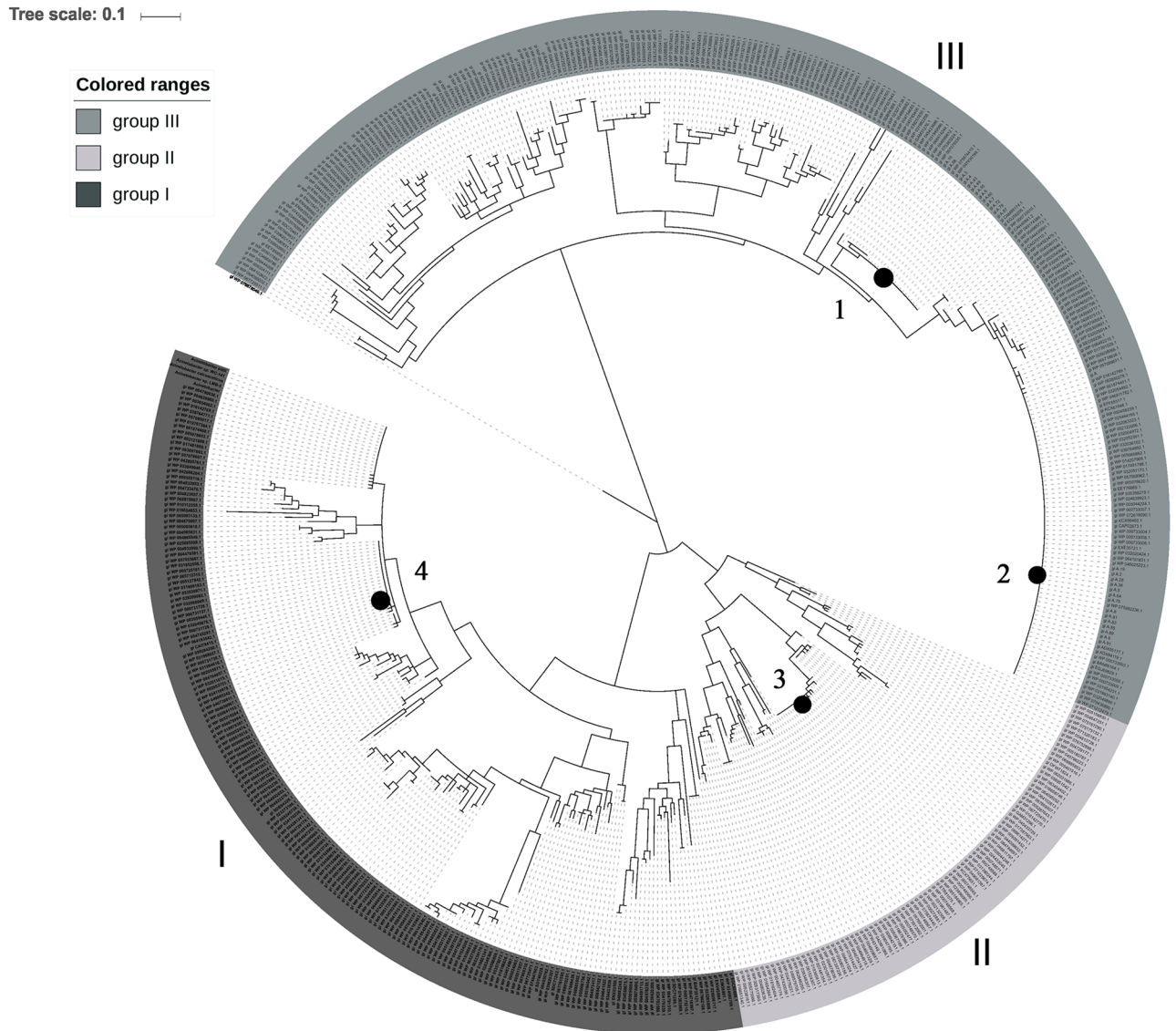


Fig 5. Phylogenetic inferences of Omp33-36 porin among *Acinetobacter* spp. A phylogenetic tree of Omp33-36 porins was constructed with the maximum likelihood (ML) method using a Jones-Taylor-Thornton (JTT) model distance matrix. The confidence levels were calculated from 1000 bootstrap resamples of alignment used for phylogenetic inferences by ML method. The gray shades represent the three distinct groups (I-III) consisting of *Acinetobacter* spp. from the database. *A. baumannii* variants are indicated by black circles. In group I is variant 4 in group II is variant 3 and in group III are variants 1 and 2.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201608.g005>

showed that between 21% and 29.5% of the changes in Omp33-36's primary structure were deleterious, and the changes were quite diverse (61 distinct mutations). There were 49 amino acid substitutions, 9 deletions and 3 insertions (S1 Table).

Discussion

Outer membrane porins have been recognized as important factors contributing to both the antimicrobial resistance and virulence of *Acinetobacter* spp. [3,6–9]. Although the role of Omp33-36 porin in *A. baumannii* pathogenic potential has been tackled previously [3,6,8,9],

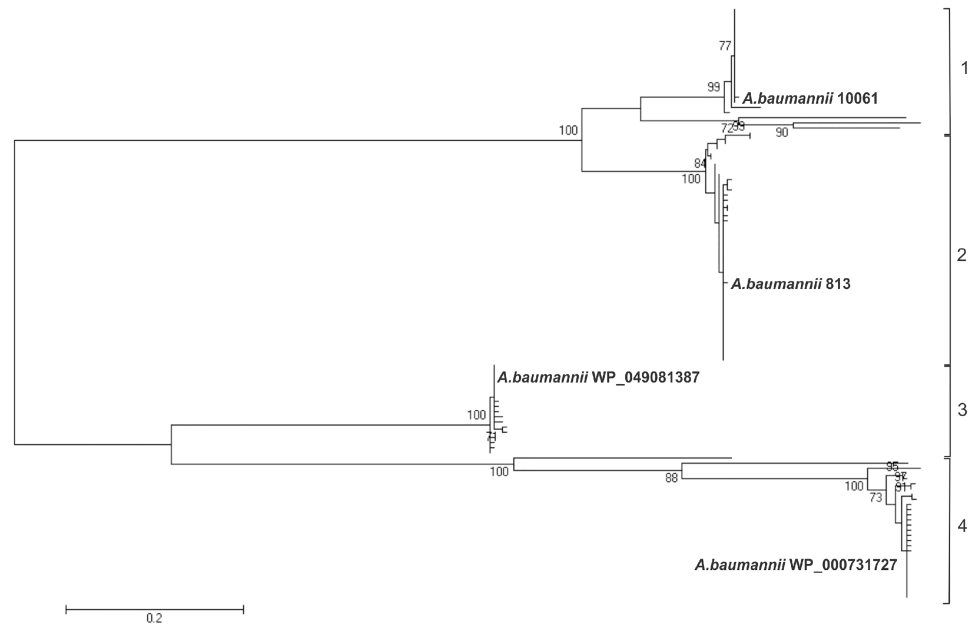


Fig 6. Phylogenetic inferences of Omp33-36 porins among *A. baumannii*. An ML phylogenetic tree was constructed from the Omp33-36 amino acid sequences available in the NCBI database. The corresponding Omp33-36 variant type (1–4) is indicated and given in bold. The representatives of variants 1–4 were 10061 (Omp33-36 from a Serbian *A. baumannii* strain [22]), 813 (Omp33-36 from Serbian *A. baumannii* strain used in this study), WP 049081387 (a putative *A. baumannii* porin from the NCBI database), respectively. The percentage of 1000 bootstrap resamples supporting the different clusters are indicated at the bifurcations (only bootstrap results above 70% are reported).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201608.g006>

data about its gene expression during infection are limited [26,35] and the potential of this porin as a vaccine candidate has been completely neglected.

We investigated the *omp33-36* gene’s transcriptional expression in order to establish its role in reversible resistance to carbapenems caused by inappropriate antibiotic dosing (subinhibitory concentrations of imipenem or meropenem) during different growth phases. Additionally, Omp33-36 porin has been shown to be a virulence factor [8,9], thus we examined the inducibility of the *omp33-36* gene expression during contact with HaCaT keratinocytes. Further, we wanted to determine if there were differences in the transcriptional response of *omp33-36* in one carbapenem-susceptible strain and two carbapenem-resistant strains (with different mechanisms underlying resistance—only production of oxacillinases or in combination with inactivation of the *carO* gene) [22] under the same experimental conditions.

The growth phase dependence of *omp33-36* transcription was undoubtedly demonstrated, since it has been decreased in middle and late exponential phases in all strains. However, the analyzed strains showed different transcriptional responses in the stationary phase. In general, data regarding porin gene expression in *Acinetobacter* spp. are limited and previously it was only observed that the *carO* gene showed significant increase of transcription in the middle exponential phase and subsequent decrease in the following phases, as well as a general trend of decrease of *oprD* gene expression after the early exponential phase [18]. The results obtained in our study indicate that growth phase dependence of the *omp33-36* expression, although showing similar trends, is probably strain-specific, and that correlation with transcription of either the *carO* or the *oprD* genes cannot be taken out. Given that our study analyzed expression at the transcriptional level, the possible variations in the presence of Omp33-36 porin in the outer membrane due to translational or posttranslational regulation should be considered.

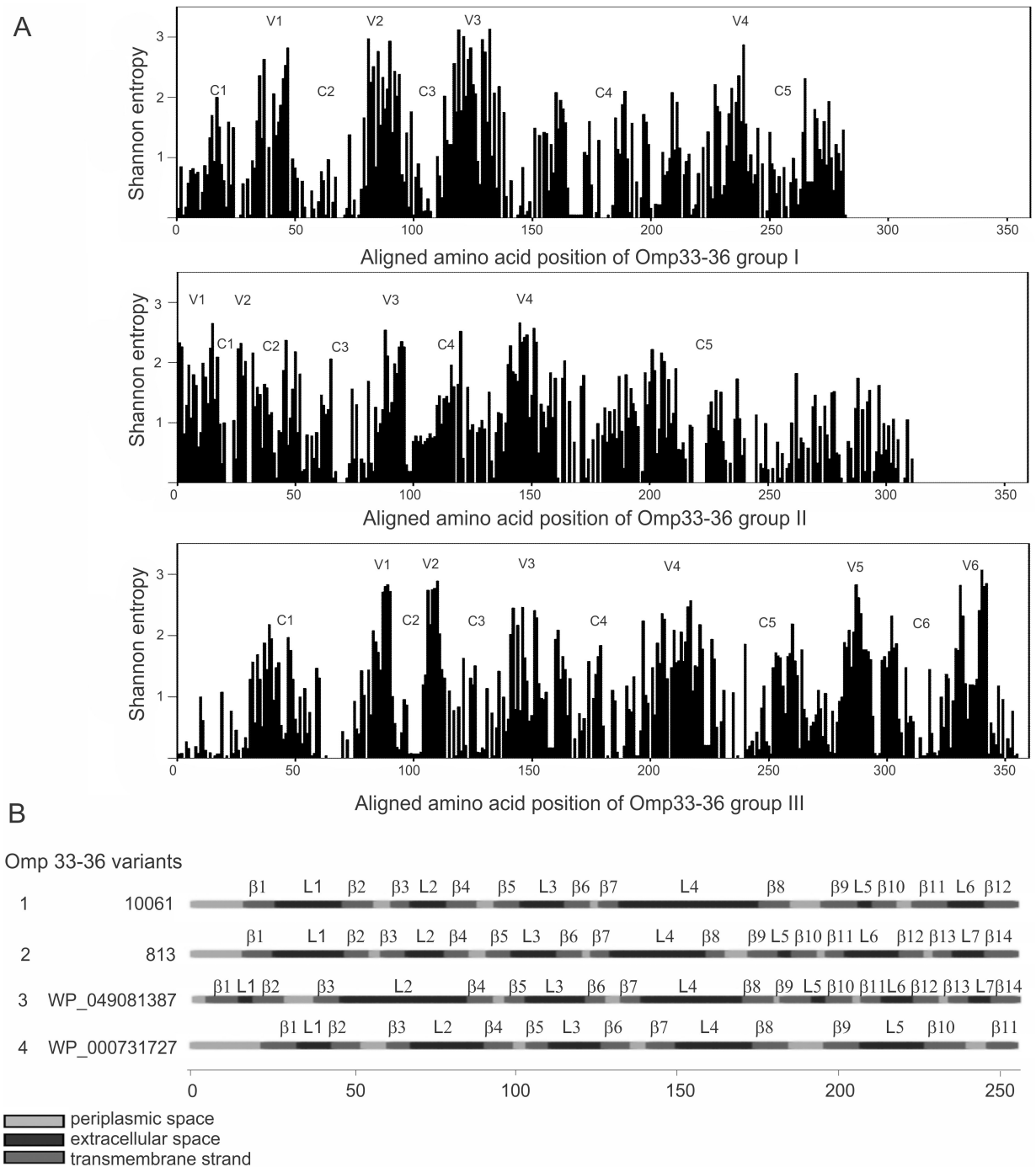


Fig 7. Distinct structural Omp33-36 porins among the *Acinetobacter* spp. population. (A) Shannon variability of Omp33-36 sequences within groups I, II and III. The height of each bar indicates the entropy of an amino acid residue at a given position. The conserved (C1-C6) regions and variable (V1-V6) regions are shown. (B) Predicted transmembrane topology of the different *A. baumannii* Omp33-36 variants (1-4) representing Omp33-36- groups. External loops (L1-L7), transmembrane spanning regions (β 1- β 14) and periplasmic regions are depicted.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201608.g007>

Our results suggest the importance of Omp33-36 porin during adaptation to the presence of carbapenems. The most dramatic change in *omp33-36* expression after treatment with a subinhibitory concentration of carbapenems was detected for the carbapenem-susceptible strain 813. We can assume that this decrease in transcription could further contribute to

reduction of Omp33-36 molecules' number in the outer membrane, limiting entrance of carbapenems and allowing adaptation of the bacteria to new conditions. This indicates how inappropriate carbapenem dosing could lead to reversible resistance, and depicts the role of Omp33-36 during this process. These findings on the hormesis effect of antibiotics, which leads to altered gene expression of resistome genes, are in line with previous studies which have shown that subinhibitory concentrations of antibiotics could lead to amended expression of genetic determinants included in resistance as well as intracellular survival of clinically relevant bacteria [36,37]. Furthermore, the only data that connect the presence of subinhibitory concentrations of antibiotics and the presence of Omp33-36 porin in the membrane are those for tetracycline [35]. Considering that inadequate antibiotic treatment could stimulate the pathogenic properties of clinically relevant bacteria such as *A. baumannii*, controlled and proper antibiotic use is imperative for every single infection treatment [38]. The results obtained in this study support previous conclusions, since carbapenem-susceptible strains can become resistant, and MIC values for carbapenem-resistant bacteria can be increased as a result of exposure of bacteria to subinhibitory concentrations of carbapenems.

Since *Acinetobacter* spp. have been recognized as prominent infective agents which cause wound infections [39], their response to contact with keratinocytes is of great importance. The strains we analyzed showed significant increases of *omp33-36* transcription in the presence of HaCaT keratinocytes. Similarly, the increased production of virulence factor OmpA after incubation of *A. baumannii* in host airway-like conditions was observed in a previous study [20]. Further, the role of Omp33-36 porin in adhesion and invasion of human lung epithelial cells was established previously [8]. Accordingly, our study revealed that interaction with keratinocytes stimulated the transcription of the *omp33-36* gene encoding virulence factor Omp33-36 in *A. baumannii*, indicating that *de novo* synthesis of Omp33-36 porin is important during the initial phases of infection. However, we could not correlate *omp33-36* transcription level and cytotoxicity on HaCaT cells, and we hypothesize that the effect of other virulence factors is more prominent in this interaction than Omp33-36 porin. However, it should be taken into account that the posttranscriptional regulation of *omp33-36* expression, as well as the varying extent of its release in outer membrane vesicles could affect this process [10].

Considering the established importance of Omp33-36 porin in the pathogenicity of *Acinetobacter* spp. [3,6,8,9], the second aim of our study was to classify these outer membrane porins among the genus *Acinetobacter* and species *A. baumannii*. Information about Omp33-36 distribution and conservation are needed for assessment of its potential as a vaccine candidate. This analysis was performed according to our previous study in which we revised the classification of another porin, CarO, included in carbapenem resistance [22]. Since the detected average of amino acid polymorphism was over 80%, Omp33-36 could be considered a polymorphic porin. Accordingly, the organization of conserved regions, as well as transmembrane topology, varied significantly among the three different groups. Unlike previously described conserved outer membrane proteins, which showed efficient vaccine characteristics [10–16], only one conserved motif of eight amino acids (PLAEAAFL) was present at the N-terminal region in all three *Acinetobacter* spp. Omp33-36 groups. Since this motif was part of the outside loop L2 of Omp33-36 group II it could be a potential antigen for induction of antibody production against *Acinetobacter* spp. belonging to this group. The investigation on the immunogenicity of this motif and its role in the possible protection of hosts from *Acinetobacter* spp. need to be elucidated in further studies. Although Omp33-36 showed noticeable polymorphism, the majority of these alterations have no influence on its biological function, according to PROVEAN analysis.

Conclusions

Treatment with subinhibitory concentrations of carbapenems decreased the mRNA levels of *omp33-36*, meaning that inadequate dosing of carbapenem therapy could lead to the development of reversible resistance due to changes in Omp33-36 levels. Contact with keratinocytes increased the expression of *omp33-36*, indicating that the *de novo* synthesis of Omp33-36 is of importance during the initial phases of infection. Bioinformatics analysis revealed the polymorphic structure of Omp33-36 in *Acinetobacter* spp., however, according to PROVEAN analysis, the majority of polymorphism probably does not affect its functionality. We determined a potential antigen region (PLAEAAFL motif) within Omp33-36 from *Acinetobacter* spp. that could be used for vaccine development.

Supporting information

S1 File. Amino acid sequences of Omp33-36 used for bioinformatic analyses.
(TXT)

S2 File. Nucleotide sequence of the *carO* gene from the *A. baumannii* strain 813.
(DOC)

S3 File. Nucleotide sequence of the *omp33-36 kDa* gene from *A. baumannii* strains 813, 1995/12 and 4031.
(DOCX)

S4 File. Amino acid alignment of *A. baumannii* Omp33-36 variant representatives (1–4).
(DOCX)

S1 Table. Deleterious amino acid changes of *A. baumannii* Omp33-36 variants according to PROVEAN analysis.
(DOC)

Acknowledgments

We would like to thank Dr Zorica Vasiljević Institute for Mother and Child Health Care "Dr. Vukan Čupić", Belgrade, Serbia for supplying bacterial strains.

Author Contributions

Conceptualization: Katarina Novović, Branko Jovčić.

Data curation: Sanja Mihajlović, Milka Malešević, Marija Miljković.

Formal analysis: Sanja Mihajlović, Miroslav Dinić, Milka Malešević, Marija Miljković.

Funding acquisition: Milan Kojić.

Investigation: Katarina Novović, Sanja Mihajlović, Miroslav Dinić, Milka Malešević, Marija Miljković.

Methodology: Katarina Novović, Marija Miljković.

Supervision: Milan Kojić, Branko Jovčić.

Validation: Milan Kojić, Branko Jovčić.

Visualization: Sanja Mihajlović, Miroslav Dinić, Milka Malešević, Marija Miljković.

Writing – original draft: Katarina Novović, Branko Jovčić.

Writing – review & editing: Milan Kojić, Branko Jovčić.

References

1. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin Microbiol Rev*. 2017; 30:409–447. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16> PMID: 27974412
2. Al Atrouni A, Joly-Guillou ML, Hamze M, Kempf M. Reservoirs of Non-*baumannii* *Acinetobacter* Species. *Front Microbiol*. 2016; 7:49. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00049> PMID: 26870013
3. Abbott I, Cerqueira GM, Bhuiyan S, Peleg AY. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013; 11:395–409. <https://doi.org/10.1586/eri.13.21> PMID: 23566149
4. Qureshi ZA, Hittle LE, O'Hara JA, Rivera JI, Syed A, Shields RK, et al. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: Beyond carbapenem resistance. *Clin Infect Dis*. 2015; 60:1295–1303. <https://doi.org/10.1093/cid/civ048> PMID: 25632010
5. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017. http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf
6. Del Mar Tomás M, Beceiro A, Pérez A, Velasco D, Moure R, Villanueva R, et al. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:5172–5175. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.5172-5175.2005> PMID: 16304197
7. Catel-Ferreira M, Coadou G, Molle V, Mugnier P, Nordmann P, Siroy A, et al. Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66:2053–2056. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr267> PMID: 21705362
8. Smani Y, Dominguez-Herrera J, Pachón J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis*. 2013; 208: 1561–1570. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit386> PMID: 23908480
9. Rumbo C, Tomás M, Moreira EF, Soares NC, Carvajal M, Santillana E, et al. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect Immun*. 2014; 82:4666–4680. <https://doi.org/10.1128/IAI.02034-14> PMID: 25156738
10. McConnell MJ, Rumbo C, Bou G, Pachón J. Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Acinetobacter baumannii*. *Vaccine*. 2011; 29:5705–5710. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.001> PMID: 21679737
11. Luo G, Lin L, Ibrahim AS, Baquir B, Pantapalangkoor P, Bonomo RA, et al. Active and passive immunization protects against lethal, extreme drug resistant-*Acinetobacter baumannii* infection. *PLoS ONE*. 2012; 7:e29446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029446> PMID: 22253723
12. Badmasti F, Ajdary S, Bouzari S, Fooladi AAI, Shahcheraghi F, Siadat SD. Immunological evaluation of OMV [PagL]+Bap [1-487aa] and AbOmpA [8-346aa]+Bap [1-487aa] as vaccine candidates against *Acinetobacter baumannii* sepsis infection. *Mol Immunol*. 2015; 67:552–558. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.031> PMID: 26277277
13. Huang W, Wang S, Yao Y, Xia Y, Yang X, Long Q, et al. OmpW is a potential target for eliciting protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infections. *Vaccine*. 2015; 33:4479–4485. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.031> PMID: 26207591
14. Garg N, Singh R, Shukla G, Capalash N, Sharma P. Immunoprotective potential of *in silico* predicted *Acinetobacter baumannii* outer membrane nuclease, NucAb. *Int J Med Microbiol*. 2016; 306:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.10.005> PMID: 26614015
15. Huang W, Yao Y, Wang S, Xia Y, Yang X, Long Q, et al. Immunization with a 22-kDa outer membrane protein elicits protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep*. 2016; 6:20724. <https://doi.org/10.1038/srep20724> PMID: 26853590
16. Singh R, Garg N, Shukla G, Capalash N, Sharma P. Immunoprotective efficacy of *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein, FilF, predicted *in silico* as a potential vaccine candidate. *Front Microbiol*. 2016; 7:158. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00158> PMID: 26904021
17. Nucleo E, Steffanoni L, Fugazza G, Migliavacca R, Giacobone E, Navarra A, et al. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol*. 2009; 9:270. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-270> PMID: 20028528

18. Fernando D, Kumar A. Growth phase-dependent expression of RND efflux pump-and outer membrane porin-encoding genes in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 67:569–572. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr519> PMID: 22146875
19. Giannouli M, Antunes LC, Marchetti V, Triassi M, Visca P, Zarrilli R. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infect Dis.* 2013; 13:282. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-282> PMID: 23786621
20. Méndez JA, Mateos J, Beceiro A, Lopez M, Tomás M, Poza M, et al. Quantitative proteomic analysis of host-pathogen interactions: a study of *Acinetobacter baumannii* responses to host airways. *BMC Genom.* 2015; 16:422. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1608-z> PMID: 26025090
21. Dhabaan GN, AbuBakar S, Cerqueira GM, Al-Haroni M, Pang SP, Hassan H. Imipenem treatment induces expression of important genes and phenotypes in a resistant *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60:1370–1376. <https://doi.org/10.1128/AAC.01696-15> PMID: 26666943
22. Novovic K, Mihajlovic S, Vasiljevic Z, Filipic B, Begovic J, Jovcic B. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: Revision of CarO classification. *PLoS ONE.* 2015; 10:e0122793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122793> PMID: 25822626
23. Jovcic B, Begovic J, Lozo J, Topisirovic L, Kojic M. Dynamics of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Arch Biol Sci.* 2009; 61:159–164.
24. Mussi MA, Limansky AS, Relling V, Ravasi P, Arakaki A, Actis LA, et al. Horizontal gene transfer and assortative recombination within the *Acinetobacter baumannii* clinical population provide genetic diversity at the single carO gene, encoding a major outer membrane protein channel. *J Bact.* 2011; 193:4736–4748. <https://doi.org/10.1128/JB.01533-10> PMID: 21764928
25. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0, 2017. <http://www.eucast.org>.
26. Hood MI, Jacobs AC, Sayood K, Dunman PM, Skaar EP. *Acinetobacter baumannii* increases tolerance to antibiotics in response to monovalent cations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:1029–1041. <https://doi.org/10.1128/AAC.00963-09> PMID: 20028819
27. Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Perichon B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:4389–4393. <https://doi.org/10.1128/AAC.00155-10> PMID: 20696879
28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 2001; 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262> PMID: 11846609
29. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389> PMID: 9254694
30. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22:4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673> PMID: 7984417
31. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016; 33:1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054> PMID: 27004904
32. Letunic I, Bork P. Interactive tree of life [iTOL] v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44:W242–245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290> PMID: 27095192
33. Bagos PG, Liakopoulos TD, Spyropoulos IC, Hamdrakas SJ. A Hidden Markov Model method, capable of predicting and discriminating β -barrel outer membrane proteins. *BMC Bioinformatics.* 2004; 5:29. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-29> PMID: 15070403
34. Shannon CE. A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J.* 1948; 27:379–423,623–656.
35. Yun SH, Choi CW, Park SH, Lee JC, Leem SH, Choi JS, et al. Proteomic analysis of outer membrane proteins from *Acinetobacter baumannii* DU202 in tetracycline stress condition. *J Microbiol.* 2008; 46:720–727. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0202-3> PMID: 19107403
36. Davies J, Spiegelman GB, Yim G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9:445–453. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.006> PMID: 16942902
37. Hua X, Chen Q, Li X, Yu Y. Global transcriptional response of *Acinetobacter baumannii* to a subinhibitory concentration of tigecycline. *Int J Antimicrob Agents.* 2014; 44:337–344. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.015> PMID: 25176631

38. Lee CR, Cho IH, Jeong BC, Lee SH. Strategies to minimize antibiotic resistance. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10:4274–4305. <https://doi.org/10.3390/ijerph10094274> PMID: 24036486
39. Mihu MR, Martinez LR. Novel therapies for treatment of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* skin infections. *Virulence*. 2011; 2:97–102. <https://doi.org/10.4161/viru.2.2.15061> PMID: 21321482