

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

DUŠAN J. UŠJAK

**UTICAJ NOVOSINTETISANIH DERIVATA
HALKONA NA RAST, PRODUKCIJU
BIOFILMA I FAKTORE VIRULENCIJE
MULTIREZISTENTNIH SOJEVA
*ACINETOBACTER BAUMANNII***

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

DUŠAN J. UŠJAK

**INFLUENCE OF NEWLY-SYNTHESIZED
CHALCONE DERIVATIVES ON GROWTH,
BIOFILM PRODUCTION, AND VIRULENCE
FACTORS EXPRESSION OF
MULTIRESISTANT *ACINETOBACTER
BAUMANNII* STRAINS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

MENTOR:

Dr Marina Milenković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Dragana Božić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Branka Ivković, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Magdalena Stevanović, naučni savetnik,
Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka
i umetnosti

Dr Miroslav Dinić, naučni saradnik, Univerzitet
u Beogradu – Institut za molekularnu genetiku i
genetičko inženjerstvo

DATUM ODBRANE:

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za mikrobiologiju i imunologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i predstavlja plod saradnje mnogih osoba sa različitih institucija kojima sam neizmerno zahvalan. Ipak, izdvojio bih nekoliko osoba kojima dugujem posebnu zahvalnost:

Na prvom mestu, prof. dr Marini Milenković, mom mentoru, koja mi je nesebično i s velikim entuzijazmom prilikom svakog našeg susreta prenosila svoje bogato znanje i iskustvo. Takođe, profesorki idu najveće zasluge za kreiranje teme i celokupnog koncepta doktorata, a posebno sam joj zahvalan na poverenju koje mi je ukazivala od prvog dana i što mi je pružila neophodnu slobodu i samopouzdanje u osmišljavanju i izvođenju eksperimentalnog rada.

Zahvalnost dugujem i prof. dr Dragani Božić, koja mi je predstavljala veliku podršku, posebno na početku doktorskih studija, kada je bila spremna u svakom trenutku da mi pomogne u rešavanju bilo kakvih dilema. Hvala joj što je sa mnom podelila svoje bogato znanje, kao i na svim savetima koji su mi bili od izuzetne koristi.

Prof. dr Branki Ivković, koja je sintetisala hemijska jedinjenja bez kojih sprovođenje eksperimenata ne bi bilo moguće i koja je takođe uvek bila spremna da pomogne i pruži korisne savete.

Dr Magdaleni Stevanović i dr Nenadu Filipoviću, koji su me teorijski i praktično naučili kako se izvodi karakterizacija ispitivanih materijala. Hvala im i na izuzetno uspešnoj saradnji u eksperimentalnom radu istraživačke oblasti koja nije pokrivena u ovoj disertaciji, a koja je takođe dovela do postizanja visoko kvalitetnih rezultata objavljenih u časopisima od međunarodnog značaja.

Posebno sam zahvalan dr Miroslavu Diniću, koji mi je preneo svoje dragoceno iskustvo i znanje, i pokazao kako na visoko profesionalan način treba da se pristupa istraživačkoj problematici. Svojim vrlo pedantnim pristupom eksperimentalnom radu dao mi je izuzetan primer i ukazao na mnoge detalje koji su mi bili i biće od neprocenjivog značaja.

Hvala i svim ostalim članovima Katedre za mikrobiologiju i imunologiju, profesorima Jeleni, Neveni, Zorici, Brankici i Biljani, docentu Ivanu, kao i tehničarkama Nataši i Vesni na svakodnevnoj podršci i pomoći.

*Zahvalan sam i doktorkama Jasni Perić, Lidiji Bošković, Mirjani Kovačević, Snežani Tomanović i Branki Stošović, koje su nam nesebično ustupile kliničke izolate *Acinetobacter baumannii*, bez kojih sprovođenje eksperimentalnog rada disertacije ne bi bilo izvodljivo.*

Na kraju, zahvaljujem se svojoj porodici, mom bratu Ljubošu i svojim roditeljima, koji su mi oduvek bili i ostali najvernija podrška.

UTICAJ NOVOSINTETISANIH DERIVATA HALKONA NA RAST, PRODUKCIJU BIOFILMA I FAKTORE VIRULENCIJE MULTIREZISTENTNIH SOJEVA *ACINETOBACTER BAUMANNII*

SAŽETAK

Acinetobacter baumannii je nozokomijalni, multirezistentni patogen, koga karakteriše sposobnost perzistencije na neživim površinama i mogućnost veoma brzog sticanja rezistencije na antibiotike. Danas su u svetu rasprostranjeni izrazito rezistentni sojevi protiv kojih u mnogim zdravstvenim ustanovama ne postoji efikasna terapija, a pronalazak alternativnih terapijskih pristupa je od izuzetne važnosti. Halkoni su jedinjenja sa potvrđenim antimikrobnim svojstvima i pokazanim različitim antivirulentnim aktivnostima. Ciljevi istraživanja ovog rada bili su određivanje profila rezistencije, ispitivanje mogućnosti kontaminacije antiseptika i ispitivanje produkcije biofilma identifikovanih kliničkih izolata *A. baumannii*, kao i sinteza derivata hidroksihalkona i ispitivanje njihovih antimikrobnih i antivirulentnih aktivnosti protiv ovih izolata.

Osetljivost izolata na antibiotike ispitana je kombinacijom difuzionih, dilucionih i automatizovanih metoda, a identifikovani kolistin-rezistentni izolati dodatno su podvrgnuti sekvenciranju celog genoma (WGS) i genetički su okarakterisani. Takođe, mehanizmi rezistencije na kolistin ispitani su primenom komparativne analize genoma i *Real-Time* kvantitativne lančane reakcije polimeraze (RT-qPCR). *Time-kill* test je primenjen za ispitivanje perzistencije u antisepticima, a nivo produkcije biofilma ispitano je pod različitim uslovima kultivacije *in vitro* statičkom metodom uz bojenje safraninom. Derivati hidroksihalkona sintetisani su pomoću *Claisen-Schmidt* kondenzacije i njihove antimikrobne aktivnosti, samih i u kombinaciji sa antibioticima, ispitane su bujon-mikrodilucionom, *Time-kill* i *Checkerboard* analizom. Antivirulentne aktivnosti odabranih halkona procenjene su posredstvom uticaja na produkciju biofilma (monomikrobnog i polimikrobnog), vijabilnost biofilmskih ćelija, ekspresiju motiliteta, gensku ekspresiju faktora virulencije (OmpA, Bap i AbaI), adheziju *A. baumannii* na komponente ekstracelularnog matriksa (ECM), kao što su fibronektin i kolagen, i aktivnost sistema međucelijske komunikacije (*Quorum-Sensing*, QS).

Klinički izolati *A. baumannii* gotovo uniformno bili su rezistentni na karbapeneme, a čak skoro 19% izolata bilo je rezistentno na kolistin, pripadajući tako ekstenzivno rezistentnom ili panrezistentnom fenotipu. Izolati su pokazali sposobnost kontaminacije antiseptika i produkcije velikih količina biofilma. Nutritivni sastav hranljivih medijuma značajno je uticao na nivo produkcije biofilma, dok se visok nivo produkcije održao pri širokom opsegu različitih temperatura inkubacije i u prisustvu subinhibitornih koncentracija antibiotika. Sintetisani halkoni ispoljili su umerenu antimikrobnu aktivnost, pri čemu su metoksi-supstituisani derivati u proseku najjače inhibirali rast. Takođe, zabeleženo je nekoliko sinergističkih interakcija halkona sa meropenemom, a inhibicija efluksnih pumpi predložena je kao potencijalni mehanizam. Halkoni su pokazali sposobnost značajne inhibicije motiliteta i produkcije biofilma, a metoksi-supstituisani derivat (o-OCH₃) ispoljio je značajnu antivirulentnu aktivnost posredstvom nishodne regulacije ekspresije *ompA*, *bap* i *abaI* gena i inhibicije adhezije na komponente ECM. Na osnovu ovih rezultata, o-OCH₃ halkon je identifikovan kao potentni antivirulentni agens protiv *A. baumannii*.

Ključne reči: *Acinetobacter baumannii*, multirezistencija, biofilm, halkoni, sinergizam, virulencija, OmpA

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska mikrobiologija

INFLUENCE OF NEWLY-SYNTHEZED CHALCONE DERIVATIVES ON GROWTH, BIOFILM PRODUCTION, AND VIRULENCE FACTORS EXPRESSION OF MULTIRESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* STRAINS

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is a nosocomial, multiresistant pathogen, able to persist on abiotic surfaces and to rapidly acquire antibiotic resistance. Nowadays, highly resistant strains are widely disseminated throughout the world, and the discovery of alternative therapeutic strategies is of utter importance. Chalcones are compounds whose antimicrobial properties are well-known and for which different antivirulence activities have been demonstrated. The aims of this research were to determine resistance profiles, to evaluate the possibility of antiseptic contamination, and to analyze the biofilm production of identified *A. baumannii* clinical isolates, as well as to synthesize hydroxychalcone derivatives and to investigate their antimicrobial and antivirulence activities against these isolates.

Antibiotic susceptibility of the isolates was tested by combination of diffusion, dilution, and automated methods, and additionally, identified colistin-resistant isolates were subjected to whole genome sequencing (WGS) and were genetically characterized. Also, colistin resistance mechanisms were explored by using comparative genome analysis and Real-Time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Time-kill test was used for the measurement of bacterial survival in antiseptics, whereas the level of biofilm production under different cultivation conditions was quantified by *in vitro* static method using safranin stain. Hydroxychalcone derivatives were synthesized by Claisen-Schmidt condensation, and their antimicrobial activities, alone and in combination with antibiotics, were investigated using broth-microdilution, Time-kill, and Checkerboard analyses. Antivirulence activities of selected chalcones were evaluated based on the impact on biofilm production (monomicrobial and polymicrobial), biofilm cell viability, motility, virulence factors (OmpA, Bap, and AbaI) gene expression, fibronectin- and collagen-mediated adhesion, and quorum-sensing (QS) activity.

A. baumannii clinical isolates expressed extensive drug-resistant or pan-drug resistant phenotypes, being nearly uniformly resistant to carbapenems. Almost 19% of isolates were resistant to colistin as well. The isolates proved to be able to contaminate the antiseptic solutions and to produce large quantities of biofilms. Nutritional composition of growth media significantly affected the level of biofilm production. In contrast, wide range of different incubation temperatures and the presence of antibiotics at subinhibitory concentrations had little effect, and the bacteria managed to maintain high level of biofilm production. Moderate antimicrobial activity was displayed by synthesized chalcones, among which methoxy-substituted derivatives achieved greatest growth inhibition in average. Also, synergistic activity of chalcones and meropenem was present in several cases, for which efflux pump inhibition was proposed as the potential mechanism. The chalcones significantly inhibited motility and biofilm production, whereas methoxy-substituted derivative (o-OCH₃) also displayed significant antivirulence activity, by downregulating the *ompA*, *bap*, and *abaI* gene expression and by inhibiting fibronectin- and collagen-mediated adhesion. It can be concluded that o-OCH₃ has been identified as a potent antivirulence agent against *A. baumannii*.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, multiresistance, biofilm, chalcones, synergy, virulence, OmpA

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmaceutical microbiology

SADRŽAJ:

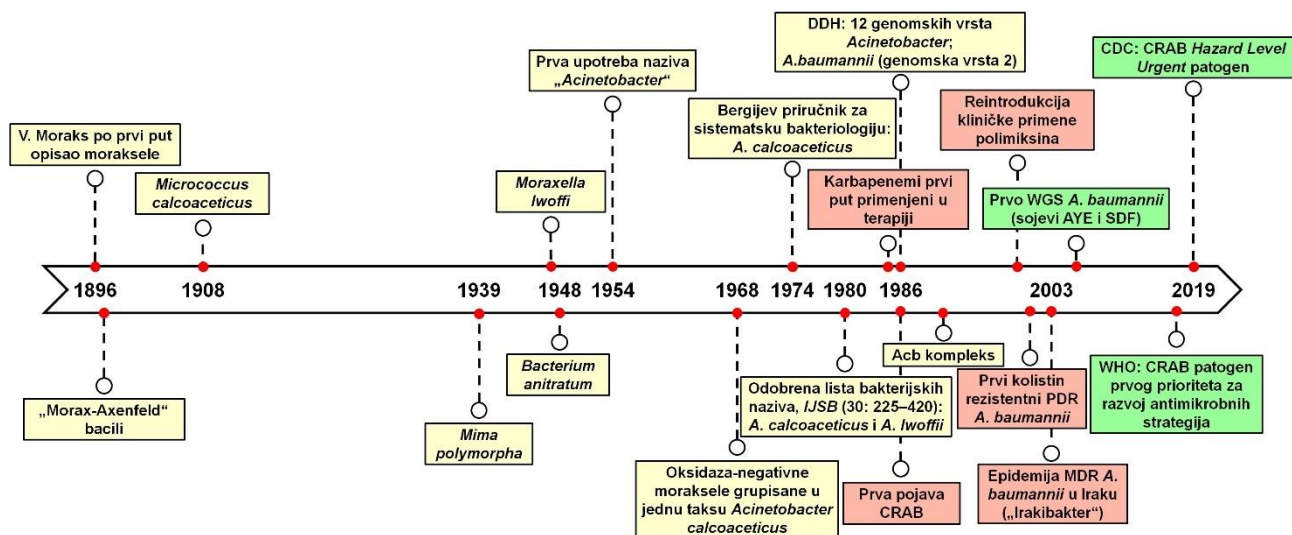
1. UVOD	1
1.1. Perzistencija.....	2
1.1.1. Tolerancija na isušivanje	3
1.1.2. Biofilm.....	4
1.2. Rezistencija	7
1.3. Epidemiologija	13
1.4. Kliničke manifestacije.....	16
1.5. Patogeneza.....	18
1.5.1. Urođeni imunski odgovor	18
1.5.2. Faktori virulencije.....	18
1.6. Terapija infekcija izazvanih <i>A. baumannii</i>	30
1.7. Halkoni	33
2. CILJ RADA	36
3. MATERIJALI I METODE	37
3.1. Izolacija kliničkih sojeva <i>Acinetobacter</i> spp.....	37
3.2. Identifikacija <i>A. baumannii</i>	37
3.3. Ispitivanje osetljivosti na antibiotike.....	39
3.3.1. Ispitivanje osetljivosti na antimikrobne agense primenom VITEK 2 automatizovanog sistema	39
3.3.2. Agar-difuziona metoda	40
3.3.3. Bujon-mikrodiluciona metoda	41
3.4. Genetička karakterizacija kolistin-rezistentnih sojeva <i>A. baumannii</i>	41
3.4.1. Gel elektroforeza u pulsirajućem polju.....	41
3.4.2. <i>Real-Time</i> kvantitativna lančana reakcija polimeraze	42
3.4.3. Sekvenciranje celog genoma	43
3.4.4. Analiza genoma	43
3.4.5. Analiza pan-genoma	43
3.5. Ispitivanje otpornosti izolata <i>A. baumannii</i> iz rana na baktericidno dejstvo antiseptika i topikalnih antibiotika.....	44
3.5.1. <i>Time-kill</i> test	44
3.5.2. Test produkcije biofilma.....	44
3.6. Kvantitativno određivanje produkcije biofilma	44
3.6.1. Produkcija biofilma pri različitim uslovima inkubacije	45

3.6.2. Uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na produkciju biofilma.....	45
3.7. Sinteza i karakterizacija halkona.....	46
3.7.1. Bazno-katalizovana Claisen-Schmidt kondenzacija.....	46
3.7.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom.....	47
3.7.3. Nuklearna magnetna rezonanca.....	47
3.7.4. Elektrosprej jonizaciona masena spektrometrija.....	47
3.7.5. Svetlosna mikroskopija.....	47
3.7.6. Rendgenska difrakciona analiza.....	47
3.7.7. Termalne analize.....	48
3.8. Ispitivanje antimikrobnih, antibiofilmskih i antivirulentnih aktivnosti halkona.....	48
3.8.1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti halkona.....	48
3.8.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti o-OCH ₃ i p-CF ₃ u kombinaciji sa antibioticima.....	48
3.8.3. Ispitivanje uticaja halkona na produkciju biofilma.....	49
3.8.4. Ispitivanje uticaja o-OCH ₃ i p-CF ₃ na motilitet.....	51
3.8.5. Ispitivanje uticaja o-OCH ₃ na gensku ekspresiju biofilm-povezanih faktora virulencije.....	51
3.9. Statistička analiza.....	53
4. REZULTATI.....	54
4.1. Poreklo sojeva i demografski podaci.....	54
4.2. Osetljivost kliničkih izolata <i>A. baumannii</i> na antibiotike.....	54
4.3. Genotipizacija, analiza rezistoma i pan-genom kolistin-rezistentnih izolata <i>A. baumannii</i>	58
4.4. Mehanizmi rezistencije na kolistin.....	61
4.5. Otpornost kliničkih izolata <i>A. baumannii</i> na baktericidno dejstvo antiseptika i topikalnih antibiotika.....	63
4.6. Produkcija biofilma kliničkih izolata <i>A. baumannii</i> pri različitim uslovima.....	67
4.7. Strukture, kristaliničnost i termalne osobine sintetisanih halkona.....	71
4.8. Antimikrobna aktivnost halkona protiv kliničkih izolata <i>A. baumannii</i>	78
4.9. Antimikrobna aktivnost halkona o-OCH ₃ i p-CF ₃ u kombinaciji sa antibioticima protiv kliničkih izolata <i>A. baumannii</i>	81
4.10. Antibiofilmska aktivnost halkona protiv kliničkih izolata <i>A. baumannii</i>	86
4.11. Inhibicija motiliteta kliničkih izolata <i>A. baumannii</i> od strane halkona o-OCH ₃ i p-CF ₃	94
4.12. Antivirulentna aktivnost halkona o-OCH ₃ protiv <i>A. baumannii</i>	98
5. DISKUSIJA.....	100
6. ZAKLJUČCI.....	124
7. LITERATURA.....	126
8. PRILOZI.....	184

1. UVOD

Vrste roda *Acinetobacter* su ubikvitarni, Gram-negativni, striktno aerobni, nefermentativni, katalaza-pozitivni i oksidaza-negativni kokobacili, prosečne dužine 1,5-2,5 µm i širine 1,0-1,5 µm (Baumann *et al.*, 1968). Dugi niz godina nije postojala jasna taksonomska klasifikacija ovih mikroorganizama. Smatra se da ih je švajcarski oftalmolog Viktor Moraks prvi put opisao još davne 1896. godine (Morax, 1896). Nakon toga, 1908. godine je holandski mikrobiolog Martinus Beijerinck izolovao slične organizme iz uzorka zemljišta, kultivacijom na jednostavnoj podlozi obogaćenoj samo kalcijum acetatom i nazvao ih *Micrococcus calcoaceticus* (Beijerinck, 1911). Tokom narednih nekoliko decenija, naučnici su opisali još barem 15 različitih rodova i vrsta sa sličnim karakteristikama, uključujući *Diplococcus mucosus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum*, *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratus* i *Achromobacter mucosus* (Henriksen, 1973). Naziv *Acinetobacter* (grč. *akinetos* (*akivetos*), što znači „nepokretan“) prvi put se pojavljuje 1954. godine na predlog Brizua i Prevoa (Brisou i Prévôt, 1954) kako bi se napravila diferencijacija između pokretnih članova roda *Achromobacter* i nepokretnih acinetobaktera (iako je kasnije utvrđeno da su i *Acinetobacter* spp. pokretljivi). Na osnovu analiza nutritivnih i biohemijskih osobina, sprovedenih tokom 50-ih i 60-ih godina, pokazano je da su sve gore nabrojane vrste metabolički slične oksidaza-negativne moraksele, koje je Bauman zatim grupisao u jedan takson – *Acinetobacter calcoaceticus*, i zaključio da nije moguća dalja subklasifikacija na osnovu fenotipskih karakteristika (Baumann *et al.*, 1968). Period taksonomske turbulencije okončali su Buve i Grimont (Bouvet i Grimont, 1986) kada su upotrebom tehnike DNK-DNK hibridizacije (skr. DDH) identifikovali 12 različitih genomskih vrsta, od kojih su za šest odredili imena vrsta, između ostalog i za *Acinetobacter baumannii* (genomska vrsta 2), dok su ostalih šest imenovali samo brojevima. Pored toga, oni su uspostavili set od 16 diferencijalnih fenotipskih testova, uključujući metabolizam glukoze, hemolitičku aktivnost, korišćenje izvora ugljenika i temperaturne limite za rast (Bouvet i Grimont, 1987), koji su se u obliku naknadno pojednostavljene verzije (Gerner-Smidt *et al.*, 1991) pokazali visoko efikasnim u identifikaciji većine vrsta. Rod *Acinetobacter* je 1991. godine klasifikovan u novu familiju *Moraxellaceae* zajedno sa *Moraxella*, *Psychrobacter* i još nekoliko manje zastupljenih rodova (Rossau *et al.*, 1991), a 14 godina kasnije na osnovu filogenetskih analiza, poređenjem sekvenci 16S rRNK gena, određeno je da ovi mikroorganizmi pripadaju klasi Gammaproteobacteria, razdela Proteobacteria (Juni, 2005). Primenom modernih tehnika genotipizacije, pored inicijalnih 12 genomskih vrsta, danas je identifikovano još preko 60 različitih genomskih vrsta roda *Acinetobacter* (<https://www.bacterio.net/genus/acinetobacter>).

Acinetobacter vrste su široko zastupljene u prirodi i mogu se izolovati iz praktično svih uzoraka životne sredine. U različitim odnosima, zavisno od tipa uzorka (zemljište, površinske vode, životinje, povrće itd.) i klimatskih faktora, najčešće se mogu izolovati vrste *A. calcoaceticus*, *A. pittii*, *A. johnsonii*, *A. guilloiae*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*, *A. haemolyticus* i *A. junii*. Između ostalog, često su prisutni kao sastavni deo humane mikrobiote kože, respiratornog i digestivnog trakta (Peleg *et al.*, 2008). Studije sprovedene u Nemačkoj i Velikoj Britaniji pokazale su da 43% zdravih ispitanika nosi ove bakterije na koži, od toga ubedljivo najčešće *A. lwoffii* (oko 60%) (Seifert *et al.*, 1997; Berlau *et al.*, 1999), dok je u oblastima subtropske klime sastav malo drugačiji, odnosno *A. pittii* je najčešće zastupljen (36%) (Chu *et al.*, 1999). Analizom fecesa je utvrđeno da je kolonizacija intestinalnog trakta prisutna u 25% slučajeva, uz *A. johnsonii* i *A. guilloiae* kao dve najčešće izolovane vrste (Dijkshoorn *et al.*, 2005). *A. baumannii*, vrsta koja ima najveći klinički značaj, retko je zastupljena u životnoj sredini i kao kolonizator ljudske kože (0,5-3%), odnosno intestinalnog trakta (0,8%) (Dijkshoorn *et al.*, 2005).



Slika 1. Vremenski tok najznačajnijih događaja vezanih za *A. baumannii*.

Uprkos širokoj rasprostranjenosti, većina vrsta roda *Acinetobacter* nema klinički značaj. Neke vrste se mogu pronaći jedino u otpadnim vodama ili uzorcima iz životne sredine (*A. baylyi*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. grimontii*, *A. bouvetii*, *A. tandoii* itd.), a neke se mogu izolovati i iz uzoraka humanog porekla, i u ekstremno retkim slučajevima mogu biti povezane sa infekcijama krvotoka (*A. lwoffii*, *A. johnsonii*, *A. guillouiae*, *A. junii*, *A. ursingii*, *A. schindleri*, *A. berezinae*, *A. parvus*, *A. haemolyticus*, *A. radioresistens*, *A. colistiniresistens* itd.) (Nemec i Dijkshoorn, 2010; Zhao i Hu, 2012; Nemec *et al.*, 2017). Infekcije krvotoka izazvane ovim vrstama generalno imaju nisku smrtnost, uzročnici nisu multirezistentni i lako se tretiraju (Dijkshoorn *et al.*, 2007). Klinički relevantnim smatraju se *A. baumannii*, *A. pittii* i *A. nosocomialis*, tri fenotipski i genotipski usko povezane vrste, koje uz nepatogenu vrstu *A. calcoaceticus* i dva oportunistička patogena *A. seifertii* i *A. dijkshoorniae* čine *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Acb) kompleks (Vijayakumar *et al.*, 2019). Ove tri vrste su globalno rasprostranjene u bolničkim sredinama i važni su uzročnici rezistentnih nozokomijalnih infekcija. Rutinski biohemijski testovi za brzu identifikaciju koji se koriste u većini mikrobioloških laboratorija nemaju mogućnost diferencijacije između ove tri vrste, tako da se uzročnici infekcija identifikuju kao Acb kompleks, ili samo *A. baumannii*, zbog najvećeg značaja ove vrste. Ipak, primenom diferencijalnih genotipskih testova, studije su pokazale da *A. baumannii* i jeste ubedljivo najzastupljeniji uzročnik nozokomijalnih infekcija među vrstama Acb kompleksa (>80%) (Vijayakumar *et al.*, 2019).

Dve ključne osobine *A. baumannii*, prouzrokovale su da ova vrsta postane široko zastupljena u zdravstvenim ustanovama i posledično odgovorna za brojne bolničke epidemije širom sveta (Roca *et al.*, 2012):

- Perzistencija u uslovima bolničke sredine;
- Multirezistencija na antimikrobne agense.

1.1. Perzistencija

Većina kliničkih izolata *A. baumannii* može da preživi na različitim površinama bolničke sredine tokom dugog vremenskog perioda, što im omogućava širenje u obliku epidemija. Dva faktora koja najviše doprinose ovoj perzistenciji su: tolerancija na isušivanje i sposobnost formacije biofilma.

1.1.1. Tolerancija na isušivanje

U bolničkoj sredini, neretko se *A. baumannii* može izolovati iz izvora kao što su posteljine, jastuci, dušeci i zaštitne ograde bolničkih kreveta, bolnički nameštaj i medicinska oprema, što su izrazito suve sredine u kojima se bakterijske ćelije suočavaju sa posebnim oblikom stresa – desikacijom (isušivanjem) (Fournier *et al.*, 2006a; Peleg *et al.*, 2008). U jednoj od ranih studija pokazano je da *A. baumannii* može da preživi prosečno 27 dana na suvim staklenim pločicama, znatno duže od ostalih vrsta roda *Acinetobacter* poput *A. johnsonii*, *A. junii* i *A. lwoffii*, što je bio inicijalni pokazatelj selektivne prednosti ove vrste u pogledu opstanka i širenja u suvim uslovima zdravstvenih ustanova (Jawad *et al.*, 1996; Jawad *et al.*, 1998). Kasnije je utvrđeno da se dužina preživljavanja sojeva *A. baumannii* u uslovima desikacije kreće od 20 pa do 100 i više dana (Giannouli *et al.*, 2013; Chapartegui-González *et al.*, 2018).

U uslovima nedostatka vode dolazi do smanjenja intracelularnog hidrostatskog pritiska i indukcije biohemijskih promena koje mogu oštetiti ćelijsku membranu, a sušenje može uzrokovati denaturaciju intracelularnih proteina, oštećenje DNK posredstvom ponavljajućih ciklusa rehidracije i dehidracije, i generisanje reaktivnih oblika kiseonika (eng. *Reactive Oxygen Species*, skr. ROS), koji sami mogu dodatno oštetiti proteine i DNK (Potts, 1994; França *et al.*, 2007). Specifične bakterijske vrste su razvile različite mehanizme odbrane pomoću kojih se štite od štetnih posledica desikacije, a neki od njih identifikovani su kod *A. baumannii*. Bol i saradnici (Boll *et al.*, 2015) su pokazali da hepta-acilacija lipooligosaharida (skr. LOS), komponente spoljašnje membrane ćelijskog zida *A. baumannii*, doprinosi otpornosti na desikaciju, verovatno smanjivanjem izlaska vode i hidrofilnih nutrijenata iz ćelije kroz spoljašnju membranu. Takođe, *A. baumannii* produkuje enzim RecA, koji katalizuje reparaciju DNK posredovanu homolognom rekombinacijom i na taj način štiti bakterijske ćelije od oštećenja DNK uzrokovanih u toku ciklusa dehidracije/rehidracije (Aranda *et al.*, 2011; Norton *et al.*, 2013). Formacija biofilma takođe može biti značajan faktor, zahvaljujući visoko hidratisanom matriksu od ekstrapolimernih supstanci (skr. EPS) i diferencijaciji subpopulacije ćelija u rezistentni, metabolički neaktivni, dormantni oblik (Ophir i Gutnick, 1994; Espinal *et al.*, 2012; Gayoso *et al.*, 2014). Smatra se da i polisaharidna kapsula, koju konstitutivno produkuju ćelije *A. baumannii*, stimuliše otpornost prema desikaciji, verovatno zbog sposobnosti kapsularnih polisaharida da apsorbuju i zadrže velike količine vode u ekstracelularnom prostoru (Espinal *et al.*, 2012; Tipton *et al.*, 2018). Porast intracelularnih koncentracija ROS kao što je H₂O₂, u uslovima desikacije, takođe značajno doprinosi oštećenju ćelijskih komponenti, a neke vrste iz roda *Acinetobacter*, poput *A. gyllenbergii*, spadaju među bakterije sa najvećom zabeleženom tolerancijom prema H₂O₂, posle sporogenih Gram-pozitivnih bakterija (Derecho *et al.*, 2014). *A. baumannii* takođe pokazuje određen nivo otpornosti prema oštećenjima indukovanim H₂O₂, pre svega zahvaljujući produkciji katalaza KatG i KatE (Wright *et al.*, 2017; Farrow *et al.*, 2018). U odgovoru na oksidativni stres, kod određenih sojeva *A. baumannii* dolazi do insercije IS*AbaI* elementa uzvodno od *katG* i posledično hiperekspresije ovog gena (Wright *et al.*, 2017). Kao važan regulator mehanizama rezistencije na različite oblike stresa, uključujući i desikaciju, kod *A. baumannii* identifikovan je i dvokomponentni sistem BfmRS (Farrow *et al.*, 2018). Povećana aktivnost regulatora transkripcije BfmR povezana je sa stimulacijom genske ekspresije KatE katalaze, kao i AbsA proteina, čija funkcija nije okarakterisana, međutim prisustvo konzervisanog N-terminalnog domena koji se nalazi u strukturi mnogih stresom indukovanih proteina, sugeriše da ovaj protein takođe doprinosi otpornosti na stres (Farrow *et al.*, 2018). Osim toga, *bfmR*- mutanti pokazuju smanjenu sposobnost produkcije biofilma i kapsularnih polisaharida, koji takođe doprinose rezistenciji na desikaciju (Tomaras *et al.*, 2008; Geisinger i Isberg, 2015; Geisinger *et al.*, 2018). Konačno, pokazano je da je aktivnost BfmR neophodna za stimulaciju ekspresije gena koji kodiraju biosintezu trehaloze, a poznato je da produkcija kompatibilnih rastvorljivih molekula kao što su trehaloza, manitol i glutamat (svi detektovani kod *A. baumannii*) štiti mikroorganizame od desikacije i drugih oblika osmotskog stresa (Geisinger *et al.*, 2018; Zeidler i Müller, 2019). Na osnovu dosadašnjih istraživanja, može se zaključiti da je rezistencija *A. baumannii* na desikacijom indukovana oštećenja multifaktorskog porekla i da sojevi eksprimiraju desikacija-rezistentan

fenotip, koji je barem delimično zavisian od aktivacije BfmRS sistema (Farrow *et al.*, 2018). Kompleksnost molekularnih mehanizama rezistencije na desikaciju dodatno su nagovestili Vang i saradnici (Wang *et al.*, 2020), koji su primenom transkriptomске analize identifikovali hiperaktivnost translacionog aparata u uslovima desikacije, u smislu povećane genske ekspresije proteina ribozoma, šaperona, proteaza i drugih proteina koji stimulišu translaciju, kao i posledično sintezu brojnih specifičnih proteina sa još nerazjašnjenim funkcijama.

1.1.2. Biofilm

Biofilm predstavlja interaktivnu zajednicu međusobno povezanih agregata mikroorganizama uronjenih unutar matriksa od EPS koje sami produkuju. Mnoge bakterije i gljive formiraju biofilm nakon adhezije za čvrste, žive ili nežive površine, a novija istraživanja su pokazala da u tečnoj sredini postoje i biofilmovi u obliku mobilnih agregata (Vert *et al.*, 2012). Procenjuje se da na površini zemlje oko 80% prokariotskih ćelija egzistira u okviru biofilmskih struktura (Flemming i Wuertz, 2019). Proces formacije biofilma se može podeliti u četiri faze (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; McDougald *et al.*, 2012; Bjarnsholt *et al.*, 2013; Jenal *et al.*, 2017; Ahmad *et al.*, 2020):

1. Adhezija ćelija mikroorganizama na živu ili neživu površinu, posredstvom specifičnih adhezin-receptor interakcija, kao i nespecifičnih hidrofobnih ili elektrostatičkih interakcija. U ređim slučajevima, inicijaciju formiranja biofilma može pokrenuti samo međusobna adhezija između većeg broja ćelija mikroorganizama što rezultira nastankom mobilnih biofilmova.
2. Vezani mikroorganizmi počinju da se razmnožavaju deobom i na taj način nastaju male mikrokolonije ili agregati prosečne širine 5-200 μm od prosečno oko 100 ćelija. U toku početnog razmnožavanja, ćelije sekretuju sekundarni glasnik ciklični diguanozin-monofosfat (c-di-GMP), koji se vezuje za receptore na okolnim ćelijama i pokreće signalne puteve koji rezultiraju opsežnim modifikacijama u genskoj ekspresiji i diferencijaciji planktonskih ćelija u tzv. biofilmske ćelije. Pri kraju druge faze, ove biofilmske ćelije počinju da proizvode EPS.
3. Proizvodnjom EPS formira se matriks i biofilm poprima trodimenzionalni oblik, na taj način što poraste u visinu najčešće preko 100 μm . Ova faza se naziva sazrevanje biofilma, a matriks omogućava povezivanje nekoliko odvojenih grupa mikrokolonija, između kojih formira vodene kanale koji olakšavaju transport nutrijenata. Ova faza je skoro isključivo regulisana faktorima spoljašnje sredine, nezavisna od c-di-GMP. Osim toga, sistem međućelijske komunikacije (eng. *Quorum-Sensing*, skr. QS) koji reguliše transkripciju mnogih biofilm-zavisnih genskih regiona, a sastoji se od autoinduktorskih signala čije je generisanje zavisno od gustine ćelijske populacije (kvorum), je najaktivniji u ovoj fazi.
4. Kada spoljašnji signali indikuju da se u okolini biofilma nalaze nepovoljni uslovi (npr. istrošenost izvora ugljenika), na celularnom nivou dolazi do stimulacije produkcije fosfodiesteraza koje razgrađuju c-di-GMP, prestaje produkcija proteina koji održavaju ćelije u biofilmu, sekretuju se enzimi poput disperzina B, i rezultat je disperzija ćelija, povratna diferencijacija u planktonski oblik i potraga za novom sredinom sa povoljnim uslovima, gde će dispergovane ćelije eventualno inicirati formaciju novog biofilma. Osim toga, do disperzije često dolazi i nekontrolisanim odvajanjem većih grupa ćelija, npr. dejstvom mehaničkih sila na biofilm.

Biofilm kao struktura na više načina doprinosi stabilnosti i perzistenciji uronjenih ćelija mikroorganizama, kako u neživim tako i u živim sredinama (Koo *et al.*, 2017; Hall i Mah, 2017). Ključnu ulogu ima matriks koji je najvećim delom sastavljen od visoko hidratiranih EPS: egzopolisaharida odgovornih za arhitekturu i strukturni integritet biofilma, međusobno vezivanje agregata ćelija i održavanje veze sa čvrstom površinom; ekstracelularna DNK (eDNK) koja doprinosi stabilnosti unakrsnim povezivanjem egzopolisaharida; i proteina sa specifičnim funkcijama (Flemming *et al.*, 2016). Specifičan sastav matriksa obezbeđuje biofilmu

viskoelastičnost koja mu omogućava održavanje kompaktnosti pod uticajem fizičkih stresora kakve su hidrodinamičke ili mehaničke sile manjeg intenziteta (Peterson *et al.*, 2015). Takođe, biofilm ima visok kapacitet samoodrživosti zbog sorpcije egzogenih i endogenih nutrijenata od strane EPS i površina ovojnica gusto naseljenih ćelija, kompleksnog enzimskog sastava matriksa koji omogućava reciklažu proizvoda metabolizma, konstantnog remodelovanja matriksa i ćelijskog sastava, i zbog visokog kapaciteta EPS da apsorbuju vodu (Flemming i Wingender, 2010). Osim toga, zbog trodimenzionalne strukture, unutar biofilma su prisutni heterogeni uslovi u smislu različite dostupnosti nutrijenata, elektronskih akceptora, elektronskih donora i drugih molekula, koji dovode do toga da pojedinačne ćelije na nivou mikrohabitata pokazuju diferencijalnu metaboličku aktivnost i diferencijalnu ekspresiju genotipova i fenotipova. Rezultat je egzistencija heterogenih populacija ćelija, koja se u najekstremnijem obliku najbolje ogleda u metabolički kompletno neaktivnim, dormantnim ćelijama, tzv. perzistorima, prisutnim u najdubljim slojevima biofilma, gde ni izvori ugljenika, ni elektronski akceptori nemaju pristup, međutim ćelije ipak ostaju vijabilne tokom dugog vremenskog perioda (Stewart i Franklin, 2008). Ova heterogenost značajno doprinosi samoodrživosti biofilmske zajednice, a činjenica da se pored diferencijalnih ćelija iste vrste, u sastavu biofilma tipično nalaze i ćelije različitih vrsta i rodova, pa čak i različitih kraljevstava mikroorganizama, dodatno ističe kompleksnost interakcija prisutnih u okviru ove strukture (Stacy *et al.*, 2016).

Biofilm snabdeva ćelije mikroorganizama sa nekoliko dodatnih mehanizama rezistencije i tolerancije na antimikrobne agense (Hall i Mah, 2017). Pri tome se pod pojmom rezistencije podrazumeva biofilm-zavisni stečeni mehanizam rezistencije, koji se vertikalno prenosi na potomstvo i opstaje i u odsustvu biofilmske strukture, a pod pojmom tolerancije, neosetljivost na baktericidnu ili inhibitornu koncentraciju antimikrobnog agensa koja se gubi prelaskom u planktonski oblik života (Brauner *et al.*, 2016). Jedan od primera tolerancije je smanjena difuzija antimikrobnih agenasa zbog sorpcije i inaktivacije prilikom prolaska kroz gusto naseljen matriks, tako da se u dubljim slojevima biofilma ne mogu postići efektivne koncentracije (Tseng *et al.*, 2013). Drugi primer su ćelije sa usporenim metabolizmom, ili metabolički neaktivni perzistori, koji su neosetljivi na visoke koncentracije bakteriostatskih antibiotika, a imaju sposobnost repopulacije mesta infekcije nakon eradikacije svih metabolički aktivnih biofilmskih ćelija (Lewis, 2010). U mnogim zonama biofilma prisutna je i hipoksija kao posledica smanjene difuzije elektronskog akceptora kiseonika u dublje slojeve, a ćelije u okviru ovih zona su otpornije na dejstvo mnogih antibiotika, za koje je indukcija oksidativnog stresa pretpostavljeni mehanizam baktericidnog dejstva (Borriello *et al.*, 2004). Takođe, sekrecija β -laktamaza, koje se sorpcijom zadržavaju u matriksu i štite od β -laktamskih antibiotika sojeve koji ne proizvode β -laktamaze a nalaze se u okviru iste zajednice, je samo još jedan primer od mnogih mehanizama tolerancije koje biofilm pruža mikroorganizmima (Bagge *et al.*, 2004). Biofilm takođe značajno doprinosi generisanju rezistentnih sojeva, s obzirom da je horizontalni genski transfer (skr. HGT) značajno stimulisan u uslovima visoke ćelijske gustine, kao i zahvaljujući prisustvu eDNK, i sorpciji i posledičnoj akumulaciji mobilnih genetičkih elemenata, poput integrona, u matriksu. Uzimajući u obzir polimikrobnu prirodu većine biofilmova, ove strukture predstavljaju primarna mesta za razmenu genskih determinanti rezistencije između rezistentnih vrsta mikroorganizama (Madsen *et al.*, 2012). Krol i saradnici (Król *et al.*, 2013) su pokazali da se konjugacija, jedan od vidova HGT, odvija oko 700 puta efikasnije u biofilmovima u poređenju sa planktonskim oblikom života. Takođe, pokazano je da u biofilmovima ćelije učestalije mutiraju, što povećava verovatnoću spontanog sticanja rezistencije, a zbog heterogenih zajednica prisutna je i mogućnost razvoja malih kolonijalnih varijanti (eng. *Small Cell Variants*, skr. SCVs) sa izmenjenim fenotipovima koje često uključuju i smanjenu osetljivost na određene antibiotike (Proctor *et al.*, 2006; Driffield *et al.*, 2008).

A. baumannii spada među bakterije koje proizvode značajne količine biofilma (Thummeepak *et al.*, 2016) i može proizvoditi biofilm na širokom rasponu različitih površina materijala i nameštaja iz bolničkog okruženja, uključujući staklo, porcelan, nerđajući čelik, gumu, i

polikarbonatnu i polipropilensku plastiku (Greene *et al.*, 2016). Proizvodnja biofilma na neživim površinama doprinosi perzistenciji ove vrste u bolničkoj sredini tako što pruža zaštitu od delovanja fizičkih stresora, doprinosi rezistenciji na desikaciju pre svega zahvaljujući visoko hidratiranim EPS i doprinosi toleranciji na dezinfekciona sredstva, usled smanjene difuzije u dublje slojeve biofilma. Pored toga, biofilm koji je tipično polimikrobne prirode, pruža idealnu sredinu *A. baumannii* za razmenu genskih determinanti rezistencije sa ostalim bolničkim multirezistentnim patogenima kao što su *Pseudomonas aeruginosa*, vrste familije Enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus* i dr. Konačno, produkcija biofilma na medicinskim uređajima poput endotrahealnih tuba, i intravaskularnih i urinarnih katetera, omogućava *A. baumannii* premošćavanje epidermalnih i epitelnih barijera imunskog sistema, i uspostavljanje infekcija u obliku pneumonije, bakterijemije i infekcija urinarnog trakta (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Gil-Perotin *et al.*, 2012; Colquhoun i Rather, 2020). *A. baumannii* proizvodi značajne količine biofilma i na živim površinama. Pre svega, kod infekcija kože i mekih tkiva, *A. baumannii* egzistira u okviru robusnih biofilmova, kako na ranama, tako i na okluzivnim zavojima (Thompson *et al.*, 2014). Produkcija biofilma *in vivo*, u slučaju *A. baumannii*, snažno stimuliše antimikrobnu rezistenciju, a kao jedan od važnijih mehanizama (pored gore navedenih) smatra se i hiperekspresija efluksnih pumpi, regulisana biofilm-zavisnim signalima (Alav *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019). Osim toga, specifična struktura biofilma doprinosi otpornosti prema odgovoru imunskog sistema, i hidrodinamskih sila prouzrokovanih protokom krvi i drugih telesnih tečnosti. Povezanost između nivoa produkcije biofilma i kliničkog ishoda infekcije izazvane određenim izolatom *A. baumannii* ipak nije pokazana, međutim postoji nekoliko opisanih potvrđenih ili potencijalnih faktora virulencije, čija je ekspresija direktno zavisna od nivoa produkcije biofilma.

Velika plastičnost genoma *A. baumannii* uzrokuje značajne soj-specifične varijacije u ekspresiji faktora virulencije povezanim sa formacijom biofilma, uključujući inicijalnu adheziju kao i kasnije sazrevanje, i posledično soj-specifične varijacije u količini proizvedenog biofilma pri različitim uslovima (Colquhoun i Rather, 2020). Među najkonzervisanije gene spadaju CsuE subjedinica Csu pila (pili tipa I) i OmpA (81-100%). Bap protein koji je značajan u adheziji i sazrevanju biofilma ima varijabilnu kodirajuću sekvencu, uz oko 30-66% konzervisanosti (Badmasti *et al.*, 2015; Zeighami *et al.*, 2019; Skerniskyte *et al.*, 2019). Kao druge dve češće homologne varijante ovog proteina identifikovani su Bap-slični proteini BLP-1 i BLP-2 (De Gregorio *et al.*, 2015). Csu pili sastavljeni su od transportnih proteina CsuC/D, površinskih subjedinica CsuA/B, kao i CsuE subjednice koja se nalazi na samom vrhu i ostvaruje hidrofobne interakcije sa hidrofobnim džepovima neživih površina. Uloga Csu pila u adheziji na žive površine, međutim, nije dokazana (Tomaras *et al.*, 2003; de Breij *et al.*, 2009; Pakharukova *et al.*, 2018). OmpA takođe učestvuje u adheziji na nežive površine, nepoznatim mehanizmom, ali i u vezivanju za humane epitelne ćelije i hife *Candida albicans*, a pokazana je i direktna korelacija između količine proizvedenog biofilma na plastičnim površinama i nivoa ekspresije *ompA* (Gaddy *et al.*, 2009). Bap je važan u adheziji na humane bronhijalne ćelije, doprinosi vezivanju za nežive površine, međusobnoj adheziji biofilmskih ćelija, a takođe je esencijalan u fazi sazrevanja biofilma, u smislu formacije vodenih kanala i sticanja strukturnog integriteta biofilmske strukture (Loehfelm *et al.*, 2008). Među ostale identifikovane faktore virulencije, povezane za kapacitetom produkcije biofilma, spadaju pili tipa IV i ostali pili tipa I (Pap, Prp i CUP2), QS sistem-zavisne komponente, poli- β -1,6-*N*-acetilglukozamin (skr. PNAG), Ata i Zur-regulisani lipoprotein ZrlA, čije će uloge u virulenciji biti detaljnije opisane u kasnijem tekstu. Takođe, nivo produkcije biofilma je zavisn od aktivnosti regulacionih dvokomponentnih sistema (eng. *Two-Component System*, skr. TCS), pre svega BfmRS, kao i GacSA i AdeRS (Colquhoun i Rather, 2020). Kao i u slučaju mehanizma rezistencije na desikaciju, uzimajući u obzir veliku varijabilnost genske ekspresije među različitim sojevima *A. baumannii*, može se zaključiti da je i sposobnost formacije biofilma kompleksno regulisan proces, čemu dodatno ide u prilog otkriće da brojne male regulatorne RNK (skr. sRNK) utiču na sposobnost formacije biofilma, kao i na aktivnost QS sistema. Alvarez-Fraga i saradnici (2017) su identifikovali diferencijalnu ekspresiju 60 sRNK, poredivši biofilmske i planktonske

ćelije *A. baumannii* ATCC 17978. Takođe su pokazali da je ekspresija sRNK 13573 povećana 120 puta kod biofilmskih ćelija u odnosu na planktonske. Štaviše, hiperekspresija sRNK 13573 rezultirala je dvostrukim povećanjem formacije biofilma kod ovog soja. Da je molekularni mehanizam produkcije biofilma kod *A. baumannii* još uvek u velikoj meri nepoznat, potvrdila je i meta-analiza koju su sprovedli Colquhoun i Rather (2020), u okviru koje su utvrdili postojanje ukupno 132 diferencijalno, biofilm-zavisno, ushodno regulisanih gena, analizom sedam različitih sojeva. Od toga najviše proteinskih proizvoda ovih gena ima ulogu u metabolizmu (49 gena) i translaciji (30 gena), a veliki broj čine i proteini spoljašnje membrane (29 gena). Ostali proteini imaju ulogu u transkripciji, vezivanju i motilitetu, a za određen broj kodiranih proteina uloga još uvek nije poznata.

1.2. Rezistencija

Sposobnost preživljavanja u suvim uslovima tokom dugog vremenskog perioda, uz stabilnost i otpornost formiranih biofilмова, pruža mogućnost *A. baumannii* da perzistira u bolničkom okruženju, što je primarni faktor važan za opstanak i širenje epidemijskih sojeva. Drugi faktor koji je neophodan kako bi određena vrsta mikroorganizma stekla prirodnom selekcijom prednost nad osetljivim vrstama, u sredini gde je prisutna opsežna primena antimikrobnih agenasa različitih mehanizama dejstva kao što je bolnica, jeste sposobnost sticanja genskih determinanti rezistencije. Zaista, *A. baumannii* poseduje neverovatnu sposobnost brzog sticanja rezistencije na antimikrobne agense sa kojima dolazi u kontakt, što ga, uz postojeću intrinzičku rezistenciju na nekoliko često klinički propisanih antibiotika, čini jednim od najrezistentnijih mikroorganizama.

A. baumannii je intrinzički rezistentan na aminopeniciline (npr. amoksicilin i ampicilin), cefalosporine prve i druge generacije i hloramfenikol (Vila *et al.*, 1993; Seifert *et al.*, 1993). Pored toga, ovaj patogen je adaptiran za sticanje velikog broja determinanti rezistencije, posredstvom HGT, iz drugih multirezistentnih bakterija, kao što su pre svega *Pseudomonas* spp. i vrste iz familije Enterobacteriaceae poput *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp. i *Escherichia coli* (Fournier *et al.*, 2006b). Sekvenciranjem genoma multirezistentnih (eng. *Multi-Drug Resistance*, skr. MDR) sojeva *A. baumannii* identifikovano je nekoliko genomskih ostrvaca u okviru kojih se nalaze grupisane stečene determinante rezistencije, zajedno sa mobilnim genetičkim elementima integronima, transpozonima i insercionim sekvencama (skr. IS) (Imperi *et al.*, 2011). Organizacija stečenih gena rezistencije u okviru genoma se u velikoj meri razlikuje između sojeva. Na primer, soj AYE iz IC I (internacionalni klon I) loze, sadržao je jedno ogromno ostrvce AbaR1 od 86 kb, u okviru kojeg se nalazilo 45 od ukupno 52 determinante rezistencije, dok je soj ACICU iz IC II (internacionalni klon II) loze imao ravnomerno distribuirane determinante rezistencije u okviru 14 ostrvaca (Fournier *et al.*, 2006b; Iacono *et al.*, 2008). Osim toga, na ACICU soju je demonstrirano da *A. baumannii* može modifikovati rezistentni profil i preuređivanjem postojećih gena, pošto su detektovana tri genomska tipa u okviru jedne bolničke epidemije (Snitkin *et al.*, 2011). To svedoči o velikoj genomskoj plastičnosti koju ovaj patogen poseduje, koja je posledica toga što konzervisani deo koji kodira esencijalne funkcionalne strukture čini svega oko 60% od ukupnog genoma (oko 2200 genskih sekvenci) jednog organizma, dok se ostatak, tzv. pomoćnički genom, može slobodno menjati i adaptirati zavisno od spoljašnjih faktora, što se najviše ogleda u velikoj varijabilnosti virulentnih osobina i stepena rezistencije između pojedinačnih sojeva (Imperi *et al.*, 2011; McConnell *et al.*, 2013). To potvrđuje i činjenica da je analizom pan-genoma skoro 2500 javno dostupnih genomskih sekvenci različitih izolata *A. baumannii* detektovano čak oko 20000 različitih genskih sekvenci (Mangas *et al.*, 2019). Ovakva specifična struktura genoma dovodi do ushodne regulacije genskih elemenata rezistencije prilikom izlaganja određenom antibiotiku, što pored visoke frekvencije HGT i mutacija doprinosi rezistenciji *A. baumannii* (Peleg *et al.*, 2008). Mehanizmi rezistencije *A. baumannii* baziraju se na enzimskoj inaktivaciji, aktivnom efluksu i smanjenom inluksu lekova, i modifikaciji ciljnih mesta dejstva lekova (Poirel *et al.*, 2011; Potron *et al.*, 2015) (Slika 2). U daljem tekstu biće detaljno opisani najvažniji mehanizmi rezistencije

detektovani kod *A. baumannii*, počev od najzastupljenijih β -laktamaza i efluksnih pumpi, smanjene permeabilnosti, do antibiotik-specifičnih mehanizama.

β -laktamaze su enzimi koji razgrađuju β -laktamske antibiotike, čiji se brojni tipovi mogu podeliti u četiri klase (A, B, C i D). Svi sojevi *A. baumannii* sadrže hromozomske gene koji kodiraju β -laktamaze klase C – AmpC cefalosporinaze, poznate i kao ADC (eng. *Acinetobacter-Derived Cephalosporinases*). Pod normalnim okolnostima, ekspresija ovih gena se odvija u bazalnim, niskim nivoima (Bou i Martínez-Beltrán, 2000) i jedino vezivanje mobilnog genetičkog elementa, insercione sekvence *ISAbal1*, uzvodno od *ampC*, obezbeđuje njihovu hiperekspresiju. U tim uslovima ADC pružaju zaštitu od cefalosporina proširenog spektra, osim u većini slučajeva od cefalosporina četvrte generacije, kao što je cefepim (Heritier *et al.*, 2006; Livermore i Woodford, 2006). Neke od varijanti enzima (ADC-33 i ADC-56) imaju dodatno proširenu aktivnost i deluju na cefepim (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2011). Najrasprostranjenije β -laktamaze kod *A. baumannii* su β -laktamaze klase D, poznate i kao oksacilinaze (skr. OXA), koje ne hidrolizuju cefalosporine proširenog spektra, ali zato hidrolizuju amoksicilin i cefalotin, i nisu osetljive na klavulansku kiselinu, inhibitor β -laktamaza (Poirel *et al.*, 2007). Ono što je najznačajnije, svi OXA enzimi kod *A. baumannii* sadrže i karbapenemaznu aktivnost i klasifikuju se kao karbapenem-hidrolizujuće β -laktamaze klase D (eng. *Carbapenem-Hydrolysing class D β -Lactamase*, skr. CHDL) (Poirel *et al.*, 2010). OXA enzimi kod *A. baumannii* se mogu podeliti u šest grupa: OXA-51, OXA-23, OXA-40, OXA-58, OXA-143 i OXA-235 (Potron *et al.*, 2015). Od svih grupa, jedino su OXA-51 intrinzički enzimi, kodirani od strane hromozomskih gena, koji poput AmpC enzima, pri bazalnoj ekspresiji pokazuju slabu karbapenemaznu aktivnost, međutim u slučaju hiperekspresije, indukovane uzvodnom insercijom *ISAbal1*, mogu smanjiti osetljivost bakterija na karbapeneme (Turton *et al.*, 2006). Grupa OXA-23 enzima (OXA-23, OXA-27 i OXA-49) prvi put je izolovana iz *A. baumannii* još 1985. godine, iste godine kada su karbapenemi uvedeni na tržište (Paton *et al.*, 1993). To je najrasprostranjenija grupa karbapenemaza kod *A. baumannii*, čiji se geni *bla_{OXA-23}* nalaze u okviru transpozona Tn2006 i Tn2007 i kodirani su genima na hromozomu ili plazmidu (Corvec *et al.*, 2007; Olaitan *et al.*, 2013). OXA-23 enzimi su ujedno odgovorni za najviše bolničkih epidemija sojeva *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme (eng. *Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii*, skr. CRAB) širom sveta (Merino *et al.*, 2014). Grupe OXA-40 (ranije poznate kao OXA-24) i OXA-58 enzima takođe su globalno rasprostranjene (Lolans *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2010). Geni *bla_{OXA-40}* mogu biti locirani na hromozomu ili plazmidu, dok su *bla_{OXA-58}* uvek na plazmidu, povezani sa IS elementima, uzvodno od kodirajuće sekvence (Poirel i Nordmann, 2006a; Potron *et al.*, 2015). OXA-143 i OXA-235 su novije grupe enzima zabeležene na američkom kontinentu (Higgins *et al.*, 2009; 2013). Pored toga što stimuliše ekspresiju intrinzičkih enzima, *ISAbal1* sekvenca stimuliše ekspresiju i stečenih OXA enzima, a najčešće je povezana sa grupama OXA-23 i OXA-58 (Peleg *et al.*, 2008). Veliki značaj u zaštiti od karbapenema kod *A. baumannii* imaju i β -laktamaze klase B, koje se nazivaju i metalo- β -laktamaze (skr. MBL), jer njihovo katalitičko dejstvo zavisi od vezivanja metala cinka za aktivno mesto (Walsh *et al.*, 2005; Nordmann *et al.*, 2012). Hidrolizuju sve β -laktame, izuzev monobaktama, sa visokom efikasnošću (npr. karbapenemazna aktivnost je 100-1000 puta potentnija u odnosu na OXA enzime) (Peleg *et al.*, 2008; Nordmann *et al.*, 2012). MBL enzimi su generalno ređe zastupljeni kod sojeva *A. baumannii*. Identifikovano je četiri tipa, od toga su najčešći, globalno rasprostranjeni (najviše u Aziji) IMP tipovi MBL (Potron *et al.*, 2015; Ramirez *et al.*, 2020), kao i najnovije MBL, NDM tipa (Yong *et al.*, 2009). NDM-1 enzim je identifikovan 2009. godine u Indiji kod bakterije *K. pneumoniae*, a odmah nakon toga i kod *A. baumannii* (Karthikeyan *et al.*, 2010), i čak se na osnovu nekih istraživanja smatra da je NDM-1, zapravo, prvo nastao u *A. baumannii*, što ukazuje na mogućnost da *A. baumannii* osim što preuzima rezistentne determinante od drugih bakterija, može poslužiti i kao izvor važnih rezistentnih osobina za druge patogene (Bonnin *et al.*, 2014; Potron *et al.*, 2015). Gen *bla_{NDM}* se kod *A. baumannii* nalazi u okviru kompozitnog transpozona Tn125, okružen sa dve kopije *ISAbal125* (Bonnin *et al.*, 2014). U izolovanim slučajevima identifikovani su VIM tipovi, registrovani najčešće u Aziji (Ramirez *et al.*, 2020), dok je SIM-1 zabeležen jedino u

Južnoj Koreji (Lee *et al.*, 2005). Geni *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} i *bla*_{SIM} se kod *A. baumannii* nalaze u okviru integrona klase 1 (Poirel i Nordmann, 2006b). Integroni klase 1 često sadrže multiple determinante rezistencije u okviru genskih kaseti, često uključujući i aminoglikozid-modifikujuće enzime pored β-laktamaza, što je povezano sa činjenicom da kontakt *A. baumannii* sa jednim antibiotikom može indukovati rezistenciju na više različitih klasa antibiotika (Peleg *et al.*, 2008). Takođe, kod *A. baumannii* su identifikovane i β-laktamaze klase A, tzv. β-laktmaze proširenog spektra (eng. *Extended Spectrum β-Lactamase*, skr. ESBL), koje pružaju rezistenciju na cefalosporine proširenog spektra, a koje inhibira klavulanska kiselina (Weldhagen *et al.*, 2003; Potron *et al.*, 2015). Najčešći tip je PER-1, globalno rasprostranjen, kodiran od strane gena *bla*_{PER-1}, koji se nalazi u okviru transpozona Tn1213, okružen elementima IS*Pa*12, odnosno IS*Pa*13, sa sličnim invertovanim ponavljajućim sekvencama (Poirel *et al.*, 2005; Potron *et al.*, 2015). Zanimljivo, u jednoj studiji pokazana je povezanost ekspresije *bla*_{PER-1} sa nivoom produkcije biofilma (Lee *et al.*, 2008). VEB-1 je takođe rasprostranjen širom sveta kao deo IC I klona, čiji se gen *bla*_{VEB-1} nalazi u okviru integrona klase 1 (Poirel *et al.*, 1999; Poirel *et al.*, 2003), a u nekim slučajevima je povezan i sa elementom IS*CR2* (Poirel *et al.*, 2009). ESBL GES tipa se sve češće identifikuju kod *A. baumannii*, od toga su GES-11, GES-12 i GES-22 tipovi zabeleženi u Evropi (Potron *et al.*, 2015; Ramirez *et al.*, 2020), a ESBL TEM, SHV i CTX-M tipova, iako široko rasprostranjene među članovima porodice Enterobacteriaceae, retko se mogu identifikovati kod *A. baumannii*, verovatno kao posledica činjenice da tipovi plazmida, u okviru kojih se geni koji kodiraju ove ESBL uobičajeno nalaze, imaju uzak spektar domaćina koji podržavaju njihovu uspešnu replikaciju, samim tim, imaju ograničenu mogućnost HGT na druge vrste bakterija (Potron *et al.*, 2015). Navedeni tipovi ESBL nemaju značajnu karbapenemaznu aktivnost, izuzev određenih GES varijanti, uključujući GES-14 koji je identifikovan i kod *A. baumannii* u Evropi, čiji gen je deo integrona klase 1 i nalazi se na konjugativnom plazmidu (Bonnin *et al.*, 2011). Osim toga, KPC tipovi ESBL imaju značajnu karbapenemaznu aktivnost, ali se vrlo retko susreću kod *A. baumannii*, i to uglavnom na američkom kontinentu, premda je nedavno zabeležen u Portugalu tip KPC-3 (Caneiras *et al.*, 2018).

Drugi važan mehanizam rezistencije kod *A. baumannii* su efluksne pumpe, koje aktivno ispumpavaju antibiotike, antiseptike, dezinficijense, teške metale i druga toksična jedinjenja iz ćelije. Najznačajnije su tripartitne pumpe AdeABC, AdeFGH i AdeIJK koje pripadaju RND (eng. *Resistance-Nodulation-cell Division*) klasi efluksnih pumpi i koje doprinose multirezistenciji izbacivanjem multiplih antibiotika iz ćelije (Du *et al.*, 2018; Geisinger *et al.*, 2019). Specifičan set transkripcionih regulatora kontroliše produkciju svake od ovih pumpi. AdeRS TCS negativno reguliše ekspresiju *adeABC* operona, koji je često hiperekspimiran kod MDR *A. baumannii* izolata kao posledica tačkastih mutacija u *adeR* ili *adeS* genima, zbog čega se prekomerno proizvodi AdeABC pumpa (Marchand *et al.*, 2004). Pored mutacija, zabeležena je i inaktivacija *adeS* gena insercijom IS*Aba*1 elementa (Peleg *et al.*, 2008). Ova pumpa doprinosi rezistenciji na širok raspon antibiotika uključujući sve β-laktamske antibiotike, fluorohinolone, tetracikline, tigeciklin, makrolide, hloramfenikol, trimetoprim i aminoglikozide (Marchand *et al.*, 2004; Ruzin *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2015). Pored toga, mnogi klinički izolati nemaju *adeC* gen, ali proizvode funkcionalnu pumpu jer AdeAB sistem eksploatiše konstitutivno ekspimiran AdeK protein kao kanal na spoljašnjoj membrani (Leus *et al.*, 2018). AdeABC pumpa je ujedno i najvažniji neenzimski mehanizam rezistencije na karbapeneme, u slučaju kojih u sinergiji sa karbapenemazama obezbeđuje visok nivo rezistencije kod sojeva *A. baumannii* (Heritier *et al.*, 2005; Poirel i Nordmann, 2006b). Pumpa AdeIJK ima najširi raspon supstrata, a od antibiotika izbacuje β-laktamske antibiotike, fluorohinolone, tetracikline, tigeciklin, makrolide, rifampin, klindamicin i fuzidinsku kiselinu, međutim, ne i karbapeneme i aminoglikozide (Damier-Piolle *et al.*, 2008; Coyne *et al.*, 2011; Yoon *et al.*, 2015; Leus *et al.*, 2018). Slično AdeABC, i AdeIJK je pod negativnom kontrolom AdeN, transkripcionog regulatora TetR tipa, pri čemu mutacije na *adeN* genu mogu dovesti do hiperprodukcije ove pumpe (Rosenfeld *et al.*, 2012; Rumbo *et al.*, 2013). I treća pumpa iz RND familije, AdeFGH ima najuži raspon supstrata, a negativno je regulisana posredstvom AdeL transkripcionog faktora LysR tipa. Od antibiotika, pokazalo se da izbacuje

fluorohinolone, hloramfenikol, klindamicin, sulfametoksazol i trimetoprim, ali generalno mutacije u okviru ovog sistema imaju mali uticaj na antimikrobnu rezistenciju (Coyne *et al.*, 2010a; Yoon *et al.*, 2015; Leus *et al.*, 2018). Kontrolu ekspresije RND pumpi kod *A. baumannii* dodatno reguliše i BaeSR TCS na taj način što u slučaju prisustva povećanih nivoa BaeR dolazi do stimulacije transkripcije *adeAB* i *adeIJK* gena, kao i *macAB-tolC* operona koji kodira MacAB-ToIC tripartitnu pumpu ABC tipa, što se smatra važnim mehanizmom rezistencije na tigećiklin (Lin *et al.*, 2014; 2015). Od ostalih klasa efluksnih pumpi, kod *A. baumannii* su zastupljene MFS pumpe, čiji su najvažniji predstavnici TetA i TetB pumpe, rasprostranjene među Gram-negativnim bakterijama, koje predstavljaju glavni mehanizam odbrane od tetraciklina, međutim ne deluju i na njihov polusintetski derivat tigećiklin (Peleg *et al.*, 2008). Takođe i pumpe AmvA, koja izbacuje makrolide, ali i neke dezinficijense i boje (Rajamohan *et al.*, 2010; Hassan *et al.*, 2016), AbaF, koja izbacuje fosfomicin (Sharma *et al.*, 2016), kao i CraA i CmlA, koji izbacuju hloramfenikol (Roca *et al.*, 2009), pripadaju MFS klasi prisutnih kod *A. baumannii*. AbeM je pumpa MATE klase koja doprinosi rezistenciji na fluorohinolone, aminoglikozide i hloramfenikol (Su *et al.*, 2005; Peleg *et al.*, 2008; Coyne *et al.*, 2011), a od SMR klase je identifikovana AbeS pumpa koja izbacuje makrolide i hloramfenikol (Srinivasan *et al.*, 2009). Opisana je i AceI pumpa iz PACE klase koja ispumpava dezinficijens hlorheksidin (Hassan *et al.*, 2013), kao i ABUW_0982 pumpa iz nove klase AI-2E efluksnih pumpi koja izbacuje hloramfenikol (Karalewitz i Miller, 2018). Neke od efluksnih pumpi su intrinzički prisutne, poput RND pumpi, ili AbeM, AbeS i CraA, dok su mnoge stečene posredstvom HGT, npr. TetA i TetB pumpe preko transpozona, ili CmlA pumpa koja se nalazi u okviru integrona (Peleg *et al.*, 2008; Poirel *et al.*, 2011). Poznato je da kompleksni regulatorni mehanizmi kontrolišu ekspresiju efluksnih pumpi, od kojih većina tek treba da se identifikuje (Allen *et al.*, 2020). Pored dobro poznatih transkripcionih faktora i TCS koji regulišu ekspresiju RND pumpi, nedavno je identifikovan i SoxR, transkripcioni faktor MerR familije, koji kao negativni regulator smanjuje produkciju AdeIJK, AdeFGH, AbeM i AbeS pumpi, a interesantno je da većina MDR kliničkih izolata *A. baumannii* ima mutacijom inaktiviran *soxR* gen, što nagoveštava da je to jedna od evolutivnih promena u cilju bolje *in vivo* adaptacije u bolničkim sredinama (Li *et al.*, 2017).

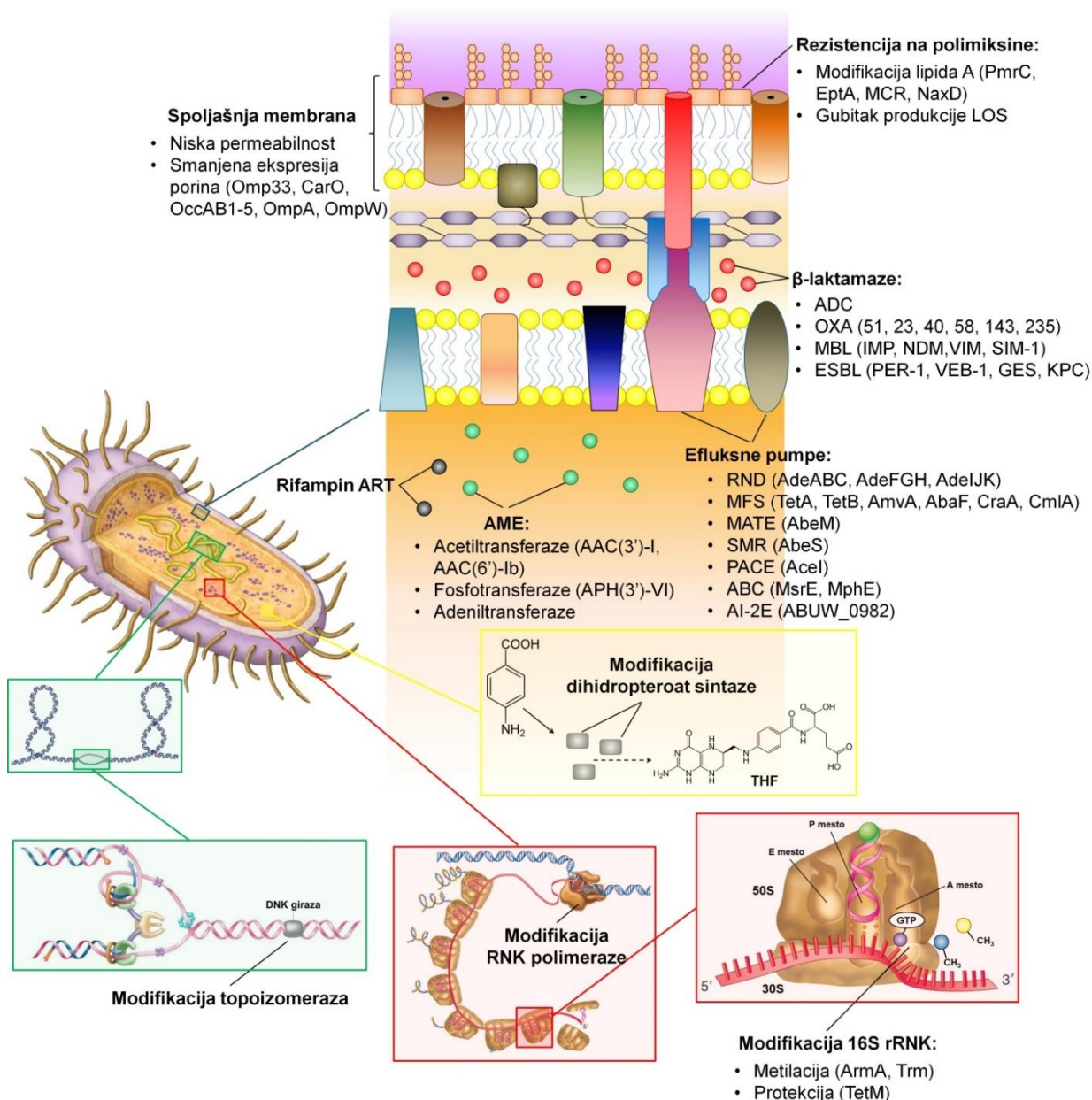
Spoljašnja membrana *A. baumannii* intrinzički ima nisku permeabilnost, zbog toga što mali hidrofилni molekuli, uključujući mnoge antibiotike, teže prolaze kroz porine. Najzastupljeniji porin OmpA, koji se smatra niskopermeabilnim sporim porinom, ima sličnu permeabilnost kao glavni porin *P. aeruginosa* OprF, a 70 puta nižu aktivnost formiranja pore u odnosu na visoko permeabilne OmpF i OmpC porine *E. coli* (Sugawara i Nikaido, 2012; Chevalier *et al.*, 2017; Iyer *et al.*, 2017). Poput OprF, OmpA formira relativno velike pore, oko 2 nm u prečniku, međutim uglavnom zauzima zatvorenu konformaciju sa N-terminalnim osmolančanim β -buretom i C-terminalnom globularnom ekstenzijom koja ostvaruje vezu sa peptidoglikanom. Veza između OmpA i peptidoglikana u slučaju otvorene konformacije se raskida, što je verovatno razlog zašto se zatvorena konformacija favorizuje (Sugawara *et al.*, 2010; 2012). Osim toga, *A. baumannii* kao mehanizam rezistencije na male hidrofилne antibiotike, poput β -laktamskih antibiotika, ispoljava smanjenu ekspresiju i produkciju porina, i samim tim, dodatno smanjenu permeabilnost (Poirel *et al.*, 2011). Smatra se da smanjena produkcija OmpA porina, koji ima važnu ulogu u *in vivo* adaptaciji, stabilizaciji ćelijske ovojnice i interakciji sa β -laktamazama poput OXA enzima posredstvom kojih obezbeđuje visoke koncentracije ovih enzima u periplazmi, nije dominantan mehanizam, već se preferira nishodna regulacija drugih porina (Park *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2016; Iyer *et al.*, 2017). Smanjena produkcija porina Omp33, CarO i homologa Occ proteina iz *P. aeruginosa* OccAB1-5, kao posledica inaktivirajućih mutacija ili nishodne ekspresije, smatra se važnim mehanizmom rezistencije na karbapeneme (Mussi *et al.*, 2005; Vila *et al.*, 2007; Zahn *et al.*, 2016; Abellon-Ruiz *et al.*, 2018). Takođe, smanjena ekspresija OmpW porina povezana je sa povećanom rezistencijom na cefalosporine proširenog spektra (Vila *et al.*, 2007).

Glavni mehanizam rezistencije na aminoglikozide kod *A. baumannii* i mnogih drugih multirezistentnih bakterijskih vrsta je proizvodnja aminoglikozid-modifikujućih enzima (skr. AME). Sve tri klase AME (acetiltransferaze, adeniltransferaze i fosfotransferaze) su opisane kod *A. baumannii*, stečene HGT-om posredstvom integrona klase 1 i široko su rasprostranjene (Peleg *et al.*, 2008; Lin i Lan, 2014). Najviše su zastupljene acetiltransferaze AAC(3')-I, koja inaktivira gentamicin, i AAC(6')-Ib, koja deluje na tobramicin, amikacin i netilmicin, kao i fosfotransferaza APH(3')-VI koja modifikuje amikacin, kanamicin i neomicin (Bonnin *et al.*, 2013). Pored toga, rezistenciji na aminoglikozide kod *A. baumannii* doprinose i enzimi 16S rRNK metilaze, koje metilacijom 16S rRNK modifikuju ciljno mesto vezivanja za aminoglikozide i pružaju visok nivo rezistencije na amikacin, gentamicin i tobramicin (Doi *et al.*, 2007; 2008). Najrasprostranjeniji je ArmA tip enzima, kodiran posredstvom gena koji se nalazi u okviru kompozitnog transpozona Tn1548, na konjugativnim plazmidima, zbog čega je ekstenzivno, globalno raširen među sojevima *A. baumannii*, kao i drugih Gram-negativnih bakterijskih vrsta (Doi *et al.*, 2007; Potron *et al.*, 2015). Uz hiperekspresiju efluksnih pumpi, kombinacija ovih mehanizama pruža visok nivo rezistencije na aminoglikozide kod mnogih sojeva *A. baumannii* (Peleg *et al.*, 2008).

Niska permeabilnost, uz konstitutivnu aktivnost efluksnih pumpi uzrokuje intrinzički smanjenu osetljivost *A. baumannii* na fluorohinolone (Potron *et al.*, 2015). Visok nivo rezistencije se najčešće stiče kao posledica hiperekspresije efluksnih pumpi, a pored toga mutacije *gyrA* ili *parC*, gena koji su uključeni u kodiranje DNK žiraze i topoizomeraze IV, tj. ciljnih mesta dejstva fluorohinolona, doprinose ukupno visokoj, globalno rasprostranjenoj rezistenciji na fluorohinolone (Vila *et al.*, 2007). Osetljivost na makrolide je takođe intrinzički mala zbog niske permeabilnosti ćelijskog zida, a dodatnoj rezistenciji često doprinose i hiperekspresija nespecifičnih efluksnih pumpi, kao i sticanje MsrE specifične efluksne pumpe ABC tipa, i/ili makrolid-modifikujućeg enzima MphE 2'-fosfotransferaze (Zhu *et al.*, 2013). Modifikacija ciljnog mesta dejstva identifikovana je i kao jedan od mehanizama rezistencije *A. baumannii* na tetracikline posredstvom produkcije TetM proteina koji štiti 16S subjedinicu ribozoma od vezivanja tetraciklina (Falagas *et al.*, 2015), kao i na sulfonamide, posredstvom *sulI* gena koji se prenosi u okviru integrona klase 1 i kodira alternativnu dihidropteroat sintazu na koju ne deluju lekovi (Antunes *et al.*, 2005; Peleg *et al.*, 2008). Noviji derivati tetraciklina kao što su tigeciklin i eravaciklin nisu osetljivi na TetM-posredovanu rezistenciju, ni na Tet efluksne pumpe, međutim nedavno su na plazmidima nekih izolata identifikovane različite varijante *tetX* gena, koji kodira flavin-zavisnu monooksigenazu, enzim koji katalizuje modifikaciju i inaktivaciju oba ova antibiotika (He *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Osim toga kao jedan od potencijalnih mehanizama rezistencije na tigeciklin prepoznata je i modifikacija ciljnog mesta dejstva posredstvom Trm metiltransferaze (Chen *et al.*, 2014), pored već opisane hiperekspresije određenih efluksnih pumpi. Modifikacija penicilin vezujućeg proteina (eng. *Penicillin Binding Protein*, skr. PBP), kao mehanizam rezistencije na β -laktamske antibiotike, ne smatra se značajnim kod *A. baumannii* (Cayo *et al.*, 2011). Rifampicin koji se ponekad koristi kao deo kombinacione terapije kod infekcija izazvanih bakterijom *A. baumannii* takođe ima smanjenu aktivnost protiv mnogih sojeva kao posledica multiplih mehanizama rezistencije, uključujući mutacije u aktivnom mestu na RNK polimerazi, smanjenu permeabilnost spoljašnje membrane, enzimsku inaktivaciju posredstvom rifampin ADP-ribosiltransferaze (skr. ART) i efluksne sisteme (Fournier *et al.*, 2006b; Giannouli *et al.*, 2012). Nedavno su detektovani i potencijalni mehanizmi rezistencije na sulbaktam, jedno od retkih β -laktamskih jedinjenja koje je i dalje aktivno protiv većine sojeva *A. baumannii*, a to su β -laktamaze TEM-1 i ADC-30 (Yang *et al.*, 2018).

Rezistencija na polimiksine, koji su vrlo često jedina preostala terapijska opcija kod infekcija izazvanih ekstenzivno rezistentnim (eng. *eXtensively Drug Resistant*, skr. XDR) sojevima *A. baumannii*, je poslednjih godina sve češće zastupljena, uzrokujući tako nastanak panrezistentnih (eng. *Pan-Drug Resistant*, skr. PDR) sojeva, neosetljivih na sve dostupne antibiotike. Mehanizmi rezistencije su povezani sa modifikacijom ciljnog mesta dejstva – lipida A, ili u ređim slučajevima, sa gubitkom produkcije LOS (Moffatt *et al.*, 2019). Najzastupljeniji tip modifikacije lipida A kod *A.*

baumannii je posredovan sistemom sastavljenim od PmrAB TCS i PmrC fosfoetanolamin (skr. PEtn) transferaze (Beceiro *et al.*, 2014). PmrAB funkcioniše kao pozitivni regulator *pmrC*, a u slučaju određenih tačkastih mutacija u okviru *pmrA*, *pmrB*, ili *pmrC* gena može doći do hiperprodukcije PmrC, koji katalizuje adiciju PEtn rezidue na lipid A (Adams *et al.*, 2009; Beceiro *et al.*, 2011). Na taj način dolazi do redukcije ukupnog negativnog naelektrisanja molekula LOS, odnosno smanjuje se broj slobodnih fosfatnih grupa na lipidu A za koje se vezuju polimiksini sa većim afinitetom u odnosu na jone Ca^{2+} i Mg^{2+} , uzrokujući na taj način destabilizaciju LOS i poremećen integritet spoljašnje membrane (Hancock, 1997). Pored PmrC PEtn transferaze, često se kod nekih MDR sojeva, posebno IC II klona, može pronaći EptA PEtn transferaza, nezavisna od PmrAB regulacije, do čije hiperekspresije dolazi nakon insercije *ISAbal* elementa, uzvodno od kodirajuće sekvence (Deveson Lucas *et al.*, 2018; Trebosc *et al.*, 2019). Osim toga, nedavno je opisano prisustvo plazmidskih gena *mcr-4.3* i *mcr-1*, uglavnom zastupljenih kod članova Enterobacteriaceae, kod nekoliko kliničkih izolata i izolata *A. baumannii* iz životne sredine, koji takođe kodiraju PEtn transferaze (Ma *et al.*, 2019; Hameed *et al.*, 2019; Martins-Sorenson *et al.*, 2020). Konačno, neutralizacija LOS kod *A. baumannii* je u retkim slučajevima moguća i posredstvom vezivanja galaktozamina za lipid A, u čemu učestvuje NaxD deacetilaza koja je pod kontrolom PmrAB TCS (Pelletier *et al.*, 2013; Chin *et al.*, 2015). Drugi mehanizam rezistencije na polimiksine, gubitak produkcije LOS, povezan je sa mutacijama u lipid A-biosintetičkim genima – *lpxA*, *lpxC* ili *lpxD*, pruža visok nivo zaštite, manje je zastupljen i moguć jedino kod specifičnih sojeva koji proizvode manje nivoa PBP1a glikoziltransferaze/transpeptidaze, jer je u tom slučaju povećana transkripcija *lol* gena koji posreduje transport lipoproteina u spoljašnju membranu i kompenzaciju gubitka LOS (Moffatt *et al.*, 2010; Boll *et al.*, 2016). Dodatni problem rezistencije na polimiksine jeste da se ne stiče posredstvom HGT, već rastom bakterija u prisustvu subinhibitornih koncentracija polimiksina (Lopez-Rojas *et al.*, 2011), usled čega je česta pojava heterorezistencije u toku terapije, odnosno subpopulacije rezistentnih mikroorganizama u okviru celokupne populacije izolata *A. baumannii* koji se smatraju osetljivim (Li *et al.*, 2006; Hawley *et al.*, 2008). To je povezano sa često nepreciznim laboratorijskim testovima osetljivosti, posebno u slučaju automatizovanih tehnika, i posledično neuspešnim terapijskim ishodima (Cai *et al.*, 2012; Vourli *et al.*, 2017).

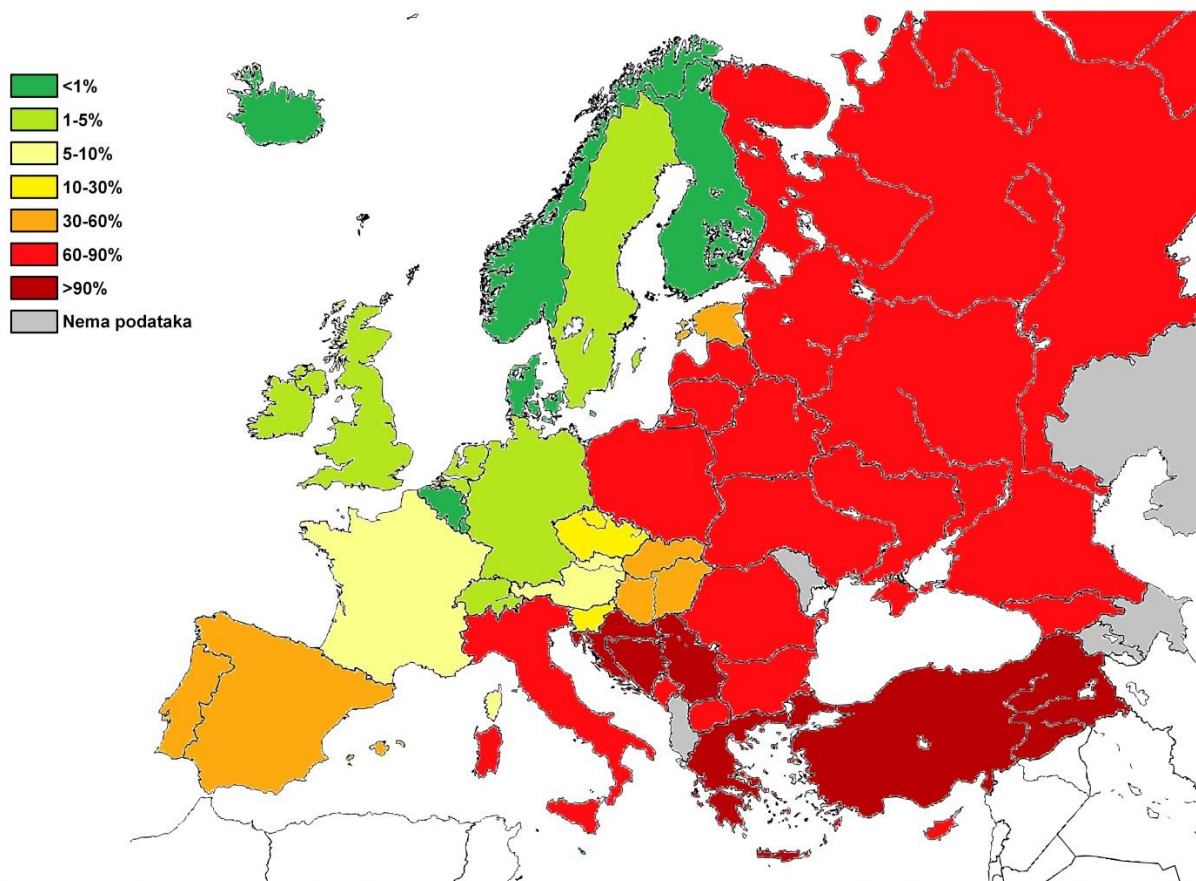


Slika 2. Ilustrovani prikaz mehanizama rezistencije *A. baumannii*.

1.3. Epidemiologija

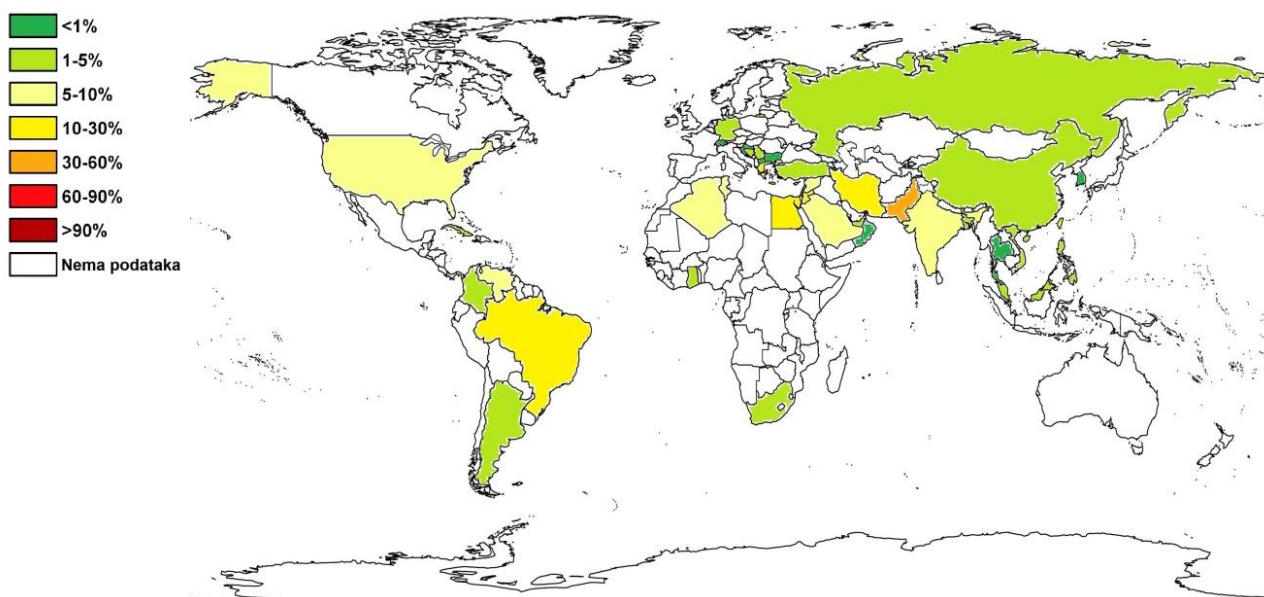
Prva pojava CRAB zabeležena je još 1986. godine, samo godinu dana nakon što su karbapenemi uvedeni na tržište (Joly-Guillou *et al.*, 1990). U periodu od 1991. do 1992. godine, u Francuskoj i SAD su zabeležene prve bolničke epidemije CRAB (Tankovic *et al.*, 1994; Go *et al.*, 1994). Danas su CRAB vrlo rasprostranjeni u svetu, pri čemu u nekim zemljama čine preko 90% od svih izolata *A. baumannii*, dok su u drugim zemljama još uvek zastupljeni sa manje od 5%. Rezultati GLASS (eng. *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System*) studije sprovedene 2018. godine (WHO, 2020) su pokazali da od ukupno 28650 testiranih izolata, 55,46% je rezistentno na karbapeneme (studija nije sprovedena u svim državama uključujući Kinu i SAD). Najkritičnije stanje je u zemljama Jugoistočne Evrope (Srbija, Hrvatska, Bosna i Hercegovina i Grčka) i Turskoj, gde je stopa CRAB veća čak od 90%. Jednako alarmantno je i u Rusiji, Rumuniji, Bugarskoj, Severnoj Makedoniji, Crnoj Gori, Kipru i postsovjetskim državama (Litvanija, Letonija, Belorusija i Gruzija), kao i u zemljama Bliskog Istoka (Saudijska Arabija, Jordan, Irak i Iran), gde je preko 80% izolata rezistentno (WHO, 2019, 2020; ECDC, 2020). Takođe u Kini je od ukupno

18852 testiranih *A. baumannii* izolovanih u 2018. godini, zabeleženo oko 80% CRAB (Hu *et al.*, 2019). Od evropskih zemalja, pored nabrojanih, treba još istaći Italiju, Poljsku i Ukrajinu gde je stopa >70%, u Španiji je oko 59%, dok je situacija najbolje iskontrolisana u zemljama Severne Evrope, gde stopa retko prelazi 5% (Slika 3). U SAD, iako je stopa niža od 35%, američki Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (eng. *Centers for Disease Control and Prevention*, skr. CDC) je već proglasio CRAB za patogen koji zahteva hitno i agresivno delovanje u smislu pronalaska novih terapijskih pristupa i sprečavanja širenja rezistencije na karbapeneme (CDC, 2019). Kolistin je najčešće propisivani lek za terapiju infekcija izazvanih CRAB, a često i jedina efikasna opcija, tako da je pojava sojeva rezistentnih na kolistin (kao i na ostale polimiksine) izazvala veliku zabrinutost među zdravstvenim radnicima širom sveta. Prvi sojevi rezistentni na polimiksine detektovani su već krajem 90-ih i početkom 2000-ih (Manikal *et al.*, 2000; Urban *et al.*, 2001), neposredno nakon što su tada opsolentni polimiksini vraćeni u terapiju Gram-negativnih infekcija, a u periodu od 2002. do 2003. godine zabeležena je i bolnička epidemija PDR izolatima *A. baumannii* (Valencia *et al.*, 2009). Stopa rezistencije na kolistin danas retko prelazi 5% (Slika 4). Najlošija situacija je u Iranu i Južnoj Aziji, od čega najviše zabrinjava podatak GLASS (WHO, 2018) da je u Pakistanu 57% kliničkih izolata rezistentno na polimiksine, što međutim treba uzeti sa rezervom s obzirom da je obuhvaćen mali broj izolata i poželjno bi bilo sprovesti dodatne epidemiološke studije u toj državi. Multiple studije su izmerile stopu rezistencije preko 10% u Brazilu i Egiptu (WHO, 2020; Lima *et al.*, 2020), a alarmantno je i u SAD gde je više od 5% izolata rezistentno na kolistin (Zilberberg *et al.*, 2016). U Evropi je generalno stopa <5%, ali je zabrinjavajuća detekcija 32,8% rezistencije na kolistin od ukupno 122 testirana izolata u nedavnoj studiji sprovedenoj u Grčkoj, gde je već izuzetno rasprostranjena rezistencija na karbapeneme (Palmieri *et al.*, 2020).



Slika 3. Rezistencija kliničkih izolata *Acinetobacter* spp. na karbapeneme u Evropi. Rezultati su izračunati kao prosečne vrednosti tri nezavisne studije (WHO, 2019, 2020; ECDC, 2020). Sojevi u većini slučajeva nisu identifikovani na nivou vrste, ali s obzirom na predominantnu zastupljenost *A. baumannii* u evropskim bolnicama, rezultati verodostojno reprezentuju nivo rezistencije ove vrste.

Do nastanka bolničke epidemije najčešće dolazi nakon hospitalizacije pacijenta kolonizovanog tzv. epidemijskim, rezistentnim sojem *A. baumannii*. Uneti soj lako može kontaminirati bolnički nameštaj, razne predmete i površine, odakle se zbog perzistencije veoma teško uklanja, tako da epidemija može potrajati i nekoliko godina (van den Broek *et al.*, 2006; Peleg *et al.*, 2008; Barnaud *et al.*, 2010). Kontaminirane nežive površine predstavljaju rezervoar odakle se bakterije, najčešće preko ruku bolničkog osoblja, prenose na osetljive pacijente ili medicinske uređaje (Munoz-Price *et al.*, 2013; Escudero *et al.*, 2017). Ovu pretpostavku potvrđuje i studija sprovedena u bolnici sa epidemijom MDR *A. baumannii*, koja je pokazala da su ruke ili rukavice zdravstvenih radnika, koji dolaze u direktan kontakt sa pacijentima, kontaminirane u 30,3% slučajeva (Thom *et al.*, 2017). Kolonizacija medicinskih uređaja predstavlja važan put transmisije i infekcije hospitalizovanih pacijenata. Iako su najčešći slučajevi pneumonija i bakterijemija izazvanih kontaminiranim endotrahealnim tubusima ili kateterima, zabeleženi su slučajevi epidemija poteklih od raznih kontaminiranih uređaja, kao što je npr. sistem za pulsirajuću lavažu, tj. tretman ispiranja pod visokim pritiskom koji se koristi u debridmanu rana (Maragakis *et al.*, 2004).



Slika 4. Rezistencija kliničkih izolata *Acinetobacter* spp. na polimiksine (Strateva *et al.*, 2019; WHO, 2020; Lima *et al.*, 2020; Pormohammad *et al.*, 2020, Palmieri *et al.*, 2020; Wareth *et al.*, 2020; Benamrouche *et al.*, 2020; Lukovic *et al.*, 2020).

Do transmisije može doći i kapljičnim putem preko vazduha, što je naročito zastupljeno u jedinicama intenzivne nege gde se nalaze kolonizovani pacijenti na mehaničkoj ventilaciji. U jednoj studiji je izmereno prisustvo CRAB u čak 16% uzorkovanog vazduha iz jedinice intenzivne nege u kojoj se nalazio kolonizovani pacijent (Mousa *et al.*, 2019), što dodatno stimuliše kolonizaciju neživih površina i predstavlja dodatni razlog zašto do infekcija *A. baumannii* najčešće dolazi upravo u jedinicama intenzivne nege. Kapljičnim putem, a takođe i direktnim kontaktom, u redim slučajevima može doći i do direktne transmisije između dva hospitalizovana pacijenta (Gellings *et al.*, 2020). Do širenja epidemija na druge ustanove dolazi prilikom transfera kolonizovanog pacijenta. Najveći broj epidemija širom sveta, a posebno u Evropi, izazvan je epidemijskim sojevima poteklim iz dve različite loze, što ukazuje da je do toga došlo najverovatnije prilikom transfera pacijenata u ustanove drugih država, ili ređe drugih kontinenata, zbog čega je vrlo važno sprovoditi pravilan skrining, i po mogućnosti izolovati pacijente koji se prebacuju iz država sa visokim stopama rezistentnih sojeva, u cilju usporavanja širenja rezistencije (Naas *et al.*, 2006; Peleg *et al.*, 2008).

Većinu bolničkih epidemija širom sveta izazivaju sojevi *A. baumannii* koji pripadaju jednom od dva glavna internacionalna klona IC I i IC II. S početka nazvani evropski klonovi, jer su prvo

pronađeni u Evropi, ovi genotipski srodni sojevi brzo su se proširili po celom svetu, najverovatnije posredstvom internacionalnog transfera kolonizovanih pacijenata (Peleg *et al.*, 2008; Zarrilli *et al.*, 2013). Kao selektivna prednost koja je omogućila predominantnu zastupljenost ovim sojevima, najčešće se pripisuje visok stepen rezistencije, a moguće i još neka evolutivno stečena karakteristika (Dijkshoorn *et al.*, 2007). Svi sojevi iz ova dva klona su multirezistentni, posebno sojevi iz IC II u okviru kojeg se nalazi najviše CRAB (Da Silva *et al.*, 2014). Smatra se da širokoj rasprostranjenosti ovih sojeva delimično doprinosi i cirkulacija u vanbolničkoj sredini, zahvaljujući visokoj sposobnosti perzistencije. Na primer, u nekoliko studija je pokazano da ovi sojevi mogu kolonizovati domaće životinje, posebno kućne ljubimce sa kojima su ljudi u intimnom kontaktu, kao što su psi i mačke (Pomba *et al.*, 2014; Herivaux *et al.*, 2016; Ewers *et al.*, 2017). Doprinos toga globalnoj rasprostranjenosti još treba ispitati. Treba istaći da se u okviru internacionalnih klonova nalaze vrlo raznolike subklonalne grupe, sa različitim profilima rezistencije, zahvaljujući visoko varijabilnom pomoćničkom genomu (Zarrilli *et al.*, 2013; Da Silva *et al.*, 2014). Osim IC I i IC II, često je zastupljen i IC III, uglavnom ograničen na Evropu, a ukupno je do danas identifikovano devet internacionalnih klonova. Pri tome, neki sojevi nisu grupisani ni u jedan od devet internacionalnih klonova, a mogu uzrokovati izolovane bolničke epidemije (Zarrilli *et al.*, 2013).

A. baumannii je odgovoran za oko 2% od svih nozokomijalnih infekcija u Evropi i SAD, odnosno 4% u Aziji i na Bliskom Istoku (Magill *et al.*, 2014; Lob *et al.*, 2016). Od toga, *A. baumannii* spada među najčešće uzročnike nozokomijalne pneumonije. U nekim azijskim zemljama, čak više od 1/3 nozokomijalnih pneumonija izaziva ovaj patogen (Chung *et al.*, 2011). Generalno je procenjeno da je globalno oko 45% od svih kliničkih izolata *A. baumannii* multirezistentno, što je skoro četiri puta više u odnosu na druge Gram-negativne patogene kao što su *P. aeruginosa* ili *K. pneumoniae*. Pri tome, stopa multirezistencije je veća od 70% u Latinskoj Americi i na Bliskom Istoku (Giammanco *et al.*, 2017). Bakterijemija izazvana rezistentnim *A. baumannii* sojevima spada među infekcije sa najvećim stopama mortaliteta, odmah iza infekcija izazvanih *P. aeruginosa* i *Candida* spp. (Tiwari *et al.*, 2018; Zurawski *et al.*, 2019). Šleis i saradnici (Shlaes *et al.*, 2013) su izmerili stopu mortaliteta >50% kod bakterijemija ili infekcija pluća uzrokovanih CRAB sojevima. Takođe, u nedavnim studijama je zabeležena ukupna smrtnost do preko 40% kod infekcija izazvanih sojevima univerzalno rezistentnim na karbapeneme i fluorohinolone (Kadri *et al.*, 2018; Giannella *et al.*, 2019). U SAD je izmeren porast broja smrtnih slučajeva izazvanih MDR *A. baumannii* infekcijama za oko 60% u proteklih šest godina, zbog čega je (uz konstantan porast rezistencije) CDC (2019) nedavno reklasifikovao CRAB u patogene „hitnog nivoa opasnosti“ (eng. *Hazard Level Urgent*), na prvom mestu ispred *Candida auris*, *Clostridioides difficile*, karbapenem rezistentnih Enterobacteriaceae i rezistentne *Neisseria gonorrhoeae*. Svetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*, skr. WHO) je 2017. godine proglasila CRAB za patogen od kritičnog prioriteta (prioritet prvog nivoa) za pronalazak i razvoj novih antimikrobnih agenasa ili terapijskih strategija (Tacconelli *et al.*, 2018).

1.4. Kliničke manifestacije

Pojava velikog broja **infekcija kože i mekih tkiva** na mestima dubokih rana i teških opekotina, kao i **osteomijelitisa** u težim slučajevima, uzrokovanih multirezistentnim sojevima *A. baumannii* kod američkih vojnika tokom operacija u Iraku i Avganistanu u periodu od 2003. do 2005. godine, izazvala je veliku pažnju u širokoj javnosti (Davis *et al.*, 2005). *A. baumannii* je zahvaljujući ovom incidentu dobio naziv „Irakibakter“, koji i danas često koriste zdravstveni radnici u SAD, a takođe je stekao pažnju mnogih istraživača što je rezultiralo prvim kompletno sekvenciranim genomima već 2006. godine (Fournier *et al.*, 2006b). Uzročnici infekcija nisu poticali iz okoline bojnog polja, kao što se prvobitno smatralo, već iz terenskih bolnica kontaminiranih epidemijskim sojevima. Širenju epidemija doprinele su neadekvatne higijenske mere hitnih službi, uobičajene u ekstremnim uslovima kao što je ratno stanje, kao i opsežna

upotreba opioidnog analgetika morfina za koji je pokazano da deluje imunosupresivno i potencira patogenost *A. baumannii* (Breslow *et al.*, 2011; Antunes *et al.*, 2014). Pored ratnih povreda, zabeležene su i epidemije infekcija traumatskih povreda kod žrtava prirodnih nepogoda, poput zemljotresa koji je 1999. godine zahvatio Mramornu regiju u Turskoj, cunamija koji je krajem 2004. godine pogodio Jugoistočnu Aziju, ili zemljotresa koji se dogodio 2008. godine u pokrajini Sičuan, u Kini (Oncul *et al.*, 2002; Garzoni *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 2009). Pojava infekcija kože i mekih tkiva neretka je i u redovnim uslovima, kod hospitalizovanih pacijenata, naročito u odeljenjima za opekotine (Trottier *et al.*, 2007). Infekcije opekotina, ukoliko se uspostave, mogu biti vrlo problematične, jer se izuzetno teško leče zbog multirezistencije uzročnika i slabe penetracije efektivnih antibiotika do mesta infekcije, a mogu prolongirati zarastanje rana, uzrokovati odbacivanje kožnih graftova i progredirati do infekcija okolnog tkiva i sekundarne bakterijemije (McConnell *et al.*, 2013).

Infekcije izazvane vrstom *A. baumannii* se najčešće manifestuju u obliku **pneumonije** ili **bakterijemije**. Pneumonija se uglavnom razvija kod pacijenata na mehaničkoj ventilaciji (eng. *Ventilator Associated Pneumonia*, skr. VAP) u jedinicama intenzivne nege, kao posledica direktne aspiracije bakterija u alveole, iz biofilmova formiranih na endotrahealnoj tubi. Bakterijemija može biti primarna, kada do infekcije krvi dođe usled insercije kolonizovanog centralnog venskog katetera, ili sekundarna, nakon diseminacije bakterija iz primarnog mesta infekcije, što su najčešće pluća (Seifert *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 2017). Uticaj VAP i bakterijemije, kao i drugih manifestacija nozokomijalnih infekcija, na mortalitet je teško proceniti, s obzirom da su uglavnom pogođeni stariji pacijenti i hronični bolesnici sa već postojećom lošom prognozom (Peleg *et al.*, 2008). Osim toga, manje virulentni sojevi *A. baumannii* mogu kolonizovati respiratorni i urinarni trakt, hirurške rane i telesne tečnosti, bez uspostavljanja infekcije, što može uzrokovati lažne rezultate prilikom procene uticaja na mortalitet (Gil-Perotin *et al.*, 2012; Garnacho-Montero *et al.*, 2016). Ipak, Falagas i saradnici (2006; Falagas i Rafailidis, 2007) su na osnovu kohortnih studija i studija slučaj-kontrola pokazali da su infekcije u obliku pneumonije ili bakterijemije povezane sa značajnim povećanjem mortaliteta, u rasponu od 7,8% do 23%. Generalno gledano, bakterijemije mogu u nekim slučajevima biti povezane i sa mortalitetom preko 50%, pri čemu najlošiju prognozu imaju sekundarne bakterijemije povezane sa pneumonijom (Seifert *et al.*, 1995; Cisneros *et al.*, 1996).

Nešto manje zastupljene su **infekcije urinarnog trakta** i **meningitis**. Infekcije urinarnog trakta se tipično javljaju nakon aplikacije kolonizovanog urinarnog katetera ili perkutane nefrostome, dok se meningitis uglavnom razvija kod pacijenata na neurohirurgiji, često povezan sa primenom kolonizovanog cerebrospinalnog šanta, sa mortalitetom koji može dostići čak 70% (Siegman-Igra *et al.*, 1993; Metan *et al.*, 2007). Od ostalih kliničkih manifestacija, zabeleženo je nekoliko slučajeva **endokarditisa**, najčešće nakon ugradnje veštačkih srčanih zalistaka, kao i infekcija oka u obliku **endoftalmitisa** ili **keratitisa**, nakon hirurške intervencije ili korišćenjem kontaminiranih kontaktnih sočiva (Peleg *et al.*, 2008).

A. baumannii u retkim situacijama može izazvati i vanbolničke infekcije. Većina ovih infekcija se manifestuje u obliku **vanbolničke pneumonije**, kao specifičan težak klinički sindrom, koji se karakteriše fulminantnim tokom, sekundarnom bakterijemijom i visokom stopom smrtnosti od 40% do čak 64% (Anstey *et al.*, 1992; Leung *et al.*, 2006; Patamatamkul *et al.*, 2017). Pacijenti su uglavnom osobe koje prekomerno konzumiraju alkohol, hronični pušači, ili osobe koje boluju od hroničnih medicinskih stanja poput hronične opstruktivne bolesti pluća i dijabetes melitusa (Falagas *et al.*, 2007; Dexter *et al.*, 2015), a infekcije se najčešće javljaju u tropskim oblastima Jugoistočne Azije, Australije i Okeanije, i to tokom najtoplijih i najvlažnijih godišnjih doba (Chen *et al.*, 2001; Anstey *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2009). Ove infekcije tipično uzrokuju sporadični sojevi *A. baumannii*, koji nisu multirezistentni (Chen *et al.*, 2001). U izolovanim slučajevima zabeležene su i infekcije u obliku **nekrotizujućeg fascitisa**, bilo kao nozokomijalne ili vanbolnički stečene, a smrtonosna kombinacija virulencije i multirezistencije ovih infekcija izazvala je posebnu

zabrinutost među zdravstvenim radnicima (Corradino *et al.*, 2010; Clemente *et al.*, 2012; Sinha *et al.*, 2014).

1.5. Patogeneza

Ulogu u patogenezi infekcije *A. baumannii* imaju aktivacija urođenog imunskog odgovora i specifični faktori virulencije.

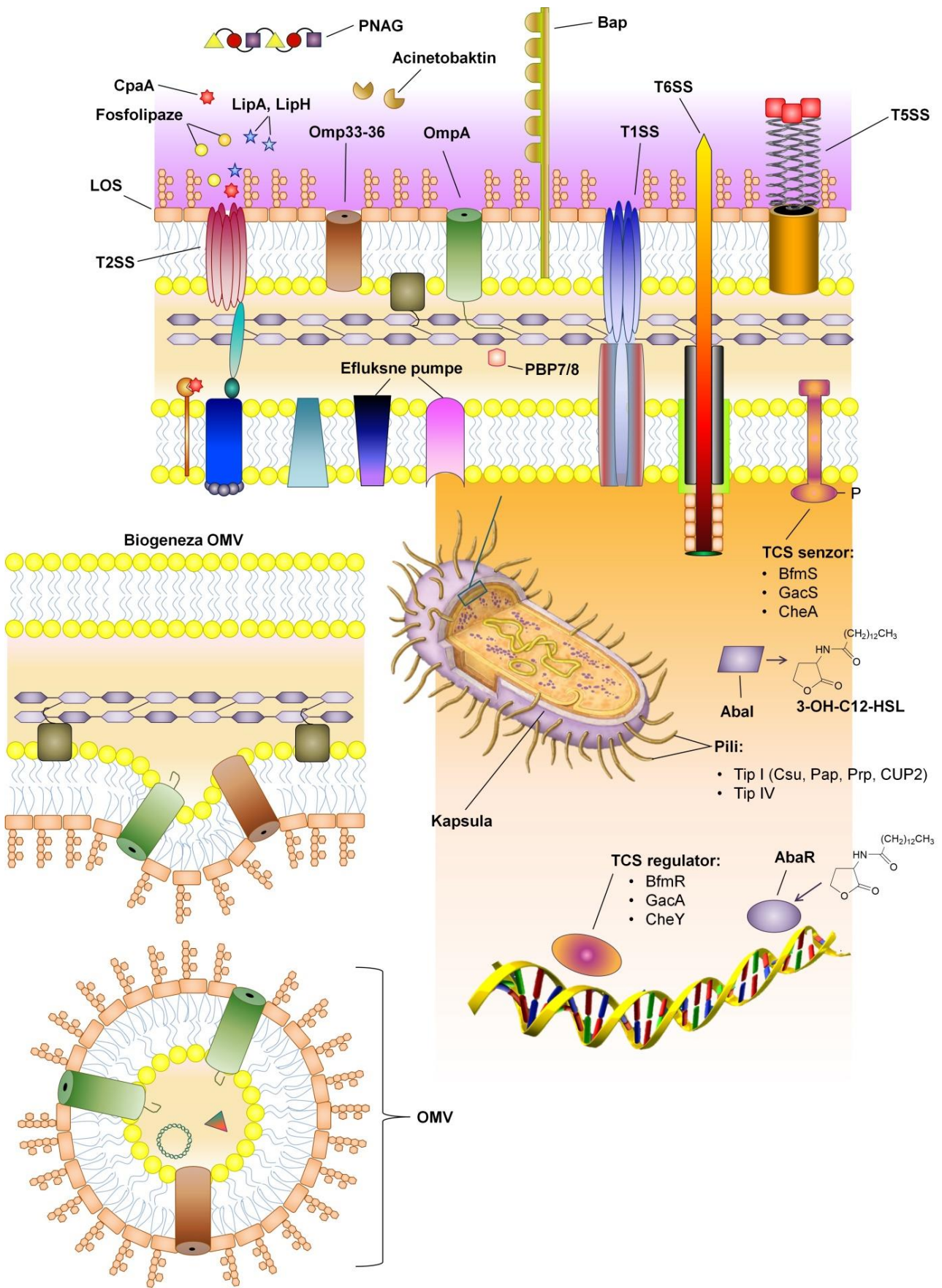
1.5.1. Urođeni imunski odgovor

Urođeni imunski odgovor se aktivira prepoznavanjem PAMP (eng. *Pathogen-Associated Molecular Pattern*), površinski izloženih molekula *A. baumannii*, od strane PRR (eng. *Pattern Recognition Receptor*) humanih ćelijskih receptora. Najznačajniji uticaj ima interakcija TLR4 receptora i LOS. LOS *A. baumannii* sa hepta-acilovanim lipidom A je snažan induktor sekrecije proinflamatornih citokina poput IL-6, IL-1 β , IL-8 i TNF- α , i značajno doprinosi zaštiti ljudskog organizma od *A. baumannii*, prvenstveno stimulacijom akumulacije neutrofila, ali i većem lokalnom oštećenju tkiva (Knapp *et al.*, 2006; Renckens *et al.*, 2006; Korneev *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2017). Lin i saradnici (2012) su pokazali da kod TLR4-deficijentnih miševa nema letalnog ishoda septičkog šoka indukovanoj infekcijom hipervirulentnim HUMC1 sojem nakon 48 h, za razliku od normalnih miševa gde je smrtnost bila 100%, što ukazuje na značaj ove interakcije u patogenezi infekcije izazvane *A. baumannii*. Pored TLR4, u indukciji urođenog imunskog odgovora učestvuju i TLR2 receptor koji prepoznaje različite lipoproteine povezane sa unutrašnjom ili spoljašnjom membranom *A. baumannii* (Moffatt *et al.*, 2013), TLR9 koji prepoznaje CpG DNK motive (Noto *et al.*, 2015), kao i intracelularni NOD1 i NOD2 receptori koji prepoznaju specifične fragmente peptidoglikana (Caruso *et al.*, 2014; Kale *et al.*, 2017). Marion i saradnici (2019) su pokazali da se veliki deo ovih PAMP molekula sekretuje posredstvom vezikula spoljašnje membrane (eng. *Outer Membrane Vesicles*, skr. OMV), koji posledično značajno doprinose indukciji proinflamatornog odgovora. Od komponenti urođenog imuniteta, najvažniju ulogu u odbrani imaju neutrofili. U više studija na životinjama je pokazano da je u slučaju neutropenije značajno povećana smrtnost infekcije (Joly-Guillou *et al.*, 1997; Van Faassen *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2011). Pored neutrofila, značajnu ulogu imaju i makrofagi i sistem komplementa (Qiu *et al.*, 2009; Bruhn *et al.*, 2015). Na stepen urođenog imunskog odgovora u velikoj meri utiče i sposobnost imunoevazije bakterije *A. baumannii*. U tome najznačajniju ulogu ima polisaharidna kapsula, koja predstavlja barijeru za opsonizaciju i posledično fagocitozu, a maskira i PAMP molekule (Abreu i Barbosa, 2017). Sposobnost evazije urođenog imunskog odgovora posredstvom opsonizacije komponentama sistema komplementa pokazala se kao značajan faktor koji doprinosi patogenezi hipervirulentnih sojeva HUMC1 i LAC-4 (Harris *et al.*, 2013; Bruhn *et al.*, 2015). Pored toga, evaziji doprinosi i sposobnost brzog razmnožavanja koju poseduje ova bakterija, što potvrđuje činjenica da veličina infektivnog inokuluma značajno utiče na klinički ishod infekcije (Wong *et al.*, 2017). Iz toga proizilazi još veći značaj multirezistencije i često nemogućnosti veštačke indukcije bakteriostatskog efekta pomoću antibiotika. Takođe, imunoevazivno deluje i skorije identifikovan CipA plazminogen-vezujući protein, koji indukuje aktivnu degradaciju C3b komponente sistema komplementa (Koenigs *et al.*, 2016).

1.5.2. Faktori virulencije

A. baumannii ne spada u visoko invazivne patogene i do infekcija po pravilu dolazi nakon probijanja primarne imunološke barijere, potpomognutim insercijom kolonizovanih medicinskih uređaja. Usled široke rasprostranjenosti, u bolnicama se na pacijentima uglavnom nalazi kao kolonizator, ali ukoliko dođe do uspostavljanja infekcije može se razviti težak klinički oblik (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Harding *et al.*, 2018). Takođe, pošto uglavnom oboljevaju stariji pacijenti i hronični bolesnici, *A. baumannii* se isprva smatrao klasičnim oportunističkim patogenom i smatralo se da težina kliničke slike zavisi isključivo od nivoa kompromitovanosti imunskog sistema. Kasnije opservacije su pokazale suprotno i potvrdile prisustvo brojnih faktora virulencije. Prve naznake o

značaju faktora virulencije kod *A. baumannii* pojavile su se 2007. godine, kada su Smit i saradnici (Smith *et al.*, 2007) sekvenciranjem genoma ATCC 17978 soja identifikovali čak 16 genomskih ostrvaca, koja se razlikuju po nukleotidnom sastavu od ostatka genoma (tzv. ostrvca patogenosti), i u okviru kojih se nalaze geni potencijalno povezani sa virulencijom. Oni su dodatno pokazali da mutacije u šest različitih ostrvaca indukuju atenuaciju virulencije na modelima infekcije *Caenorhabditis elegans* i *Dictyostelium discoideum*. Kasnije je utvrđeno da baš kao i u slučaju rezistencije, zahvaljujući velikom pomoćničkom genomu, *A. baumannii* ima visok potencijal varijabilnosti u delu genoma koji je povezan sa virulencijom, pa se tako u nekim slučajevima pojavljuju visoko virulentni sojevi koji mogu izazvati jako tešku kliničku sliku kod inficiranih pacijenata. Sojevi kao što su LAC-4 (Harris *et al.*, 2013), AB5075 (Jacobs *et al.*, 2014) i HUMC1 (Bruhn *et al.*, 2015) spadaju među hipervirulentne patogene koji su dobro okarakterisani i poslednjih godina se često koriste u proučavanju virulencije *A. baumannii*. Iako još uvek nije poznato da li mutacijom u virulentnije sojeve *A. baumannii* stiže selektivnu adaptivnu prednost u odnosu na manje virulentne sojeve, sve češća izolacija ovakvih sojeva predstavlja ozbiljan razlog za zabrinutost jer su pored visoke patogenosti, po pravilu i visoko rezistentni (Harding *et al.*, 2018). U nastavku teksta biće predstavljeni svi faktori sa dobro okarakterisanim doprinosom virulenciji kod *A. baumannii*, opisani do danas (Slika 5).



Slika 5. Ilustrovani prikaz faktora virulencije *A. baumannii*.

Sistemi za akviziciju mikronutrijenata – Gvožđe, cink i mangan su esencijalni mikronutrijenti za mnoge bakterije, uključujući *A. baumannii*, pošto su neophodni kao kofaktori u brojnim enzimskim reakcijama (Hood i Skaar, 2012). Dostupnost ovih elemenata u slobodnom obliku u ekstracelularnoj sredini ljudskog organizma je ograničena. Gvožđe se najvećim delom nalazi u sastavu hemoglobina unutar eritrocita ili vezano za transportne proteine, kao što su laktoferin i transferin (Sheldon *et al.*, 2016). Cink i mangan, pored toga što su ograničeno dostupni, vezuje protein kalprotektin, čija se produkcija višestruko povećava u stanju akutne infekcije, kao deo tzv. nutritivnog imuniteta (Hood *et al.*, 2012). *A. baumannii* ima nekoliko mehanizama koji mu omogućavaju snabdevanje ovim nutrijentima. Sekretija siderofora, niskomolekularnih visokoafinitetnih Fe^{3+} vezujućih jedinjenja, je najvažniji mehanizam za akviziciju gvožđa (Eijkelkamp *et al.*, 2011). Najmanje 10 strukturno različitih siderofora je identifikovano među kliničkim izolatima *A. baumannii* (Sheldon i Skaar, 2020). Najznačajnija i gotovo univerzalno rasprostranjena je siderofora katehol-hidroksamat tipa – acinetobaktin, koja zahvaljujući jedinstvenoj osobini pH-zavisne izomerizacije između oksazolidinskog i izooksazolidinskog oblika može vezivati gvožđe visokim afinitetom pri kiselim uslovima, kakvi su uobičajeno prisutni na mestima akutnih infekcija (Antunes *et al.*, 2011; Shapiro i Wencewicz, 2016). Identifikovane su i fimsbaktin A-F, takođe siderofore katehol-hidroksamat tipa, kao i baumanoferin A i B, siderofore hidroksamat tipa, međutim, jedino je za acinetobaktin pokazano da značajno doprinosi virulenciji (Proschak *et al.*, 2013; Penwell *et al.*, 2015a; Sheldon i Skaar, 2020). Pored toga, *A. baumannii* koristi transportne sisteme za preuzimanje slobodnog gvožđa iz ekstracelularne sredine, kao što je Feo sistem za preuzimanje Fe^{2+} , a takođe vrši sekretiju fosfolipaza koje zahvaljujući hemolitičkoj aktivnosti oslobađaju hem iz eritrocita, a hem se specifičnim sistemima preuzima u ćelije (Runci *et al.*, 2019; Giardina *et al.*, 2019). Ukupno je čak osam genskih klastera povezanih sa akvizicijom gvožđa identifikovano na pan-genomu *A. baumannii*, i svi su strogo regulisani posredstvom Fur (eng. *Ferric Uptake Regulator*) represorskog proteina. U slučaju prisustva dovoljne količine gvožđa, nagrađuje se Fur- Fe^{2+} kompleks, koji vezivanjem za regulatornu sekvencu – *fur* u okviru promotorskog regiona uzvodno od kodirajuće sekvence operona, inhibira transkripciju gena povezanih sa preuzimanjem gvožđa. U suprotnom, dolazi do disocijacije gvožđa sa Fur i geni se mogu neometano transkribovati (Runci *et al.*, 2019; Allen *et al.*, 2020; Sheldon i Skaar, 2020). Po istom principu funkcioniše i Zur (eng. *Zinc Uptake Regulator*) koji reguliše transkripciju sistema za akviziciju cinka, kao što su ZnuABC transportni sistem i ZigA-Hut metalošaperon-histidin utilizacioni sistem, specijalizovan za importovanje histidin-cink (His-Zn) kompleksa (Hood *et al.*, 2012; Nairn *et al.*, 2016). Mangan se transportuje u bakterijsku ćeliju posredstvom MumT transportera iz NRAMP familije (Juttukonda *et al.*, 2016). U studijama na životinjama je pokazano da redukcija dostupnosti bilo kojeg od ova tri mikronutrijenta, usled oštećene funkcije nekog od navedenih sistema, značajno smanjuje sposobnost *A. baumannii* da preživi u organizmu svog domaćina, redukuje virulenciju i smanjuje sistemsku diseminaciju (Wang *et al.*, 2014a; Gebhardt *et al.*, 2015; Subashchandrabose *et al.*, 2016; Juttukonda *et al.*, 2016).

Od proteina spoljašnje membrane kod *A. baumannii*, posebno važnu ulogu u virulenciji imaju **porini**. To su proteini uronjeni u spoljašnju membranu, savijeni tako da formiraju pore različitih dijametara, koje omogućavaju prolazak malih hidrofилnih jedinjenja kroz hidrofobnu barijeru ćelijskog zida (Rollauer *et al.*, 2015). Najbolje okarakterisan, ujedno i najzastupljeniji porin je OmpA, koji se sastoji od osmolančanog beta bureta sa porom prečnika 2 nm u okviru spoljašnje membrane, i C-terminalne periplazmatske globularne ekstenzije putem koje ostvaruje direktnu interakciju sa peptidoglikanom, vezivanjem za diaminopimelinsku kiselinu (skr. DAP) (Sugawara i Nikaido, 2012; Park *et al.*, 2012). Pored toga što funkcioniše kao porin, za OmpA je pokazano da učestvuje u brojnim aspektima virulencije:

- Stimuliše adheziju bakterijskih ćelija za humane epitelne ćelije i za komponente ekstracelularnog matriksa (skr. ECM), kao što je fibronektin. Takođe, učestvuje u vezivanju *A. baumannii* za filamente hifa *C. albicans*, što može da ima značaja u polimikrobnim

interakcijama između ova dva patogena (Choi *et al.*, 2008a; Gaddy *et al.*, 2009; Smani *et al.*, 2012);

- Doprinosi imunoevaziji, inhibicijom aktivacije alternativnog puta komplementa, posredstvom vezivanja za faktor H (Kim *et al.*, 2009a);
- Stimuliše formaciju i utiče na kompoziciju OMV, moguće modulacijom interakcije C-terminalnog domena i DAP (Moon *et al.*, 2012). Sam OmpA se u okviru sekretovanih OMV transportuje do eukariotskih ćelija, gde ispoljava citotoksično dejstvo (Jin *et al.*, 2011);
- Nakon fuzije OMV koje sadrže OmpA sa humanim epitelnim ćelijama ili makrofagima, OmpA se kolokalizuje uz mitohondrije, gde indukuje mitohondrijalnu fragmentaciju aktivacijom celularne DRP1 GTP-aze, što rezultira ćelijskom smrću (Tiku *et al.*, 2021). Alternativna hipoteza citotoksičnog dejstva je da OmpA kao porin formira kanal na mitohondrijalnoj membrani što dovodi do izlaska citohroma *c* i apoptoza-indukujućeg faktora u citoplazmu, a to posledično indukuje apoptozu (Choi *et al.*, 2005). Pored toga, mali udeo OmpA se translocira i do nukleusa gde indukuje DN-aza I-zavisnu degradaciju DNK (Choi *et al.*, 2008b; Rumbo *et al.*, 2014);
- Učestvuje u površinskom motilitetu *A. baumannii* (Clemmer *et al.*, 2011);
- Stimuliše produkciju biofilma (Gaddy *et al.*, 2009).

Značajan uticaj OmpA na virulenciju *A. baumannii* potvrđen je u više studija, a uzimajući u obzir i prethodno opisan doprinos rezistenciji, ovaj porin nedvosmisleno predstavlja atraktivan target za razvoj novih antimikrobnih agenasa (Sánchez-Encinales *et al.*, 2017; Vila-Farrés *et al.*, 2017; Nie *et al.*, 2020). Omp33-36 (poznat i kao Omp34) je još jedan porin za koji je pokazano da indukuje apoptozu u eukariotskim ćelijama posredstvom kaspaza-zavisnih mehanizama, sekretuje se posredstvom OMV, stimuliše adheziju bakterija vezivanjem za fibronektin, a pored toga doprinosi imunoevaziji inhibicijom autofagije bakterija internalizovanih unutar autofagozoma fagocita (Smani *et al.*, 2012; Rumbo *et al.*, 2014; Jahangiri *et al.*, 2018). Još nekoliko porina je okarakterisano, uključujući CarO i OccAB1-5, čija je modulacija sinteze povezana sa rezistencijom na antibiotike, prvenstveno karbapeneme (Geisinger *et al.*, 2019).

A. baumannii eksprimira **pili** tipa I i IV koji imaju ulogu u adheziji, formaciji biofilma i motilitetu. Različiti oblici pila su varijabilno ekspimirani među kliničkim sojevima. Najznačajniji i najrasprostranjeniji pili tipa I su Csu (eng. *Chaperone-usher*) pili, kodirani od strane *csuA/BABCDE* operona. Tomaras i saradnici (2003) su na soju ATCC 19606 demonstrirali učešće Csu pila u adheziji i formaciji biofilma na abiotičkim površinama. Csu pili, međutim, ne doprinose adheziji na humane ćelije (de Breij *et al.*, 2009). Ove opservacije se poklapaju sa činjenicom da soj ATCC 17978 koji ne proizvodi Csu pile formira mnogo slabije biofilme na plastičnoj površini (McConnell *et al.*, 2013). Pored Csu pila, kod nekih sojeva, uključujući ATCC 19606, identifikovani su i kraći pili tipa I – Pap pili, homologi P pila *E. coli*, takođe csu tipa, koji imaju ulogu u adheziji na humane ćelije (de Breij *et al.*, 2009; Marti *et al.*, 2011; Cerqueira *et al.*, 2014). Prp pili su takođe pili tipa I, koji su podložni fotoregulaciji, i povezani su sa kapacitetom produkcije biofilma i površinskim motilitetom. Pod uticajem vidljive svetlosti inhibirana je ekspresija ovih pila, a posledično i sposobnost motiliteta i produkcije biofilma (Álvarez-Fraga *et al.*, 2016; Wood *et al.*, 2018). CUP2 pili su otkriveni kao proizvod homologa *prpABCD* operona kod patogena urinarnog trakta *A. baumannii* UPAB1 soja, i pokazano je da imaju važnu ulogu u adheziji za urinarni kateter i lumen bešike na modelu infekcije miša (Di Venenzio *et al.*, 2019). Pili tipa IV imaju ulogu u motilitetu trzanjem, odnosno ponavljajućim ciklusima ekstenzije i retrakcije, polimerizacijom odnosno depolimerizacijom Pila pilinskih subjedinica, omogućavaju kretanje *A. baumannii* po polučvrstim površinama (Wilharm *et al.*, 2013; Harding *et al.*, 2013). Džejkobs i saradnici (Jacobs *et al.*, 2012) su pokazali da tokom rasta u humanom serumu dolazi do ushodne

regulacije gena koji kodiraju tip IV pila, što ukazuje na njihov značaj u toku bakterijemije. Pored toga, pili tipa IV imaju ulogu u formaciji biofilma (Ronish *et al.*, 2019) i vezivanju eDNK molekula u procesu transformacije (Harding *et al.*, 2013; Wilharm *et al.*, 2013). Generalno, nije pokazan veliki doprinos pila virulenciji i preživljavanju *in vivo*, ali zato stimulacijom formacije biofilma značajno doprinose perzistenciji na neživim površinama (Geisinger *et al.*, 2019).

Bap (eng. *Biofilm-associated protein*) je veliki površinski protein (>800 kDa), homolog stafilokoknom Bap, koji se kao efektor tip I sekrecionog sistema (skr. T1SS) eksportuje i doprinosi formaciji i sazrevanju biofilma kod *A. baumannii* (Loehfelm *et al.*, 2008; Harding *et al.*, 2017). Pored toga, stimuliše adheziju na humane ćelije modulacijom hidrofobnosti ćelijske površine (Brossard i Campagnari, 2012). Bap nije eksprimiran u svim sojevima, ali su kod njih uglavnom prisutni homologni proteini poput BLP (eng. *Bap-Like Protein*) 1 i 2 (De Gregorio *et al.*, 2015).

Poli- β -1,6-N-acetilglukozamin (skr. PNAG) je egzopolisaharid koji univerzalno produkuju i sekretuju sojevi *A. baumannii* i predstavlja važnu komponentu EPS matriksa zrelih biofilmova (Choi *et al.*, 2009). Proizvodnja PNAG je posredovana *pgaABCD* operonom, koji kodira tzv. sintaza kompleks neophodan za polimerizaciju i translokaciju PNAG kroz plazma membranu (Low i Howell, 2018). Delecija *pga* lokusa rezultira značajnom inhibicijom sposobnosti produkcije biofilma (Choi *et al.*, 2009).

Važnu ulogu u regulaciji virulencije *A. baumannii* imaju **dvokomponentni sistemi (TCS)**. Sastoje se od dva proteina, membranske senzor kinaze, koja reaguje na stres indukovanoj uticajem spoljašnjih faktora na ćelijsku ovojnici, i DNK-vezujući transkripcioni regulator, koji modulira transkripciju multiplih genskih klastera (Zschiedrich *et al.*, 2016). Šest TCS je opisano kod *A. baumannii*, od čega je najbolje okarakterisan BfmRS, koji se sastoji od membranske BfmS histidin kinaze i BfmR transkripcionog regulatora, pri čemu BfmS funkcioniše kao negativni regulator BfmR proteina (Geisinger *et al.*, 2018). Povećana aktivnost BfmR je povezana sa stimulacijom formacije biofilma i proizvodnje Csua pila (Tomaras *et al.*, 2008), kao i sa povećanjem produkcije kapsule (Geisinger i Isberg, 2015). BfmRS ima važnu ulogu i u regulaciji ćelijske deobe, a *bfmS*-deficijentni mutanti sa hiperaktivnim BfmR ispoljavaju visoku frekvenciju deoba i posledično kraći kokoidni oblik nastalih ćelija (Tomaras *et al.*, 2008; Geisinger *et al.*, 2018). Osim toga, koordinisana aktivnost BfmRS je važna u sintezi peptidoglikana, spoljašnje membrane, proteina i lipoproteina ćelijskog zida (Geisinger *et al.*, 2018), i sveukupno *bfmRS*-defektni mutanti imaju značajno redukovano virulenciju (Umland *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014a), tako da BfmRS predstavlja vrlo atraktivan target za razvoj alternativnih terapijskih strategija. Ipak, verovatno još značajniji TCS, u smislu doprinosa virulenciji, je GacAS, sastavljen od GacS senzora, koji za razliku od BfmRS sistema pozitivno reguliše aktivnost GacA proteina (Allen *et al.*, 2020). Studije na životinjskim modelima su pokazale da inaktivaciona mutacija *gacS* ili *gacA* gena rezultira kompletnom atenuacijom *A. baumannii* (Cerqueira *et al.*, 2014; Kröger *et al.*, 2017). GacAS reguliše ekspresiju nekoliko potvrđenih i potencijalnih faktora virulencije, kao što su OmpA, Csua pili, motilitet i formacija biofilma, međutim, smatra se da je ključna njegova uloga u regulaciji kataboličkog puta fenilacetata preko *paa* operona (Cerqueira *et al.*, 2014; Bhuiyan *et al.*, 2016; Martinez *et al.*, 2019). Činjenica da su *paa*-deficijentni mutanti ispoljili ekvivalentnu redukciju patogenosti kao i *gacS*-deficijentni mutanti na modelu infekcije zebrića (*Danio rerio*) (Kroger *et al.*, 2016) potvrđuje ovu pretpostavku, a smatra se da je inhibicija virulencije posledica akumulacije fenilacetata, koji deluje kao jak hemoatraktant za neutrofile i druge ćelije urođenog imunskog odgovora (Bhuiyan *et al.*, 2016). Na virulenciju utiče i CheAY TCS, regulacijom ekspresije Csua pila i AbaI sintaze autoinduktorskih QS molekula (Chen *et al.*, 2017a), dok su ostali identifikovani TCS (PmrAB, AdeRS i BaeSR) uključeni u regulaciju rezistencije na antibiotike (Geisinger *et al.*, 2019).

Sistem međućelijske komunikacije (QS) je mehanizam kojim bakterijske ćelije regulišu ekspresiju fenotipova u zavisnosti od gustine bakterijske populacije. QS sistem kod *A. baumannii* je

homolog dobro okarakterisanog LuxRI sistema *Vibrio fischeri*, rasprostranjenog među Gram-negativnim bakterijama (Whitehead *et al.*, 2001) i sastoji se od AbaR receptora i transkripcionog regulatora, AbaI sintaze i autoinduktorskih molekula iz familije *N*-acil-homoserin laktona (skr. AHL) (Saipriya *et al.*, 2020). Kada populacija postane dovoljno gusta (postigne se kvorum), dolazi do aktivacije AbaI enzima, posredstvom specifičnih molekula iz okolnih bakterijskih ćelija, koji sintetiše AHL molekule. AHL deluju na susedne bakterijske ćelije, gde aktiviraju AbaR proteine koji regulišu transkripciju multiplih genskih klastera, i između ostalog, stimulišu transkripciju *abal* čime se postiže pozitivna povratna sprega (Papenfort i Bassler, 2016). Jedini detektovani AHL molekul kod *A. baumannii* je *N*-(3-hidroksidodekanoil)-*L*-homoserin lakton (3-OH-C12-HSL), a povećana aktivnost QS je povezana sa stimulacijom formacije biofilma i površinskog motiliteta (Niu *et al.*, 2008; Clemmer *et al.*, 2011). Na modelu infekcije zebrića, pokazan je doprinos QS sistema virulenciji, pošto su *abal*-deficijentni mutanti ispoljili smanjenu stopu preživljavanja (Bhuiyan *et al.*, 2016).

Iako bi se po poreklu imena moglo zaključiti da se radi o nepokretnom rodu bakterija (grč. *akinetos* (ακίνητος) – nepokretan), *Acinetobacter* spp. ispoljava **motilitet**. Ovaj fenotip je prvi put zabeležen još pre više od 50 godina, kada je Halvorsen (1963) primetio da se *A. calcoaceticus* (tada *B. anitratum*) kreće specifično nalik na klizanje (eng. *gliding*), kako je i opisao ovaj oblik motiliteta. Njegova studija je prošla neopaženo i „*Acinetobacter*“ je prihvaćen kao zvaničan naziv roda. Henriksen (Henrichsen, 1975) je 12 godina kasnije primetio isti način kretanja *A. calcoaceticus* i opisao to kao trzanje (eng. *twitching*). Uprkos tome, istraživači su gotovo univerzalno nastavili da opisuju *Acinetobacter* spp. kao nepokretan rod bakterija, sve dok Klemmer i saradnici (Clemmer *et al.*, 2011) nisu definisali površinski motilitet kod *A. baumannii*. Oni su pokazali da nekoliko faktora utiče na površinski motilitet, uključujući pile tipa IV, QS, OmpA i BfmRS. Kasnije je utvrđeno da pili tipa IV nemaju ulogu u površinskom motilitetu (Harding *et al.*, 2013), a redukovana pokretljivost *pilT*-deficijentnih mutanata, bez funkcionalnih pila tipa IV, bi mogla biti posledica indukovane fazne konverzije kolonijalnog fenotipa, jer providna fazna varijanta ispoljava smanjen površinski motilitet (Tipton i Rather, 2017; Harding *et al.*, 2018). Površinski motilitet *A. baumannii* je po izgledu najsljedniji motilitetu rojenjem (eng. *swarming*), jedino što rojenje pokreću flagele (Kearns, 2010), elementi motiliteta koji nisu prisutni kod ove bakterije. Interesantno, za površinski motilitet je pokazano da je suprimiran kada se bakterije izlažu vidljivoj svetlosti, naročito plave talasne dužine (462 nm), što je potpuno neočekivano s obzirom da *A. baumannii* nije fotosintetički organizam (Mussi *et al.*, 2010). Ova opservacija dodatno ističe kompleksnost regulatorne mreže koja učestvuje u kontroli površinskog motiliteta i ukazuje na postojanje neočekivanih faktora koji mogu da utiču na različit ishod infekcija. Na primer, prilikom infekcije površinskih rana, bakterije su izložene dnevnoj svetlosti, što nije slučaj kod infekcija unutrašnjih organa (McConnell *et al.*, 2013). Pretpostavlja se da je inhibicija motiliteta pod uticajem svetlosti plave talasne dužine posledica nishodne regulacije ekspresije *prpABCD* operona, koji kodira fotosenzitivne Prp pile (Wood *et al.*, 2018). Pored površinskog, *A. baumannii* ispoljava i motilitet trzanjem, koji je posredovan pilima tipa IV (Harding *et al.*, 2013; Wilharm *et al.*, 2013). Studije su pokazale da su izolati iz hemokulture pokretniji u odnosu na izolate iz sputuma (Vijayakumar *et al.*, 2016), što je u saglasnosti sa opservacijom da tokom rasta bakterija u humanom serumu dolazi do ushodne regulacije genskog klastera koji kodira pile tipa IV (Jacobs *et al.*, 2012), i što ukazuje na mogućnost da bi ovaj oblik motiliteta mogao predstavljati fenotip koji pruža prednost bakterijama za preživljavanje u određenim anatomskim regijama, kao što je npr. krvotok. Osim toga, hipermotilni sojevi su pokazali povećanu virulenciju na modelu infekcije *C. elegans* (Eijkelkamp *et al.*, 2013).

Spoljašnja membrana ćelijskog zida Gram-negativnih bakterija sastoji se od asimetričnog dvosloja pri čemu je spoljašnji sloj izgrađen prvenstveno od glikolipida. Kod većine vrsta to je lipopolisaharid (skr. LPS), koji se sastoji od visoko acilovanog disaharida – lipida A, posredstvom kojeg je uronjen u spoljašnju membranu, oligosaharidnog jezgra i varijabilne količine ponavljajućih jedinica polisaharida, koje se pružaju prema ekstracelularnoj sredini i kao visoko imunogena

komponenta često su poznate i pod nazivom O antigen. Ovakva hidrofilna struktura spoljašnjeg šećernog regiona pruža snažnu barijeru za permeabilnost hidrofobnih jedinjenja, uključujući neke antimikrobne molekule (Wang i Quinn, 2010). *A. baumannii*, međutim, ne sadrži O antigen, tako da se struktura sastavljena od lipida A i oligosaharidnog jezgra kod ovog patogena naziva **lipooligosaharid (LOS)**, što je slučaj i kod nekih drugih rodova, od čega je najpoznatiji *Neisseria* spp. (Weber *et al.*, 2016). Još jedna specifična karakteristika LOS *A. baumannii* jeste da je lipid A predominantno hepta-acilovan, odnosno za jedan disaharid je vezano sedam masnih kiselina od 12-14 ugljenikovih atoma, umesto šest kao kod većine drugih Gram-negativnih bakterija, kod kojih se samo u određenim slučajevima pod uticajem spoljašnjih stresora vrši adicija sedmog acil lanca. Pokazano je da se konstitutivna hepta-acilacija kod *A. baumannii* održava posredstvom dualne lauril aciltransferazne aktivnosti LpxM enzima, a da *lpxM*-deficijentni mutanti pokazuju veću osetljivost na antimikrobne peptide i smanjenu virulenciju na modelu infekcije *G. mellonella* (Boll *et al.*, 2015). Osim toga, *A. baumannii* ima mogućnost da preživi i raste uz kompletno odsustvo produkcije LOS, fenomen koji je zabeležen i kod *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* i *Chlamydia trachomatis*, takođe LOS-produkujućih vrsta. S druge strane, tu mogućnost nemaju ostale Gram-negativne bakterije, verovatno zato što se u slučaju izostanka LPS formiraju velike smrtonosne lezije u ćelijskom zidu na mestima O antigena (Harding *et al.*, 2018; Geisinger *et al.*, 2019). Gubitak sposobnosti sinteze LOS kod *A. baumannii* nastaje kao posledica mutacija u *lpxA*, *lpxC*, ili *lpxD* biosintetičkim genima, i to je jedan od primera stečene rezistencije na polimiksine. S druge strane, mutacije *lpxH* ili *lpxK* nisu dozvoljene, jer dovode do akumulacije toksičnih intermedijera biosintetičkog puta LOS (Ritchie *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2017). Pretpostavlja se da je hiperekspresija lipoproteina i lipoproteinskog transportnog sistema kompenzatorni mehanizam, koji LOS-deficijentnim sojevima obezbeđuje funkcionalnu spoljašnju membranu i mogućnost preživljavanja (Boll *et al.*, 2016). LOS-deficijentni mutanti, iako rezistentni na katjonske antimikrobne peptide, su povećano osetljivi na velike i hidrofobne antibiotike (npr. fuzidinska kiselina, novobiocin, azitromicin i rifampin) usled promena u strukturi spoljašnje membrane (Bojkovic *et al.*, 2015; Boll *et al.*, 2016) i imaju oslabljenu virulenciju (Lin *et al.*, 2012; Beceiro *et al.*, 2014). Jedan od mehanizama smanjene virulentnosti ovih sojeva mogao bi biti odsustvo jakog TLR4-posredovanog urođenog imunskog odgovora na lipid A (Moffatt *et al.*, 2013), a pokazano je i da produkcija LOS utiče na kapacitet površinskog motiliteta (McQueary *et al.*, 2012).

Površina *A. baumannii* je obavijena debelom polisaharidnom **kapsulom** (Russo *et al.*, 2010). Kapsula ima ključnu ulogu u zaštiti od imunskog odgovora domaćina, s obzirom da ispoljava antifagocitno delovanje, jer kao hidrofilna i negativno naelektrisana ometa interakciju sa negativno naelektrisanim fagocitima, maskira PAMP molekule i smanjuje depoziciju komponenti sistema komplementa na površini bakterija, odnosno inhibira opsonizaciju (Graveline *et al.*, 2007; Cress *et al.*, 2014). Nekoliko studija je pokazalo da indukovanje defekata u biosintetičkom putu kapsule drastično smanjuje virulenciju *A. baumannii* (Lees-Miller *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014a; Geisinger *et al.*, 2015; Russo *et al.*, 2016). Štaviše, zamućena fazna varijanta, koju karakteriše mukoidni fenotip kolonija i dvostruko veća proizvodnja kapsule od strane bakterijskih ćelija, pokazuje znatno veću virulenciju (Chin *et al.*, 2018), što ističe kapsulu kao veoma značajan faktor virulencije kod *A. baumannii*. Osim toga, razlike u kompoziciji kapsularnog polisaharida mogu uticati na stepen virulentnosti. Na primer, hipervirulentni HUMC1 soj je manje osetljiv na fagocitozu zbog mutacije *gtr6* gena u okviru kapsularnog genskog lokusa (Talyansky *et al.*, 2021). Sinteza kapsularnih egzopolisaharida se odvija u dve faze. U prvoj fazi se dejstvom glikoziltransferaze sintetišu ponavljajuće oligosaharidne jedinice na Und-P lipidnom nosaču, koji ih prebacuje sa citoplazmatske na periplazmatsku stranu citoplazmatske membrane uz pomoć dejstva flipaze (Wzx), a sam se reciklira nazad na citoplazmatsku stranu. Ova faza je zajednička sa sintezom oligosaharidnih jedinica kojima se vrši O-glikozilacija specifičnih proteina posredstvom O-oligosahariltransferaze (PglL) (Iwashkiw *et al.*, 2012). Drugu fazu predstavlja polimerizacija oligosaharidnih jedinica u kapsularni egzopolisaharid i translokacija nastale strukture na površinu ćelije, delovanjem enzima Wzy, Wza, Wzb i Wzc (Collins *et al.*, 2007; Kenyon i Hall, 2013;

Senchenkova *et al.*, 2015). Vezivanje kapsularnog egzopolisaharida na površinu bakterijske ćelije verovatno uključuje učešće ortologa *E. coli* Wzi lektina iz spoljašnje membrane (Sanchez-Larrayoz *et al.*, 2017). Odsustvo kapsule, osim što sojeve čini avirulentnim (Lees-Miller *et al.*, 2013), može povećati njihovu osetljivost na spoljašnje stresore. Studije na *wzc*- i *wza*-deficijentnim mutantima, pokazale su da su ovi sojevi znatno osetljiviji na β -laktamske antibiotike i lizozim, kao i na dezinficijense i desikaciju (Gebhardt *et al.*, 2015; Tipton *et al.*, 2018). Zbog toga, kapsularna sintetička mašinerija kod *A. baumannii* smatra se atraktivnim targetom za razvoj alternativnih terapijskih procedura (Sachdeva *et al.*, 2017).

Većina sojeva *A. baumannii* sadrži dva proteinska **O-glikozilaciona sistema**. Jedan, koji uz pomoć PglL vrši adiciju oligosaharidnih jedinica, sintetisanih u okviru puta koji je zajednički sa biosintezom kapsule, na različite membranske proteine, i drugi, koji vrši glikozilaciju proteina pila tipa IV dejstvom TfpO oligosahariltransferaze (Iwashkiw *et al.*, 2012; Harding *et al.*, 2015). Funkcija proteinske glikozilacije još uvek nije najbolje razjašnjena, iako se pretpostavlja da doprinosi imunoevaziji na taj način što maskira imunogene epitope površinskih proteina (Piepenbrink *et al.*, 2016). To nagoveštava i činjenica da je kompozicija oligosaharidnih jedinica veoma varijabilna između proteina različitih sojeva (Scott *et al.*, 2014). Pored toga, O-glikozilacioni sistem ima ulogu i u formaciji biofilma, a mutanti bez funkcionalne O-glikozilacione aktivnosti pokazali su slabiju virulenciju na modelima *G. mellonella* i indukovane septikemije kod miševa (Iwashkiw *et al.*, 2012; Lees-Miller *et al.*, 2013).

Fosfolipaze su enzimi koji razgradnjom membranskih fosfolipida ispoljavaju citolitičko dejstvo na humane ćelije, i kao takvi su dobro definisani faktori virulencije (Schmiel i Miller, 1999). *A. baumannii* proizvodi dve fosfolipaze tipa C (skr. PLC) i tri fosfolipaze tipa D (skr. PLD), koje sekretuje posredstvom sekrecionog sistema tipa II (skr. T2SS) (Stahl *et al.*, 2015; Elhosseiny i Attia, 2018). Pokazana je uloga fosfolipaza u akviziciji gvožđa kod *A. baumannii*, s obzirom da je transkripcija oba tipa enzima pod kontrolom Fur transkripcionog regulatora, i da fosfolipaze citolizom razgrađuju eritrocite iz kojih oslobađaju hem kao izvor gvožđa (Fiester *et al.*, 2016). Pored toga, inaktivacija jedne od dve PLC rezultirala je inhibicijom apoptoze u *in vitro* testu na epitelnim ćelijskim linijama (Camarena *et al.*, 2010), što uz pokazanu redukciju virulencije i diseminacije na modelima *G. mellonella* i pneumonije kod miševa (Jacobs *et al.*, 2010; Stahl *et al.*, 2015), potvrđuje značaj fosfolipaza kao faktora virulencije kod *A. baumannii*.

Još jedan od potencijalnih targeta za inhibiciju virulencije mogao bi biti **PBP 7/8**, pošto su *pbpG*-deficijentni mutanti koji ne produkuju ovaj protein pokazali redukciju rasta u humanom serumu i smanjenu sposobnost preživljavanja na modelima infekcije mekih tkiva kod pacova i pneumonije kod miševa (Russo *et al.*, 2009; 2011). Pretpostavlja se da PBP 7/8 utiče na stabilnost ćelije, posredstvom uticaja na peptidoglikanski sloj, što nagoveštava i podatak da su PBP 7/8-deficijentni mutanti ispoljili promenjenu ćelijsku morfologiju nakon vizualizacije pod elektronskim mikroskopom (Russo *et al.*, 2011).

Vezikule spoljašnje membrane (OMV) su male sferične čestice veličine 10-300 nm, koje konstitutivno proizvode sve Gram-negativne bakterije (Roier *et al.*, 2016). Jedan od mehanizama za koji se smatra da je odgovoran za produkciju OMV kod *A. baumannii* je prekid interakcije između spoljašnje membrane i peptidoglikana, posredstvom promene konformacije OmpA, što izaziva protruziju spoljašnje membrane, prilikom čega se formira i izdvoji vezikula (Moon *et al.*, 2012; Roier *et al.*, 2016). Ovoj hipotezi u prilog ide činjenica da je kod *ompA*-deficijentnih mutanata znatno smanjena formacija OMV (Moon *et al.*, 2012). OmpA je ujedno i najzastupljenija komponenta OMV, posredstvom kojih se dostavlja do humanih ćelija, gde ispoljava citotoksičnost (Jin *et al.*, 2011). Osim OmpA, identifikovano je još nekoliko stotina molekula povezanih sa OMV, pre svega komponenti spoljašnje membrane, poput OmpH, OmpW i Omp33-36, ali i proteina citoplazme, periplazmatskih proteina i komponenti citoplazmatske membrane (Mendez *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2017). Pored toga što funkcionišu kao transportna sredstva za dostavljanje toksičnih

proteina poput OmpA i CsuA (Jin *et al.*, 2011), OMV kod *A. baumannii* mogu učestvovati u širenju rezistencije između različitih sojeva, pošto je detektovano prisustvo plazmida sa genima koji kodiraju karbapenemaze: *bla*_{OXA-24} i *bla*_{NDM-1} (Rumbo *et al.*, 2011; Chatterjee *et al.*, 2017). Takođe, OMV mogu sadržati β-laktamaze, kao što su karbapenemaze klase D i AmpC β-laktamaze, i na taj način hidrolizovati β-laktamske antibiotike u ekstracelularnoj sredini (Jin *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2015), a ispoljavaju i imunomodulatorno dejstvo i doprinose zaštiti od imunskog odgovora (Kaparakis-Liaskos i Ferrero, 2015).

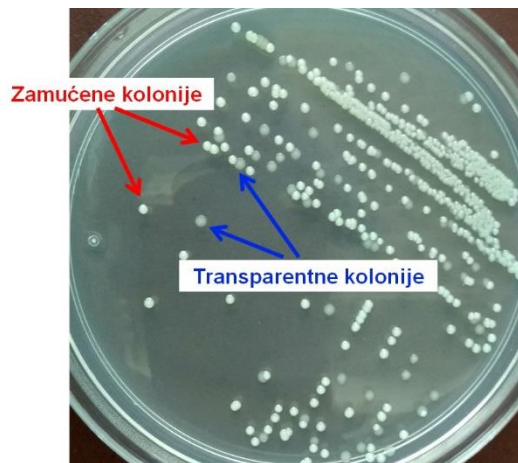
Sekrecioni sistemi tipa V (skr. T5SS) ili autotransporter, su proteini koji se sastoje od N-terminalnog signalnog peptida, koji im obezbeđuje transport kroz citoplazmatsku membranu na Sec-zavisni način, i C-terminalnog beta bureta, koji formira poru u okviru spoljašnje membrane kroz koji se sekretuje centralni, tzv. „putnički domen“ (Fan *et al.*, 2016). Kod *A. baumannii* su identifikovana tri autotransportera: Ata (eng. *Acinetobacter trimeric autotransporter adhesin*) iz Vc podfamilije, kao i AbFhaB/C i CdiA/B, dva autotransportera iz Vb familije (Bentancor *et al.*, 2012a; 2012b; Perez *et al.*, 2017; Elhosseiny i Attia, 2018). Najveći značaj ima Ata, trimerni autotransporter, za koji je pokazano da ima veoma važnu ulogu u adheziji posredstvom vezivanja za komponente ekstracelularnog matriksa, posebno kolagen (tipa IV, III i V) i laminin, i direktno za humane epitelne i endotelne ćelije (Bentancor *et al.*, 2012b; Weidensdorfer *et al.*, 2016). Pored toga, Ata učestvuje i u formaciji biofilma, a inaktivaciona mutacija Ata-kodirajuće genske sekvence rezultirala je kompletnom atenuacijom u eksperimentalnom modelu indukovane pneumonije kod miševa (Bentancor *et al.*, 2012b). U manjoj meri, redukcija virulencije na modelima *C. elegans* i sistemske infekcije miševa, postignuta je i kod AbFhaB/C-defektnih mutanata (Perez *et al.*, 2017). S druge strane, CdiA/B autotransporter ima ulogu u ubijanju kompetitivnih bakterija na T6SS-nezavisan način (Harding *et al.*, 2017).

Svi tipovi sekrecionih sistema, osim tipa III (skr. T3SS), su identifikovani kod *A. baumannii*. **Tip I (skr. T1SS)** sekretuje efektorske proteine direktno iz citosola u ekstracelularnu sredinu. Kao efektori su identifikovani Bap i protein sa RTX (eng. *Repeats In Toxin*) domenom. Oba proteina imaju uloge u formaciji biofilma (Satchell, 2011; Harding *et al.*, 2018). **Tip II (skr. T2SS)** je dvostepeni sekrecioni sistem, zavisan od Sec ili Tat proteina, pomoću kojih se efektori transportuju iz citosola u periplazmatski prostor, odakle se u drugom koraku sekretuju izvan ćelije. T2SS značajno doprinosi virulenciji *A. baumannii*, s obzirom da sekretuje citotoksične proteine, kao što su lipaze (LipA i LipH), fosfolipaze (PLC i PLD) i alkalna fosfataza (Elhosseiny i Attia, 2018). Takođe, sekretuje efektore koji stimulišu sistemska diseminaciju i invaziju tkiva, kao što su CpaA cink-zavisna metaloendopeptidaza, koja vrši degradaciju fibrinogena i faktora koagulacije V, odnosno elastaza, koja razgrađuje vezivno tkivo (Harding *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2016; Elhosseiny i Attia, 2018). T2SS *A. baumannii* je jedinstven i po tome što za sekreciju LipA i CpaA efektor zahteva specifične šaperone (LipB i CpaB), proteine koje inače koristi T3SS kod drugih bakterijskih vrsta (Harding *et al.*, 2016). Učešće T2SS u virulenciji potvrđeno je u višestrukim *in vivo* studijama (Harding *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2016), a kao posebno značajan faktor virulencije se pokazao **CpaA** efektor (Tilley *et al.*, 2014; Kinsella *et al.*, 2017). Tip IV (skr. T4SS) je odgovoran za transfer plazmida i drugih mobilnih genetičkih elemenata u procesu konjugacije (Iacono *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014), tako da doprinosi širenju rezistencije, dok je **tip VI (skr. T6SS)** odgovoran za eliminaciju kompetitivnih bakterijskih ćelija, sekrecijom različitih antibakterijskih toksina, poput peptidoglikan hidrolaze (Rhs1), DN-aze (Rhs2) i Rhs3 enzima koji nepoznatim mehanizmom indukuje lizu *E. coli* (Weber *et al.*, 2013; Fitzsimons *et al.*, 2018). Sekrecija svakog T6SS efektor zahteva prisustvo specifičnog VgrG proteina i vrši se direktno iz citosola (Fitzsimons *et al.*, 2018; Lopez *et al.*, 2020). Komparativnom analizom genoma 23 klinička izolata, zaključeno je da svaki soj sekretuje specifičan set T6SS efektor, što je u skladu sa opservacijama da svaki soj pokazuje različitu aktivnost ubijanja kompetitivnih bakterija (Fitzsimons *et al.*, 2018; Geisinger *et al.*, 2019). Osim toga, ekspresija T6SS-kodirajućih gena je pod kontrolom multiplih regulatornih mehanizama, uključujući TetR i *H-NS* transkripcione represore (Eijkelkamp

et al., 2014; Weber *et al.*, 2016). Iako ne ispoljava dejstvo na eukariotske ćelije, inaktivacija T6SS-kodirajućih gena uzrokovala je redukovanu virulenciju na modelima *G. mellonella* i sistemske infekcije miševa (Repizo *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018a), kao i smanjenu formaciju biofilma i mogućnost preživljavanja u humanom serumu (Kim *et al.*, 2017).

Efluksne pumpe kod *A. baumannii*, osim što imaju kritičnu ulogu u rezistenciji na antimikrobne agense, mogu da doprinesu i virulenciji. Pumpa ABC superfamilije je neophodna za aktivnu sekreciju siderofore acinetobaktina, koji je dokazani faktor virulencije, a pored toga, još neke pumpe iz MFS i MATE familija sekretuju druge tipove siderofora (Eijkelkamp *et al.*, 2011). S druge strane, hiperekspresija RND pumpi (AdeABC, AdeIJK, ili AdeFGH) može štetno uticati na bakterijsku ćeliju usled indukovanih površinskih promena, kao što su modifikacija lipidne kompozicije membrane, redukcija ekspresije Csu pila i smanjena formacija biofilma (Yoon *et al.*, 2015; Leus *et al.*, 2018). Čak su na modelima sistemske i plućne infekcije miševa, sojevi sa prekomernom ekspresijom AdeABC i AdeIJK ispoljili fenotipove umereno redukovane virulencije (Yoon *et al.*, 2016), što nagoveštava da se tretmanom antibioticima, na koje sojevi razvijaju rezistenciju preko efluksnih pumpi, može u određenoj meri smanjiti virulencija. Ipak, generalno je stav da je redukcija virulencije mala šteta u odnosu na korist koju sojevi dobijaju rezistencijom na antibiotike, a hiperprodukcija RND pumpi je visoko zastupljena kod kliničkih izolata *A. baumannii* (Rumbo *et al.*, 2013).

Pored izuzetne plastičnosti genoma, *A. baumannii* sadrži i kompleksnu regulacionu mrežu sa preko 200 detektovanih transkripcionih faktora (Casella *et al.*, 2017) i mnoštvom sRNK i TCS (Allen *et al.*, 2020), koji doprinose velikoj varijabilnosti virulentnih i rezistentnih fenotipova između različitih kliničkih izolata. Svaki soj ispoljava specifičan transkriptom u smislu ekspresije faktora virulencije (Antunes *et al.*, 2014; Allen *et al.*, 2020). Tek manje od 20% transkripcionih faktora *A. baumannii* je funkcionalno ispitano, a jedan od najznačajnijih je **ABUW_1645**, regulator TetR tipa, za koji je pokazano da reguliše faznu konverziju između virulentnog fenotipa sa zamućenim kolonijama i avirulentnog fenotipa sa transparentnim kolonijama (Slika 6) (Tipton *et al.*, 2015; Chin *et al.*, 2018). Čak 70% diferencijalno eksprimiranih gena pod uticajem ABUW_1645 je uočeno analizom transkriptoma, od čega su najočiglednije površinske i morfološke promene (Chin *et al.*, 2018). Nishodna regulacija ABUW_1645 favorizuje fenotip sa zamućenim kolonijama, koji se karakteriše hiperprodukcijom kapsule i posledično mukoidnim izgledom bakterijskih kolonija, kao i kraćim kokoidnim morfološkim oblikom ćelija. Pored toga, ćelije u ovoj faznoj varijanti su rezistentnije na antimikrobne peptide, aminoglikozide, oksidativni stres i lizozim, što im pruža selektivnu adaptacionu prednost za preživljavanje u humanom domaćinu. Specifični faktori koji regulišu ekspresiju ABUW_1645 i posledično faznu konverziju nisu razjašnjeni, ali je pokazano da se zamućeni fenotip favorizuje u toku infekcije humanih domaćina, naročito u slučaju bakterijemije, a *in vivo* na modelu indukovane pneumonije kod miševa dokazana je veća virulencija fenotipa sa zamućenim kolonijama (Chin *et al.*, 2018; Allen *et al.*, 2020). Navedeni fenotip je rezistentniji i na dezinficijense i desikaciju, tako da doprinosi adaptaciji i na spoljašnje stresore u bolničkoj sredini. Aktivaciju ABUW_1645 i reverziju fenotipa sa zamućenim kolonijama u fenotip sa transparentnim kolonijama stimulišu faktori kao što je ograničena dostupnost nutrijenata ili sobna temperatura, uslovi sa kakvima se bakterije uobičajeno susreću u spoljašnjoj sredini. Fenotip sa transparentnim kolonijama ispoljava pojačanu sposobnost formacije biofilma i ushodno regulisane segmente genoma povezane sa metaboličkim aktivnostima i preuzimanjem nutrijenata, što ukazuje da ovaj fenotip doprinosi adaptaciji *A. baumannii* na nutritivno siromašne uslove u životnoj sredini (Tipton *et al.*, 2015; Chin *et al.*, 2018; Allen *et al.*, 2020).



Slika 6. Istovremeno prisustvo fenotipa sa zamućenim kolonijama i fenotipa sa transparentnim kolonijama, na primeru *A. baumannii* Z1213 soja, kultivisanog na MHA.

H-NS je još jedan transkripcioni faktor, koji po principu negativne regulacije suprimira prekomernu ekspresiju faktora virulencije, kao što su pili tipa I i IV, Ata, QS, porini spoljašnje membrane i T6SS, kao i horizontalno stečenih, AT-bogatih genskih regiona, poput *AbaR* ostrvca rezistencije. Smatra se da je njegova uloga prevencija potencijalno štetnih efekata, koje, u određenim situacijama, navedeni faktori virulencije i stečeni genski elementi mogu ispoljiti na sopstvenu bakterijsku ćeliju (Eijkelkamp *et al.*, 2013). Uprkos tome, inaktivacija *hns* gena uzrokovala je stvaranje mutanata sa hipermotilnim i hiperadhezivnim fenotipom, kao i povećanom rezistencijom na kolistin i *in vivo* virulencijom (Eijkelkamp *et al.*, 2013; Deveson Lucas *et al.*, 2018).

Zanimljiva su i dva transkripciona faktora TetR tipa, kodirana od strane gena koji se nalaze u okviru velikog konjugativnog plazmida, koji istovremeno sadrži i genske kasete povezane sa rezistencijom na različite antibiotike. Ova dva transkripciona faktora suprimiraju aktivnost T6SS, tako da sticanjem plazmida, ćelije gube potencijal ubijanja kompetitivnih prokariotskih ćelija, ali istovremeno postaju multirezistentne (Weber *et al.*, 2013; 2015; Harding *et al.*, 2018). Smatra se da ovakva mešovita zajednica bakterijskih ubica i multirezistentnih ćelija u okviru polimikrobnog biofilma, obezbeđuje adaptaciju i preživljavanje celokupne populacije (Harding *et al.*, 2018). U regulatore TetR tipa spada i AdeN, koji negativno reguliše ekspresiju AdeIJK pumpe (Rosenfeld *et al.*, 2012; Leus *et al.*, 2018), a AdeL i MumR su regulatori LysR tipa, pri čemu AdeL reguliše AdeFGH pumpu (Coyne *et al.*, 2010a), a MumR indukuje ekspresiju sistema za importovanje mangana, kao i rezistenciju na oksidativni stres (Juttukonda *et al.*, 2016; Green *et al.*, 2020). Uz prethodno opisane Fur i Zur regulacione sisteme, koji učestvuju u akviziciji mikronutrijenata, to su najbolje okarakterisani transkripcioni faktori.

U manjoj meri ispitani regulacioni mehanizmi čiji se značaj poslednjih godina sve više uviđa su male regulatorne sRNK. Naime, RNAseq metodom analize transkriptoma, otkriveno je 78 sRNK u soju AB5075 (Weiss *et al.*, 2016), odnosno čak 110 sRNK u soju ATCC 17978 (Kroger *et al.*, 2018), bez identifikovanih funkcija. Međutim, poznato je da mnoge sRNK vrše posttranskripcionu regulaciju posredstvom proteina Hfq šaperona, a delecija ovog proteina kod *A. baumannii* rezultirala je pleiotrofnim fenotipovima, uključujući smanjen rast, preosetljivost na spoljašnje stresore, smanjenu produkciju OMV, pila, biofilma, smanjenu adhezivnost itd. Takođe je interesantno da se okarakterisani Hfq protein kod *Acinetobacter* spp. pokazao skoro dvostruko većim u odnosu na Hfq proteine drugih rodova Gammaproteobacteria (Kuo *et al.*, 2017).

Budući da *A. baumannii* ima sposobnost veoma brzog sticanja rezistencije na antimikrobne agense sa kojima dolazi u kontakt, modifikacijom genoma i prirodnom selekcijom rezistentnih sojeva, a da sada postoji veliki broj opisanih faktora virulencije koji mogu značajno uticati na

patogenezu infekcije, targetiranje virulencije se poslednjih godina sve više nameće kao potencijalno interesantan oblik alternativnog terapijskog pristupa (López-Rojas *et al.*, 2013). Istraživanja su usmerena ka pronalasku agenasa koji bi, primenjeni u subinhibitornim koncentracijama, inhibirali ekspresiju ključnih faktora virulencije, što bi pružilo mogućnost prevencije razvoja teške kliničke slike kod inficiranih pacijenata, a istovremeno, pošto ne bi uticali na rast bakterija, značajno bi usporili selekciju rezistentnih mutanata.

1.6. Terapija infekcija izazvanih *A. baumannii*

Usled veoma rasprostranjene rezistencije, terapija infekcija izazvanih vrstom *A. baumannii* se danas često svodi na upotrebu aminoglikozida, karbapenema, glicilciklina, ili polimiksina, kombinacija dva antibiotika i ređe nekih specifičnih antibiotika (Garnacho-Montero i Timsit, 2019; Bassetti *et al.*, 2021a).

Aminoglikozidi (amikacin, gentamicin i tobramicin) i dalje predstavljaju opciju za tretman MDR infekcija, uprkos izuzetno visoke stope rezistencije u mnogim geografskim oblastima, rizika od nefrotoksičnosti i često suboptimalnih koncentracija koje postižu u plućima nakon sistemske administracije (Bassetti *et al.*, 2021a). Ipak, u slučaju primene kod infekcija izazvanih osetljivim sojevima, uz postizanje efektivnih koncentracija, terapija može biti visoko efikasna. Zato se ispituje i mogućnost administracije u obliku aerosola kod VAP infekcije u cilju postizanja efektivnih koncentracija u plućima, međutim, za sada nema dovoljno dokaza o poboljšanoj efikasnosti, a moguće su i respiratorne komplikacije (Kalil, *et al.*, 2016; Rello *et al.*, 2017). Aminoglikozidi predstavljaju važnu opciju i u terapiji meningitisa, primenjeni u kombinaciji sa karbapenemima, ili u slučaju CRAB sa polimiksинима (Fishbain i Peleg, 2010).

Karbapenemi se smatraju zlatnim standardom za tretman infekcija izazvanih MDR sojevima *A. baumannii*, zbog odlične baktericidne aktivnosti, otpornosti na mnoge β -laktamaze i povoljnog bezbednosnog profila (Fishbain i Peleg, 2010). Najčešće se koriste imipenem-cilastatin, meropenem, ili doripenem, pri čemu sojevi nisu uvek jednako osetljivi na navedene lekove (Marti *et al.*, 2009; Garnacho-Montero i Timsit, 2019). Generalno, meropenem ima prednost kao terapijska opcija, jer se vezuje nižim afinitetom za određene oksacilinaze, stabilniji je, a u poređenju sa imipenem-cilastatinom, mnogo je manje zabeleženih slučajeva epileptičnih napada kod lečenih pacijenata (Garnacho-Montero i Timsit, 2019). Poslednjih godina su, međutim, sve češće zastupljeni CRAB sojevi, koji su po pravilu rezistentni i na većinu ostalih terapijskih opcija, izuzev polimiksina i tige ciklina (i nekih novih antibiotika), i klasifikuju se kao XDR – sojevi osetljivi samo na dve klase antibiotika (Isler *et al.*, 2019).

Sulbaktam, koji se uobičajeno koristi kao inhibitor β -laktamaza u kombinaciji sa ampicilinom, neočekivano pokazuje intrinzičku aktivnost protiv mnogih izolata *A. baumannii*, vezivanjem za PBP3 i inhibicijom sinteze peptidoglikana (Penwell *et al.*, 2015b). Ovaj β -laktamski molekul, koji prolazi spoljašnju membranu kroz OmpA kanale (Iyer *et al.*, 2017), pokazao je odličnu efikasnost u kliničkim studijama, i značajno manju stopu mortaliteta prilikom tretmana CRAB infekcija u odnosu na polimiksine ili tige ciklin (Oliveira *et al.*, 2008; Jaruratanasirikul *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2017). Takođe, Kengkla i saradnici (2018) su u meta-analizi kliničkih studija primene kombinovane terapije, zaključili da je kombinacija kolistina i sulbaktama bolja opcija od kombinacije kolistin/tige ciklin, kao i od monoterapije kolistinom. Nažalost, sve se češće susreće rezistencija i na ovaj antibiotik (Garnacho-Montero *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2018).

Još jedna opcija za terapiju CRAB je **minociklin**, koji za razliku od ostalih tetraciklina nije supstrat za rasprostranjenu TetA efluksnu pumpu, i u terapiji osetljivih izolata pokazuje dobru efikasnost i dobar bezbednosni profil (Peleg *et al.*, 2008; Bishburg i Bishburg, 2009; Greig i Scott, 2016). U određenim geografskim oblastima, kao što su npr. SAD, gde prisustvo *tet(B)* i *tet(M)* gena nije toliko zastupljeno, minociklin je efikasan protiv visokog procenta kliničkih izolata (Lashinsky

et al., 2017). Takođe, u nedavnoj meta-analizi 10 opservacionih kliničkih studija pokazano je da je sirova stopa smrtnosti pacijenata lečenih minociklinom, ili kombinacijom minociklina sa drugim antibioticima bila oko 21%, što dodatno ide u prilog visokoj efikasnosti (Fragkou *et al.*, 2019). Ipak, poželjno bi bilo sprovođenje randomizovanih kontrolisanih studija za dobijanje pouzdanijih podataka. Dodatne prednosti minociklina su niska cena i to što je jedini antibiotik koji se može primeniti peroralno kod CRAB infekcija, a to može biti izuzetno poželjno u slučaju potrebe za dugotrajnom terapijom (Isler *et al.*, 2018).

Tigeciklin je derivat minociklina i prvi antibiotik iz klase glicilciklina, odobren 2005. godine za kliničku upotrebu od strane FDA (Rose i Rybak, 2006). Ispoljava identičan mehanizam dejstva kao i tetraciklini, vezivanjem za 30S subjedinicu ribozoma i blokiranjem sinteze proteina, međutim prednost tigeciklina jeste što nije supstrat za Tet(A-E) i Tet(K) efluksne pumpe, a na njega ne utiče ni *tet(O)*- i *tet(M)*-posredovana zaštita ribozoma (Rose i Rybak, 2006; Fishbain i Peleg, 2010), tako da je veliki procenat kliničkih izolata *A. baumannii* osetljiv na ovaj antibiotik. Tigeciklin je visoko efikasan kada se koristi kod komplikovanih intra-abdominalnih infekcija, ali efikasnost i bezbednosni profil prilikom upotrebe kod češćih kliničkih oblika infekcija izazvanih *A. baumannii*, kao što je VAP, su vrlo upitni. Meta-analize kliničkih studija pokazale su generalno slabu efikasnost i inferiornost u odnosu na polimiksine (Ni *et al.*, 2016; Kengkla *et al.*, 2018). Zabrinjavajući su i podaci o povećanim stopama smrtnosti kod pacijenata sa VAP lečenih tigeciklinom, na osnovu kombinacije rezultata randomizovanih kontrolisanih studija (Bassetti *et al.*, 2021a). Osim toga, tigeciklin ima nepovoljan farmakokinetički profil, zbog čega ne može postići efektivne koncentracije u serumu primenom standardnog režima doziranja, tako da se ne može koristiti za tretman bakterijemije (Meagher *et al.*, 2005). Ipak, u praksi je tigeciklin često jedini aktivni agens u terapiji VAP, i često kliničari pribegavaju primeni većih terapijskih doza nego što su preporučene, tako da je i to mogući razlog većih stopa smrtnosti (Bassetti *et al.*, 2021a)

Poslednju liniju odbrane, i sve češće jedinu efikasnu opciju u tretmanu infekcija izazvanih XDR Gram-negativnim bakterijama, naročito *A. baumannii* i *P. aeruginosa*, predstavljaju **polimiksini**. Ovi katjonski polipeptidni antibiotici ispoljavaju efikasno baktericidno dejstvo protiv Gram-negativnih bakterija, ometanjem unakrsnog povezivanja molekula LPS/LOS, i posledičnim oštećenjem strukturnog integriteta spoljašnje membrane ćelijskog zida, i jedina su grupa antibiotika, uz glicilcikline, na koju je većina sojeva *A. baumannii* osetljivo (Landman *et al.*, 2008; Mustapha *et al.*, 2018). Veliki nedostatak ovih lekova predstavljaju ozbiljna neželjena dejstva, pre svega nefrotoksičnost i neurotoksičnost, kao i uzak terapijski raspon koji otežava doziranje posebno kod osoba sa postojećim oštećenjima funkcije bubrega, zbog čega su tokom 80-ih godina prošlog veka bili povučeni sa tržišta (Nation *et al.*, 2014; Poirel *et al.*, 2017). Usled rasprostranjene pojave sojeva Gram-negativnih bakterija rezistentnih na cefalosporine, aminoglikozide i karbapeneme, kao i zbog nedostatka novih antibiotika na tržištu, polimiksin E (kolistin) i polimiksin B su krajem 20. veka vraćeni u upotrebu u obliku poslednje opcije za tretman rezistentnih Gram-negativnih infekcija (Potron *et al.*, 2015). Najčešće se primenjuje kolistin, intravenski u obliku pro-leka kolistimetatnatrijuma (skr. CMS) i često predstavlja lek izbora u tretmanu CRAB infekcija (Garnacho-Montero i Timsit, 2019). Pravilno doziranje, uz održavanje koncentracije kolistina u plazmi na oko 2 mg/L, povezano je sa relativno niskim rizikom od nefrotoksičnosti (Horcajada *et al.*, 2016), i visokim kliničkim benefitom kako je potvrđeno na osnovu meta-analize 32 kliničke studije (Vardakas *et al.*, 2018). Testiranje antimikrobne osetljivosti na kolistin predstavlja dodatni problem, pošto se rezistencija na kolistin često ne može detektovati pomoću rutinskih automatizovanih metoda, što uz mogućnost pojave heterorezistencije u toku same terapije, može rezultirati neuspešnim izlečenjem infekcije (Srinivas *et al.*, 2018; Piperaki *et al.*, 2019). U praksi je često suboptimalno doziranje zbog individualnih razlika između pacijenata i različitog bubrežnog klirensa, što može biti i razlog loših rezultata nedavne randomizovane kontrolisane studije, gde su stope smrtnosti kod pacijenata lečenih kolistinom ili kombinacijom kolistin/meropenem bile 46-52% (Paul *et al.*, 2018). Štaviše, primena suboptimalnih koncentracija polimiksina nepovoljno utiče na stopu preživljavanja (Bassetti *et al.*,

2021a). Ipak, postoji nada da će nakon objavljivanja internacionalnih uputstava za optimalno doziranje polimiksina (Tsuji *et al.*, 2019), to u određenoj meri biti prevaziđeno i efikasnost poboljšana.

Nedavno je novi antibiotik **cefiderokol** odobren od strane FDA i EMA za tretman infekcija izazvanih Gram-negativnim bakterijama, protiv kojih nema efikasnih terapijskih alternativa (Giacobbe *et al.*, 2020; Bassetti *et al.*, 2021a). Radi se o antibiotiku koji predstavlja konjugat cefalosporina i siderofore katehol tipa, i funkcioniše po inovativnom „principu Trojanskog konja“ (Simner i Patel, 2020). Nakon vezivanja Fe^{3+} u ekstracelularnoj sredini pomoću siderofore, cefiderokol koristi aktivne transportne sisteme za importovanje gvožđa, kako bi prošao kroz visoko nepropustljivu spoljašnju membranu Gram-negativnih bakterija. Kada se nađe u periplazmatskom prostoru, gvožđe disocira sa kompleksa, a aktivna komponenta cefalosporin može ispoljiti antimikrobno dejstvo vezivanjem za PBP (prvenstveno PBP3) i inhibicijom sinteze peptidoglikana. Na ovaj način cefiderokol izbegava sporu pasivnu difuziju kroz porine i posredstvom visoko aktivnih transportnih sistema u sredini gde je dostupnost gvožđa ograničena, kakav je između ostalog ljudski organizam, postiže visoke koncentracije na ciljnom mestu dejstva. Pored toga, stabilan je na dejstvo većine β -laktamaza, uključujući OXA i MBL tipove, a otporan je i na mehanizam rezistencije posredovan mutacijom porina (Zhanel *et al.*, 2019). Cefiderokol je ispoljio potentnu *in vitro* aktivnost protiv CRAB izolata, uz minimalne inhibitorne koncentracije ispod 4 μ g/mL kod 96,9% od 768 testiranih izolata (Kazmierczak *et al.*, 2019). Takođe, u dve dvostruko slepe, kontrolisane, randomizovane kliničke studije pokazao je bolju, ili uporedivu aktivnost sa karbapenemima u terapiji različitih infekcija izazvanih Gram-negativnim patogenima, uključujući *Acinetobacter* spp. (Portsmouth *et al.*, 2018; Wunderink *et al.*, 2019). Određen razlog za brigu predstavlja rezultat randomizovane kliničke studije treće faze, gde je klinička i mikrobiološka efikasnost cefiderokola u lečenju Gram-negativnih infekcija poređena sa najboljom dostupnom terapijom, koja se sastojala bilo od monoterapije, ili od kombinacije do najviše tri antibiotika. Cefiderokol je pokazao sveukupno sličnu efikasnost kao i najbolja dostupna terapija, ali u grupi pacijenata inficiranih sa *Acinetobacter* spp., a tretiranih cefiderokolom, 49. dana od početka tretmana uočena je stopa smrtnosti od čak 50%, u poređenju sa 18% kod kontrolne grupe (pacijenti inficirani sa *Acinetobacter* spp., tretirani sa najboljom dostupnom terapijom) (Bassetti *et al.*, 2021b). Rezultati najnovije randomizovane, dvostruko slepe kliničke studije treće faze, gde su efikasnost i neželjena dejstva cefiderokola primenjenog u terapiji Gram-negativne nozokomijalne pneumonije upoređeni sa visokom dozom meropenema primenjenog u obliku produžene infuzije, pokazali su da cefiderokol nije inferiorna opcija, na osnovu čega je donet zaključak da se može koristiti u terapiji nozokomijalne pneumonije izazvane Gram-negativnim bakterijama, uključujući *A. baumannii* (Wunderink *et al.*, 2021). Uprkos tome što je tek nedavno registrovan kao lek, pojava rezistencije na cefiderokol kod *A. baumannii* je već uočena, prvenstveno kao posledica mutacije *pirA* gena koji kodira receptor za sideroforu, tako da će ubuduće biti neophodno voditi računa da se cefiderokol primenjuje isključivo u situacijama kada nema efikasne alternative (Malik *et al.*, 2020).

Eravaciklin je novi sintetički fluorociklin, odobren nedavno od strane FDA i EMA (Bassetti *et al.*, 2019). Strukturno je sličan tigeceklinu, otporan je na klasične mehanizme rezistencije na tetracikline, kao što su ribozomalna protekcija i hiperekspresija efluksnih pumpi, i ima potentnu *in vitro* aktivnost protiv rezistentnih sojeva *A. baumannii* (Sutcliff *et al.*, 2013; Seifert *et al.*, 2018). Rezultati četiri odvojene randomizovane kliničke studije treće faze doveli su do toga da eravaciklin bude registrovan samo za tretman komplikovanih intra-abdominalnih infekcija (Solomkin *et al.*, 2019). Postoji potreba za kliničkim studijama radi dodatne evaluacije efikasnosti eravaciklina u lečenju češćih, teških infekcija izazvanih *A. baumannii*, s obzirom na dobar bezbednosni profil i mogućnost primene u obliku peroralne formulacije (Alosaimy *et al.*, 2020). Kliničari će često pribegavati upotrebi ovog registrovanog antibiotika i kod neodobrenih indikacija, kada ostanu bez drugih opcija, tako da bi bilo poželjno ispitati da li potencijalno postoji rizik od povećanog

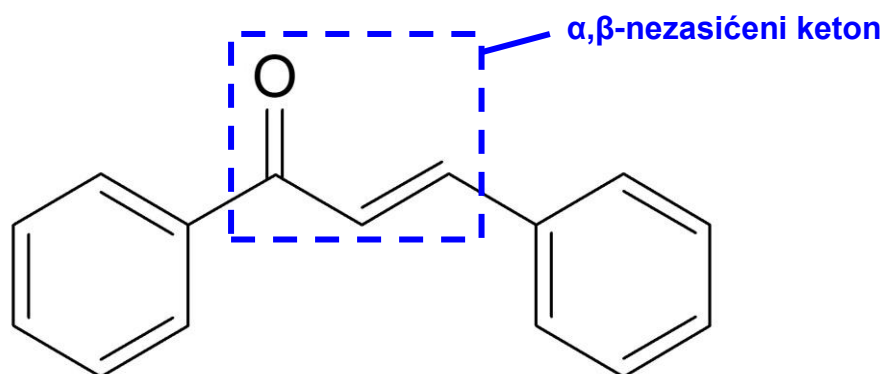
mortaliteta, kao što je to pokazano prilikom primene tigeciklina u terapiji infekcija izazvanih vrstom *A. baumannii* (Bassetti *et al.*, 2021a).

Kao potencijalni alternativni terapijski izbor u skorijoj budućnosti bi mogao biti i plazomicin, derivat aminoglikozida sisomicina, koji je odobren od strane FDA za terapiju komplikovanih infekcija urinarnog trakta, izazvanih određenim članovima porodice Enterobacteriaceae, a koji je pokazao *in vitro* aktivnost protiv rezistentnih izolata *A. baumannii* (Bassetti *et al.*, 2021a). Kombinacija durlobaktam/sulbaktam je takođe potencijalno nova opcija, koja još nije registrovana, ali su kliničke studije treće faze, u okviru kojih se ispituje efikasnost i bezbednost protiv teških infekcija *A. baumannii*, u toku. Durlobaktam je novi diazabiciklooktenonski inhibitor β -laktamaza, koji deluje na mnoge serin β -laktamaze (klase A, C i D), uključujući OXA-23, OXA-51 i OXA-58, a primenjuje se sa sulbaktamom koji ispoljava intrinzičku β -laktamasku aktivnost, vezivanjem za PBP3 (Penwell *et al.*, 2015b; Bassetti *et al.*, 2021a).

Neretko se u tretmanu rezistentnih *A. baumannii* infekcija primenjuje i kombinovana terapija, opravdana rezultatima *in vivo* eksperimentalnih modela, nedostatkom validnih terapijskih opcija, i u cilju usporavanja širenja rezistencije. Ipak, na osnovu postojećih kliničkih studija, i dalje nema čvrstih dokaza koji bi opravdali primenu ovakvog vida terapije umesto monoterapije (Garnacho-Montero i Timsit, 2019). Nekoliko kombinacija je pokazalo značajno veću stopu mikrobiološke eradikacije, npr. kolistin/sulbaktam, kolistin/fosfomicin i kolistin/rifampicin, ali bez uticaja na stopu mortaliteta ili dužinu hospitalizacije (Sirijatuphat i Thamlikitkul, 2014; Mohammadi *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2017). Osim toga, sinergističke interakcije su pokazane i u slučaju kombinacija kolistin/meropenem i kolistin/vankomicin, međutim bez poboljšanja kliničkih ishoda u poređenju sa monoterapijom (Garnacho-Montero *et al.*, 2013; Paul *et al.*, 2018). Kombinacije kolistin/tigeciklin i meropenem/tigeciklin, iako obuhvaćene u mnogim istraživanjima, takođe nisu izazvale pozitivan terapijski učinak (Garnacho-Montero i Timsit, 2019).

1.7. Halkoni

Halkoni su rasprostranjena prirodna jedinjenja, kojima je zajedničko prisustvo hemijske strukture 1,3-diaril-2-propen-1-ona (halkonoid) (Slika 7). Predstavljaju intermedijere u biosintezi flavonoida ili izoflavonoida mnogih biljaka, ili se kao krajnji proizvodi sekundarnog metabolizma mogu pronaći u plodovima i drugim delovima određenih biljnih vrsta (Rozmer i Perjési, 2016). Mogu da egzistiraju u obliku *trans* i *cis* izomera, pri čemu je *trans* konfiguracija predominantna, pošto je termodinamički mnogo stabilnija. Pored toga što se mogu izolovati iz određenih biljaka, halkoni se mogu dobiti i polusintetskim putem ili totalnom sintezom, za šta se u većini slučajeva koristi *Claisen-Schmidt* kondenzacija pomoću baznih ili kiselih katalizatora (Zhuang *et al.*, 2017). Halkoni se mogu grubo klasifikovati na jednostavne i hibridne halkone, kojima je zajedničko prisustvo jedne halkonoidne grupe. U širem smislu, postoje bis-halkoni koji sadrže dva halkonoida, dihidrohalkoni sa redukovanom α,β -nezasićenom vezom, ili fuzirani oblici, odnosno derivati klasičnih halkona koji su zadržali α,β -nezasićenu ketonsku grupu (Zhuang *et al.*, 2017).



Slika 7. 1,3-diaril-2-propen-1-on – osnovna strukturna jedinica halkona.

Širok spektar različitih bioloških i farmakoloških aktivnosti je opisan kod ove grupe jedinjenja. Između ostalog, različiti derivati halkona ispoljili su antioksidativne, antiinflamatorne i antikancerske, citotoksične i hemopreventivne aktivnosti, antihiperglikemijsko i hipolipidemijsko dejstvo, kardioprotektivnu, hepatoprotektivnu, osteoprotektivnu i neuroprotektivnu aktivnost, antinociceptivnu, antihipertenzivnu, antiulkusnu aktivnost, kao i antimikrobnu aktivnost (Dimmock *et al.*, 1999; Ni *et al.*, 2004; Batovska i Todorova, 2010; Singh *et al.*, 2014; Mahapatra *et al.*, 2015; Rani *et al.*, 2019). Antimikrobna aktivnost halkona zabeležena je protiv svih tipova bakterija, kao i protiv virusa, gljiva i parazita (Nowakowska, 2007; Sarbu *et al.*, 2019; Dan i Dai, 2020). Smatra se da je za aktivnost odgovorna α,β -nezasićena ketonska funkcionalna grupa, posredstvom koje halkoni formiraju kovalentne veze sa sulfhidrilnim grupama različitih enzima, receptora i ostalih proteina, kao i relativno mala veličina ovih molekula, koja im omogućava pristup do različitih intracelularnih struktura (Batovska i Todorova, 2010; Zhou i Xing, 2015; Zhuang *et al.*, 2017). Pri tome, pronalazak odgovarajućih kombinacija supstituenata, može omogućiti halkonima ispoljavanje visoko selektivnih aktivnosti (Batovska i Todorova, 2010; Matos *et al.*, 2015). Na molekularnom nivou, primećeno je nekoliko potencijalnih mehanizama antibakterijskog dejstva. Zavisno od strukture i bakterijske vrste, halkoni su pokazali aktivnost na nivou:

- Membranskog transportnog lanca elektrona, inhibicijom NADH-citohrom *c* reduktaze (Haraguchi *et al.*, 1998), ili inhibicijom proton pokretačke sile, koja je pored toga važna i u mnogim drugim bakterijskim procesima (Zhang *et al.*, 2018);
- Glikolize i Krebsovog ciklusa, inhibicijom enzima laktat dehidrogenaze i izocitrat dehidrogenaze, što posledično smanjuje sposobnost utilizacije bioloških nutrijenata, kao i otpornost na oksidativni stres (Barreca *et al.*, 2014);
- Replikacije DNK, inhibicijom DNK žiraze (Abdullah *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2018) ili DNK topoizomeraze IV (Feng *et al.*, 2014), ili direktno interkalacijom i formacijom kompleksa sa DNK (Yin *et al.*, 2014).
- Ćelijske deobe, inhibicijom FtsZ, specifičnog prokariotskog citoskeletnog proteina, homologa tubulina (Li *et al.*, 2015);
- Citoplazmatske membrane, modifikacijom permeabilnosti (Sato *et al.*, 1997; Morão *et al.*, 2020).

Pored toga što mogu delovati baktericidno i inhibirati rast bakterija, u nekim slučajevima visoko efikasno sa MIK vrednostima manjim od 1 $\mu\text{g/mL}$ (Mbaveng *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2012a; Feng *et al.*, 2014; Chu *et al.*, 2018), pojedini derivati halkona su se pokazali uspešnim i u inhibiciji faktora virulencije, primenjeni u subinhibitornim koncentracijama. Faktori koji direktno utiču na virulentnost bakterija, a na koje mogu uticati halkoni spadaju: formacija biofilma; produkcija glikokaliksa; adhezivnost (Bozic *et al.*, 2014; Kunthalert *et al.*, 2014); QS aktivnost (Martin-Rodriguez *et al.*, 2015); produkcija toksina kao što su α -toksin i α -hemolizin kod *S. aureus* (Zhou *et al.*, 2012) ili tirozin fosfataze A i B kod *Mycobacterium tuberculosis* (Chiaradia *et al.*,

2012); ekspresija efluksnih pumpi (Omosa *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2019); i aktivnost SaeRS TCS koji reguliše ekspresiju nekoliko faktora virulencije kod *S. aureus* (Mizar *et al.*, 2018). Takođe, zabeležena je i aktivnost protiv MCR-1, plazmidom kodirane P_{ETn} transferaze, koja pruža određenim patogenima rezistenciju na kolistin (Ayman *et al.*, 2019).

Ove aktivnosti sugerišu da bi određeni derivati halkona mogli ispoljiti potentnu inhibiciju nekih od ključnih faktora virulencije kod *A. baumannii*. U prilog ovoj hipotezi idu i rezultati antivirulentnih aktivnosti pojedinih srodnih flavonoida, koji su pokazali inhibitornu aktivnost pre svega na produkciju biofilma i QS aktivnost kod *A. baumannii* (Bhargava *et al.*, 2015; Raorane *et al.*, 2019).

Antivirulentna aktivnost halkonskih jedinjenja protiv *A. baumannii* do današnjih dana nije proučavana, te je stoga kao predmet istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, izabrana upravo ova naučna problematika.

2. CILJ RADA

Eksperimentalni rad ove disertacije osmišljen je u odnosu na prethodno jasno definisane ciljeve u vidu jednog glavnog cilja i nekoliko specifičnih ciljeva.

Glavni cilj istraživanja bio je da se kroz evaluaciju uticaja na rast, produkciju biofilma i ekspresiju specifičnih faktora virulencije multirezistentnih sojeva *A. baumannii* identifikuje najaktivniji sintetički derivat halkona.

Specifični ciljevi istraživanja predstavljali su konačne ishode specifičnih celina, koji su uticali na metodološki dizajn sledstvenih celina i rukovodili daljim tokom eksperimentalnog rada. Navedeni specifični ciljevi su primenjeni:

- Određivanje profila rezistencije sakupljenih bolničkih sojeva *A. baumannii* i genetička analiza najrezistentnijih izolata.
- Procena nivoa produkcije biofilma *A. baumannii* pod različitim uslovima kultivacije.
- Sinteza i karakterizacija derivata halkona.
- Određivanje antimikrobne aktivnosti sintetisanih halkona, samih i u kombinaciji sa antibioticima, protiv *A. baumannii*.
- Evaluacija inhibitorynog uticaja halkona na produkciju monomikrobnog i polimikrobnog biofilma i ekspresiju faktora virulencije sojeva *A. baumannii*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Izolacija kliničkih sojeva *Acinetobacter* spp.

Klinički sojevi *Acinetobacter* spp., obuhvaćeni u okviru ove doktorske disertacije, izolovani su u periodu od oktobra 2017. do aprila 2018. godine, u različitim mikrobiološkim laboratorijama u okviru zdravstvenih ustanova na teritoriji Beograda: KBC Zvezdara, KBC Dragiša Mišović, Beolab laboratorije, Ginekološko-akušerska klinika Kliničkog centra Srbije i Urgentni centar Kliničkog centra Srbije. Za svaki soj prikupljeni su podaci vezani za pol i starost pacijenta, poreklo izolata, kao i tehnike pomoću kojih je izvršena njegova identifikacija i ispitivanje osetljivosti na antibiotike. Sojevi su bezbedno dopremljeni do mikrobiološke laboratorije Katedre za mikrobiologiju i imunologiju, Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, gde su, nakon potvrde identifikacije na nivou vrste (*A. baumannii*), umnoženi kultivacijom u BHI (eng. *Brain-Heart-Infusion*; HiMedia, Indija) bujonu suplementiranim sa 20% glicerola i zamrznuti na -80 °C. Pored toga, u eksperimentima je kao pozitivna kontrola korišćen i standardni soj *A. baumannii* ATCC 19606 (KWIK-STIK™, Microbiologics Inc., SAD).

3.2. Identifikacija *A. baumannii*

Klinički izolati identifikovani su u mikrobiološkim laboratorijama zdravstvenih ustanova kao članovi *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Acb) kompleksa primenom standardnih metoda: analiza bakterijskih kultura i mikroskopskih karakteristika (preparata obojenih po Gramu), i analiza biohemijskih osobina primenom automatizovanog VITEK 2 sistema sa GN ID karticom (bioMérieux, Francuska). Radi potvrde identifikacije na nivou vrste (*A. baumannii*) sprovedena su dva diferencijalna testa: rast na 44 °C (pozitivan u slučaju *A. baumannii* i *A. nosocomialis*) (Bouvet i Grimont, 1987) i infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (skr. FTIR) (Procop *et al.*, 2017). Poređenjem FTIR spektara sa spektrom standardnog soja *A. baumannii* ATCC 19606, utvrđeno je ukupno 43 izolata vrste *A. baumannii* (Tabela 1), koji su sledstveno korišćeni u daljem eksperimentalnom radu.

Tabela 1. Poreklo kliničkih izolata *A. baumannii* i demografski podaci o pacijentima.

Soj	Godina izolacije	Poreklo ^a	Biološki uzorak	Pol	Starost (godine)
Z6142	2017	KBC Zvezdara	Aspirat bronha	Muški	86
Z6228	2017	KBC Zvezdara	Bris rane	Muški	64
Z6235	2017	KBC Zvezdara	Bris rane	Muški	59
Z6419	2017	KBC Zvezdara	Aspirat bronha	Muški	84
Z6420	2017	KBC Zvezdara	Aspirat bronha	Muški	76
Z6853	2017	KBC Zvezdara	Aspirat bronha	Ženski	76
Z6879	2017	KBC Zvezdara	Bris rane	Ženski	62
Z7085	2017	KBC Zvezdara	Aspirat bronha	Ženski	76
Z94	2017	KBC Zvezdara	Bris rane	Ženski	69

B101	2018	Beo-lab	Bris rane	Ženski	30
B102	2018	Beo-lab	Bris rane	Muški	59
B103	2018	Beo-lab	Bris rane	Ženski	80
D345	2018	KBC Dragiša Mišović	Sputum	Ženski	67
D371	2018	KBC Dragiša Mišović	Aspiracioni kateter	Ženski	69
D441	2018	KBC Dragiša Mišović	Aspiracioni kateter	Ženski	65
G1108	2018	GAK – KCS	Bris rane	Ženski	24
G1812	2018	GAK – KCS	Bris cerviksa	Ženski	31
D423	2018	KBC Dragiša Mišović	Hemokultura	Muški	82
D650	2018	KBC Dragiša Mišović	Aspiracioni kateter	Muški	80
D613	2018	KBC Dragiša Mišović	Aspiracioni kateter	Ženski	90
D710	2018	KBC Dragiša Mišović	Bris rane	Ženski	75
D755	2018	KBC Dragiša Mišović	Bris rane	Muški	74
D749	2018	KBC Dragiša Mišović	Bris rane	Ženski	68
D811	2018	KBC Dragiša Mišović	Vrh CVK	Muški	74
D809	2018	KBC Dragiša Mišović	Bris traheje	Muški	80
D812	2018	KBC Dragiša Mišović	Aspiracioni kateter	Muški	71
D863	2018	KBC Dragiša Mišović	Biopsija tkiva	Ženski	75
D746	2018	KBC Dragiša Mišović	Aspiracioni kateter	Ženski	64
D1010	2018	KBC Dragiša Mišović	Aspiracioni kateter	Ženski	90
D1002	2018	KBC Dragiša Mišović	Urinokultura	Muški	82
D989	2018	KBC Dragiša Mišović	Aspiracioni kateter	Ženski	63
D1107	2018	KBC Dragiša Mišović	Urinokultura	Muški	43
D988	2018	KBC Dragiša Mišović	Urinokultura	Ženski	78
D1013	2018	KBC Dragiša Mišović	Aspiracioni kateter	Ženski	85
Z838	2018	KBC Zvezdara	Hemokultura	Ženski	47
Z1213	2018	KBC Zvezdara	Bris rane	Muški	53
Z766	2018	KBC Zvezdara	Bris rane	Ženski	71

Z881	2018	KBC Zvezdara	Bris rane	Ženski	55
K111	2018	UC – KCS	Hemokultura	Muški	67
K112	2018	UC – KCS	Hemokultura	Muški	23
K116	2018	UC – KCS	Hemokultura	Ženski	88
K118	2018	UC – KCS	Hemokultura	Muški	59
K119	2018	UC – KCS	Hemokultura	Ženski	48

^aKBC – kliničko bolnički centar; GAK – ginekološko akušerska klinika; KCS – Klinički centar Srbije; UC – urgentni centar; CVK – centralni venski kateter.

3.3. Ispitivanje osetljivosti na antibiotike

Osetljivost kliničkih izolata *A. baumannii* na antibiotike ispitana je primenom kombinacije VITEK 2 automatizovanog sistema, agar-difuzione metode i bujon-mikrodilucione metode. Na osnovu dobijenih rezultata, za svaki izolat određen je tip rezistencije (Magiorakos *et al.*, 2012):

- UDR (eng. *Usual Drug Resistance*) – standardni profil rezistencije;
- MDR – multirezistencija. Neosetljivost na barem jedan agens iz tri ili više klasa antibiotika;
- XDR – ekstenzivna rezistencija. Osetljivost na samo jednu ili dve klase antibiotika;
- PDR – panrezistencija. Neosetljivost na sve klase antibiotika.

3.3.1. Ispitivanje osetljivosti na antimikrobne agense primenom VITEK 2 automatizovanog sistema

Primenom VITEK 2 automatizovanog sistema ispitana je osetljivost kliničkih izolata *A. baumannii* na nekoliko standardnih antibiotika inkorporiranih u okviru komercijalnih VITEK 2 kartica: AST-N240 (Tabela 2) i AST-GN76 (Tabela 3). Bakterijske suspenzije, gustine od približno $1,5 \times 10^7$ jedinica koje formiraju kolonije po mililitru (eng. *Colony Forming Units per milliliter*, skr. CFU/mL), su pripremljene u 0,45% rastvoru NaCl i nanese na VITEK 2 kartice. Kartice su zatim ubačene u VITEK 2 uređaj i nakon 3 h inkubacije očitani su rezultati. Uređaj detektuje rast bakterija u obliku fluorescencije koja se oslobađa bakterijski posredovanom razgradnjom specifičnih supstrata.

Tabela 2. Antibiotici VITEK 2 AST-N240 kartice na koje je testirana osetljivost kliničkih izolata *A. baumannii*.

Klasa	Antibiotik	Limit detekcije MIC (µg/mL)
Penicilini	Piperacilin	4-128
	Piperacilin/tazobaktam	4-128
	Tikarcilin	8-128
Cefalosporini	Ceftazidim	1-64
	Cefepim	1-64
Karbapenemi	Imipenem	0,25-16

	Meropenem	0,25-16
	Amikacin	2-64
Aminoglikozidi	Gentamicin	1-16
	Tobramicin	1-16
Fluorohinoloni	Ciprofloksacin	0,25-4
	Levofloksacin	0,12-8
Ansamicini	Rifampicin	2-32
Antifolati/sulfonamidi	Trimetoprim/sulfametoksazol	20-320
Polimiksini	Kolistin	0,5-16

Tabela 3. Antibiotici VITEK 2 AST-GN76 kartice na koje je testirana osetljivost kliničkih izolata *A. baumannii*.

Klasa	Antibiotik	Limit detekcije MIC ($\mu\text{g/mL}$)
Penicilini	Ampicilin	2-32
	Piperacilin/tazobaktam	4-128
Cefalosporini	Cefepim	1-64
Karbapenemi	Imipenem	0,25-16
Aminoglikozidi	Amikacin	2-64
	Gentamicin	1-16
Glicilciklini	Tigeciklin	0,5-8
Fluorohinoloni	Ciprofloksacin	0,25-4
	Levofloksacin	0,12-8
Antifolati/sulfonamidi	Trimetoprim/sulfametoksazol	20-320

3.3.2. Agar-difuziona metoda

Agar-difuziona metoda je primenjena u skladu sa preporukama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (eng. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, skr. CLSI) (CLSI, 2017). Ovom metodom je ispitana osetljivost kliničkih izolata *A. baumannii* na ampicilin, ampicilin/sulbaktam, amoksicilin, amoksicilin/klavulanska kiselina, piperacilin, piperacilin/tazobaktam, cefuroskim, ceftriakson, ceftazidim, cefotaksim, cefepim, imipenem, meropenem, ertapenem, aztreonam, amikacin, gentamicin, netilmicin, tobramicin, hloramfenikol, tetraciklin, minociklin, tigeciklin, ciprofloksacin, levofloksacin, moksifloksacin, ofloksacin,

trimetoprim/sulfametoksazol i kolistin. Sojevi, veličine inokuluma od oko $1,5 \times 10^8$ CFU/mL, su gusto zasejani na ploče sa Müller-Hinton agarom (skr. MHA; HiMedia, Indija) unakrsno u dve dimenzije pomoću sterilne eze, a nakon 20 min dodati su diskovi sa odgovarajućim količinama određenih antibiotika. Nakon 16-18 h inkubacije na 35 °C, izmereni su prečnici zona kompletne inhibicije rasta bakterija oko antibiotika (uključujući prečnik diska).

3.3.3. Bujon-mikrodilucionna metoda

Bujon-mikrodilucionom metodom je prema uputstvima CLSI (2015) izvršeno ispitivanje osetljivosti kliničkih izolata *A. baumannii* na:

- Amikacin, u rasponu koncentracija 2-4096 µg/mL;
- Ciprofloksacin, u rasponu koncentracija 1-512 µg/mL;
- Meropenem, u rasponu koncentracija 0,5-1024 µg/mL;
- Kolistin, u rasponu koncentracija 0,125-512 µg/mL.

Sveže kulture su prethodno pripremljene inkubacijom sojeva na tripton soja agaru (skr. TSA; Torlak, Srbija) tokom 18-24 h na 37 °C. Pojedinačne kolonije sa čistih kultura su zatim suspendovane u fiziološkom rastvoru do gustine od oko $1,5 \times 10^8$ CFU/mL izmerene pomoću DEN-1 McFarland denzitometra (Biosan, Letonija). Nakon toga su bakterijske suspenzije razblažene do reda veličine od oko 10^6 CFU/mL, pomoću Müller-Hinton bujona (skr. MHB; HiMedia, Indija) i nanesene na polistirenske mikrotitarske ploče sa 96 mesta (Sarstedt AG & Co. KG, Nemačka) u zapremini od 100 µL. U istoj zapremini, u duplikatu, su dodata dvostruka razblaženja antibiotika u MHB. Mikrotitarske ploče su inkubirane tokom 18-24 h na 37 °C, a rezultati su interpretirani određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija (eng. *Minimum Inhibitory Concentration*, skr. MIC), tj. najmanjih koncentracija antibiotika u prisustvu kojih nema vidljivog rasta bakterija. Kao indikator rasta primenjen je rastvor 2,3,5-trifenil tetrazolijum hlorida (skr. TTC; Sigma-Aldrich Inc., SAD) u koncentraciji 0,01%, koji se pod dejstvom bakterijskih dehidrogenaza redukuje do crveno obojenog 1,3,5-trifenil formazana. U slučaju prisustva dovoljnog broja metabolički aktivnih bakterijskih ćelija, koncentracija nastalog formazana dostiže određeni prag, tako da se suspenzija u bunariću mikrotitarske ploče oboji u crveno, što se tumači kao vidljiv rast bakterija.

3.4. Genetička karakterizacija kolistin-rezistentnih sojeva *A. baumannii*

3.4.1. Gel elektroforeza u pulsirajućem polju

Genotipizacija kolistin-rezistentnih izolata *A. baumannii*, sprovedena je primenom gel elektroforeze u pulsirajućem polju (eng. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, skr. PFGE) (Kojic *et al.*, 2005). Logaritamske kulture bakterija u Luria-Bertani (skr. LB; 0,5% natrijum hlorid, 1% tripton i 0,5% ekstrakt kvasca) bujonu su centrifugirane tokom 2 min na 15871 x g obrtaja (Eppendorf 5424, Nemačka), supernatant je odbačen, talog ispran pomoću EDTA-EGTA-Tris-HCl (skr. EET, pH 8) pufera i procedura je ponovljena tri puta. Preostali ćelijski pelet je resuspendovan u 50 µL EET pufera, zagrejan na 42 °C i pomešan sa 50 µL otopljene 2% agaroze (SeaPlaque GTG agarose, FMC BioProducts, SAD). Nakon kratkotrajnog mešanja, mikstura je prenetu u odgovarajuće kalupe za formiranje čvrstih uzoraka. Uzorci su očvrstnuti hlađenjem na 4 °C, pomešani sa 500 µL rastvora od 0,5 mg/mL proteinaze K, EET pufera i 0,5% natrijum dodecil sulfata, zagrejanim na 50 °C tokom 30 min, i inkubirani prekononočno na 50 °C u cilju eliminacije proteina. Rastvor je zatim uklonjen, a dodat 0,1 mM rastvor fenilmetilsulfonil fluorida, inhibitora proteinaze K, u zapremini od 10 mL. Nakon 30 min mešanja na sobnoj temperaturi, rastvor je uklonjen, postupak ponovljen još jedanput, da bi na kraju uzorci bili isprani pomoću sterilne vode. Uzorci su zatim isečeni na četiri dela i podeljeni u četiri ependorfice, koje su napunjene sa 300 µL specifičnog pufera za restrikcioni enzim *ApaI* (Fermentas, SAD). Nakon 30 min, pufer je uklonjen, i ponovo dodat u obliku smeše sa 20 U *ApaI* enzima, u zapremini od 100 µL. Ovako napunjene ependorfice su inkubirane tokom 3 h na 37 °C, da bi se izvršilo sečenje DNK ekcentrično na mestima specifičnih

sekvenci od šest baznih parova (5'-GGGCC/C-3'). Smeša pufera i enzima je zatim uklonjena, a dodato je 100 μ L tzv. stop pufera (40% saharoza, 10 mM EDTA, 0,01% bromfenol plavo, pH 8), kako bi se zaustavilo dalje sećenje DNK. Gel za PFGE je napravljen rastvaranjem agaroze u Tris-Borat-EDTA (skr. TBE, pH 8,3) puferu, u koncentraciji 1,2%. Uzorak je nanet na jedan kraj gela i PFGE je sprovedena korišćenjem 2015 Pulsafor unit (LKB Instruments, Švedska), 0,5 x TBE pufera i elektroda raspoređenih u obliku šestougla, na 9 °C pri naponu od 300 V tokom 16 h. Nakon završene PFGE, vizualizacija DNK je omogućena dodavanjem etidijum bromida u koncentraciji 0,5 μ g/mL. PFGE dendrogram je konstruisan korišćenjem SPSS v21.0 softvera (IBM, SAD) i Ward-ove metode korelacije koeficijenata.

3.4.2. Real-Time kvantitativna lančana reakcija polimeraze

Ispitivanje nivoa ekspresije gena koji učestvuju u smanjenoj osetljivosti *A. baumannii* na polimiksine (*lpxA*, *lpxC*, *lpxD*, *pmrC*, *pmrA* i *pmrB*) sprovedeno je primenom Real-Time kvantitativne lančane reakcije polimeraze (eng. *Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction*, skr. RT-qPCR). Kolistin-rezistentni izolati su inkubirani u MHB na 37 °C, tokom 24 h, uz kontinuirano mešanje. Prekonoćne kulture su onda razblažene u svežem MHB i inkubirane do postizanja gustine koja odgovara vrednosti $OD_{600} = 0,5$. Izolacija totalne RNK sprovedena je pomoću RNeasy Mini Kit-a (Qiagen, Nemačka) uz određene modifikacije (Novović *et al.*, 2018). Resuspendovanjem kultura u Tris-HCl-EDTA (skr. TE, pH 7,6) puferu, suplementiranim 15 mg/mL lizozimom (Serva, Nemačka) i 20 mg/mL proteinazom K (Sigma-Aldrich Inc., SAD), i inkubacijom 1 h na 37 °C, indukovana je liza ćelija. Nakon dodatka 96% etanola, ćelijski lizat je centrifugiran na 15871 x g tokom 15 s, a RNK vezana za zidove ependorfice isprana dodatkom RW1 i RPE pufera, tri puta. Izolovana RNK je prečišćena od DNK molekula tretmanom sa DN-azom I, korišćenjem Ambion DNAfree™ Kit-a (Thermo Fisher Scientific, SAD). Reverzna transkripcija, odnosno konverzija RNK u komplementarnu DNK (skr. cDNK), izvršena je pomoću RevertAid RT Transcription Kit-a (Thermo Fisher Scientific, SAD), korišćenjem 1 μ g prečišćene RNK kao matrice, prema protokolu proizvođača. U reakcijama su upotrebljeni nasumični heksameri (Applied Biosystems, SAD), kao i inhibitor RN-aze RiboLock (Thermo Scientific, Litvanija). RT-qPCR je sprovedena pomoću KAPA SYBR Fast qPCR Kit-a (KAPA Biosystems, SAD) u aparatu 7500 Real Time PCR System thermocycler (Applied Biosystems, SAD), prema sledećim uslovima: 3 min na 95 °C, 40 ciklusa od 15 s na 95 °C i 60 s na 60 °C. Prajmeri (Thermo Scientific, Litvanija), koji su upotrebljeni za selektivnu amplifikaciju ciljnih cDNK, navedeni su u Tabeli 4. Pored toga u reakcije je uključen i konstitutivno ekspimiran *rpoB* gen, u odnosu na koji je izvršena normalizacija prilikom izračunavanja nivoa ekspresije ciljnih gena po formuli $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak i Schmittgen, 2001). Osim toga, dobijene vrednosti su kalibrisane u odnosu na rezultate genske ekspresije kolistin-osetljivog soja *A. baumannii* ATCC 19606.

Tabela 4. Spisak prajmera koji su korišćeni za umnožavanje gena povezanih sa rezistencijom na polimiksine kod *A. baumannii*.

Gen	Sekvenca prajmera (5'→3')	Referenca
<i>lpxA</i>	F: AACCACCTACAACCACATGAGAAT R: ACCGCCATTATTGATCCATCTGC	Cafiso <i>et al.</i> , 2019
<i>lpxC</i>	F: ACAACACCCGTATCATCTACACCA R: ATGAAGTCAGTGAGGCACGAACT	Cafiso <i>et al.</i> , 2019
<i>lpxD</i>	F: TGCTTTCTATGCCTGTTTCAGC R: CGCTTACATTGTTACCGCAGC	Cafiso <i>et al.</i> , 2019

<i>pmrC</i>	F: TTGCCAAAGATGATGATCGCCCAC R: AGCCCTGTATCGCATTCTGTATCAC	Cafiso <i>et al.</i> , 2019
<i>pmrA</i>	F: GGTGTTGCTGCTCTTTGACG R: GGTGGAATGGGTCAATAACG	Adams <i>et al.</i> , 2009
<i>pmrB</i>	F: CATTGCTGGTTCACCTGTTGAG R: CCCTCTTTGCTGACTGACCTGA	Cafiso <i>et al.</i> , 2019
<i>rpoB</i>	F: TCCGCACGTAAAGTAGGAAC R: ATGCCGCCTGAAAAAGTAAC	Coyne <i>et al.</i> , 2010b

3.4.3. Sekvenciranje celog genoma

Sekvenciranje celog genoma (eng. *Whole Genome Sequencing*, skr. WGS) polimiksin-rezistentnih izolata *A. baumannii* sprovedeno je pomoću Illumina HiSeq instrumenta uslužno od strane MicrobesNG servisa (IMI-School of Biosciences, Univerzitet u Birmingham-u, Ujedinjeno Kraljevstvo). Povezivanje sekvenciranih delova u kontigove i sastavljanje draft genoma urađeno je upotrebom de Bruijn Graph metoda i Burrows-Wheeler Aligner softvera (Li i Durbin, 2009), pri čemu su kontigovi manji od 200 baznih parova eliminisani (Peng *et al.*, 2012). Anotacija gena i predikcija otvorenih okvira čitanja izvršeni su primenom RAST (eng. *Rapid Annotations using Subsystems Technology*) servera (<http://rast.nmpdr.org>) i SEED baze podataka (Disz *et al.*, 2010). Draft genomi osam sekvenciranih izolata *A. baumannii* su deponovani u GenBank bazu podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (eng. *National Center for Biotechnology Information*, skr. NCBI) pod brojevima JAFFOV000000000-JAFFPC000000000.

3.4.4. Analiza genoma

Nakon primene FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) kontrolne provere kvaliteta, sastavljeni i anotirani draft genomi su analizirani radi određivanja tipa sekvence (eng. *Sequence Type*, skr. ST) i rezistoma kolistin-rezistentnih sojeva, i u cilju identifikacije prisustva mutacija u okviru gena odgovornih za rezistenciju na polimiksine. Multilokusno tipiziranje sekvence (skr. MLST) po Pasterovoj šemi pomoću MLST 2.0 servisa primenjeno je za određivanje ST, dok je rezistom određen primenom ResFinder 4.1 servisa. Oba servisa su dostupna na veb stranici Centra za genomsku epidemiologiju (<http://www.genomicepidemiology.org/services/>). Prisustvo mutacija u okviru *pmrC*, *pmrA*, *pmrB*, *lpxA*, *lpxC* i *lpxD* gena je ispitano pomoću DNA strider softvera (Marck, 1988), poređenjm sa genomima *A. baumannii* ATCC 19606 (GenBank GCA_002811175.1) i *A. baumannii* ATCC 17978 (GenBank GCA_001593425.2), preuzetih sa GenBank baze podataka NCBI. Takođe, prisustvo IS elemenata uzvodno od kodirajućeg regiona *eptA* gena provereno je primenom IS Finder servisa (<https://isfinder.biotoul.fr/>).

3.4.5. Analiza pan-genoma

Pan-genom konstruisan je od svih sekvenciranih i analiziranih genoma kolistin-rezistentnih sojeva, radi poređenja broja ukupno prisutnih i zajedničkih gena. Geni zajednički za sve poređene sojeve grupisani su kao osnovni genom (eng. *core genome*), a pomoćnički geni podeljeni su u *shell* gene (prisutni u 15-95% sojeva) i *cloud* gene (prisutni u manje od 15% sojeva). Anotacija genomskih sekvenci je izvršena pomoću Prokka v1.13 (Seemann, 2014), dobijeni GFF fajlovi su grupisani primenom Roary v3.13.0 (Page *et al.*, 2015), a za vizualizaciju filogenetskog stabla, tj. konstruisanih pan-genoma, primenjen je Phandango servis (Hadfield *et al.*, 2017).

3.5. Ispitivanje otpornosti izolata *A. baumannii* iz rana na baktericidno dejstvo antiseptika i topikalnih antibiotika

Svi klinički sojevi *A. baumannii* iz rana selektirani su za ispitivanje otpornosti na baktericidno dejstvo antiseptika (koji se u kliničkoj praksi primenjuju za tretman rana), ili topikalnih antibiotika:

- Borna kiselina, 3%;
- Etakridin laktat, 0,1%;
- Klindamicin, 1%.

Za ispitivanje baktericidnog dejstva antiseptika primenjena je *Time-kill* metoda, a preživele kolonije su izolovane radi evaluacije povezanosti između nivoa produkcije biofilma i sposobnosti perzistencije sojeva. Pored toga, ispitana je i mogućnost rasta/perzistencije navedenih sojeva u fiziološkom rastvoru.

3.5.1. *Time-kill* test

Vremenski zavisani baktericidni efekat antiseptika i topikalnih antibiotika na *A. baumannii* testiran je primenom *Time-kill* metode, sprovedene prema preporukama CLSI (1999), uz male modifikacije. Kolonije bakterijskih sojeva su suspendovane u fiziološkom rastvoru do gustine od približno $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Pripremljene bakterijske suspenzije su inokulisane u razblaženju od 1:100 ($\approx 10^6$ CFU/mL) u 5 mL fiziološkog rastvora, 3% borne kiseline, 0,1% etakridin laktata, 1% klindamicina, ili MHB (pozitivna kontrola). Pre početka inkubacije, kao i nakon 2 i 24 h inkubacije na 37 °C, uzeto je po 100 μ L od svakog uzorka, i mešanjem sa odgovarajućim zapreminama fiziološkog rastvora, napravljena su razblaženja od 1:10¹ do 1:10⁸. Po 10 μ L od svakog razblaženja je zatim u triplikatu zasejano na MHA i inkubirano na 37 °C u toku 18-24 h. Rezultati su izraženi kao logaritamske vrednosti broja naraslih kolonija po mililitru (\log_{10} CFU/mL) u uzorku.

3.5.2. Test produkcije biofilma

Nivo produkcije biofilma kod preživelih bakterijskih kolonija ispitan je primenom *in vitro* statičke, kolorimetrijske metode, u sterilnim polistirenskim mikrotitarskim pločama sa 96 mesta i ravnim dnom, po proceduri Stepanovića i saradnika (2007). Izolovane kolonije preživelih bakterija su suspendovane u fiziološkom rastvoru do inokuluma koji odgovara 0,5 McFarland standardu ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) i dobro izvorteksovane (najmanje 1 min) radi uklanjanja eventualnih ćelijskih agregata, koji mogu uzrokovati lažno pozitivne rezultate. Po 20 μ L bakterijskog inokuluma je u triplikatu nanoseno u mikrotitarske ploče i pomešano sa 180 μ L tripton soja bujona (skr. TSB; Torlak, Srbija), suplementiranog glukozom do 1% (skr. TSBG). Medijum je pripremljen navedenim postupkom u cilju promovisanja što veće produkcije biofilma. Nakon inkubacije na 37 °C tokom 24 h, ploče su isprane tri puta sa po 300 μ L fosfatnog pufera (eng. *Phosphate-Buffered Saline*, skr. PBS, pH 7,2), radi uklanjanja planktonskih ćelija, pažljivim pipetiranjem niz ivice bunara kako se integritet biofilma ne bi ošteti. Vezane biofilmske ćelije su zatim fiksirane izlaganjem vrelom vazduhu na 60 °C tokom 60 min, a odmah nakon toga, biofilmovi (uključujući matriks i ćelije) su obojeni tretiranjem sa po 150 μ L 0,5% rastvora safranina (HiMedia, Indija). Posle 15 min, boja je isprana pod mlazom vode, vodeći računa da ne dođe u direktan kontakt sa biofilmovima, a ploče su ostavljene da se potpuno osuše na sobnoj temperaturi. Boja je nakon toga ekstrahovana dodavanjem po 150 μ L 96% etanola, a optička gustina (eng. *Optical Density*, skr. OD) boje je kolorimetrijski izmerena na 490 nm pomoću ELISA čitača mikrotitarskih ploča (EZ Read 400, Biochrom, SAD).

3.6. Kvantitativno određivanje produkcije biofilma

Za svaki klinički izolat *A. baumannii* izmerena je količina biofilma koju proizvodi primenom prethodno opisane statičke, kolorimetrijske metode (3.5.2. *Test produkcije biofilma*, str.

44), na osnovu čega su sojevi klasifikovani u tipove proizvođača biofilma prema sledećem algoritmu (OD_c – *cut-off* OD; srednja vrednost OD slepe probe uvećana za 3 x standardna devijacija) (Stepanović *et al.*, 2000):

- $OD \leq OD_c$ – sojevi koji ne proizvode biofilm (eng. *No biofilm Producer*, skr. NP);
- $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ – slabi proizvođači biofilma (eng. *Weak biofilm Producer*, skr. WP);
- $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ – umereni proizvođači biofilma (eng. *Moderate biofilm Producer*, skr. MP);
- $4 \times OD_c < OD$ – izraziti proizvođači biofilma (eng. *Strong biofilm Producer*, skr. SP).

Sojevi SP tipa proizvođača biofilma, uz standardni ATCC 19606 soj, su odabrani za dalja ispitivanja produkcije biofilma pri različitim uslovima, uključujući različite temperature inkubacije i različite hranljive medijume, kao i u prisustvu subinhibitornih koncentracija različitih antibiotika.

3.6.1. Produkcija biofilma pri različitim uslovima inkubacije

Količina proizvedenog biofilma pet kliničkih izolata *A. baumannii* SP tipa izmerena je pri različitim temperaturama inkubacije i nakon kultivacije u različitim hranljivim medijumima, primenom kolorimetrijskog testa produkcije biofilma. Pored standardne temperature od 37 °C, produkcija biofilma je izmerena i nakon inkubacije pri 25 i 45 °C. Takođe, produkcija biofilma je izmerena nakon kultivacije u različitim hranljivim medijumima, umesto standardno primenjivanog TSBG: MHB suplementiran glukozom do 1%, BHI bujon suplementiran glukozom do 1%, nesuplementirani TSB, MHB i BHI bujon, hranljivi bujon i peptonska voda (Tabela 5).

Tabela 5. Sastav hranljivih medijuma primenjenih za kultivaciju biofilma *A. baumannii*.

Tripton-soja bujon	BHI bujon	Müller-Hinton bujon	Peptonska voda	Hranljivi bujon
Tripton, 17 g/L	Infuzija iz telećeg mozga, 12,5 g/L	Infuzija iz govedine, 300 g/L	Pepton-4, 10 g/L	Pepton-1, 15 g/L
Soja pepton, 3 g/L	Infuzija iz goveđeg srca, 5 g/L	Kazein hidrolizat, 17,5 g/L	Natrijum hlorid, 5 g/L	Mesni ekstrakt, 3 g/L
Natrijum hlorid, 5 g/L	Proteozna pepton, 10 g/L	Skrob, 1,5 g/L	Laktoza, 10 g/L	Natrijum hlorid, 5 g/L
Dikalijum fosfat, 2,5 g/L	Natrijum hlorid, 5 g/L		Fuksin S, 0,01 g/L	Dikalijum fosfat, 0,3 g/L
Glukoza, 2,5 g/L	Dikalijum fosfat, 2,5 g/L			
	Glukoza, 2 g/L			

3.6.2. Uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na produkciju biofilma

Produkcija biofilma pet kliničkih izolata *A. baumannii* SP tipa izmerena je nakon kultivacije u rastvoru antibiotika u TSBG, u opsegu subinhibitornih koncentracija. Primenjeni su agensi iz tri različite klase antibiotika:

- Amikacin, u rasponu koncentracija 4-16 $\mu\text{g/mL}$;
- Ciprofloksacin, u rasponu koncentracija 0,25-1 $\mu\text{g/mL}$;
- Meropenem, u rasponu koncentracija 1-4 $\mu\text{g/mL}$.

Za merenje produkcije biofilma primenjena je kolorimetrijska metoda, a sojevi čiji je rast inhibiran pod uticajem ispitivanih koncentracija, izostavljeni su iz rezultata.

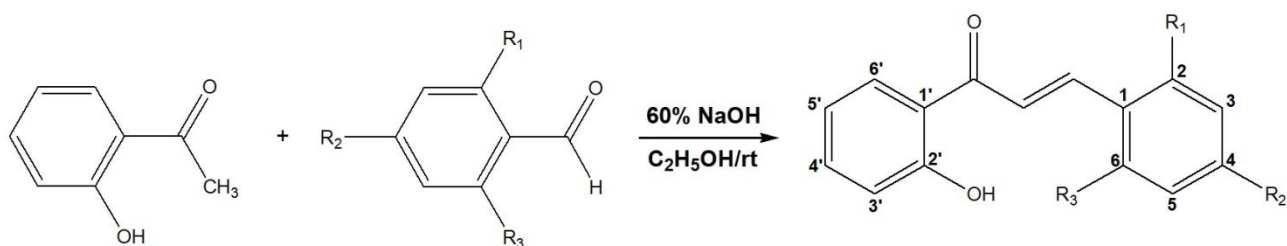
3.7. Sinteza i karakterizacija halkona

Različito supstituisani derivati hidroksihalkona sintetisani su na Katedri za farmaceutsku hemiju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, primenom bazno-katalizovane *Claisen-Schmidt* kondenzacije, i njihove antimikrobne i antibiofilmske aktivnosti ispitane su protiv multirezistentnih sojeva *A. baumannii*. Sintetisana su sledeća jedinjenja:

- **o-OCH₃** – 3-(2-metoksifenil)-1-(2-hidroksifenil)-2-propen-1-on;
- **p-CF₃** – 3-(4-trifluorometilfenil)-1-(2-hidroksifenil)-2-propen-1-on;
- **2,6-OCH₃** – 3-(2,6-dimetoksifenil)-1-(2-hidroksifenil)-2-propen-1-on;
- **p-F-o-CH₃** – 3-(4-fluoro-2-metilfenil)-1-(2-hidroksifenil)-2-propen-1-on.

3.7.1. Bazno-katalizovana Claisen-Schmidt kondenzacija

Halkoni su sintetisani pomoću *Claisen-Schmidt* kondenzacije 2-hidroksiacetofenona (Sigma-Aldrich Inc., SAD) i supstituisanog benzaldehida (Sigma-Aldrich Inc., SAD) u prisustvu relativno jake baze (60% NaOH), na sobnoj temperaturi (Slika 8). Za dobijanje četiri različita halkona (o-OCH₃, p-CF₃, 2,6-OCH₃ i p-F-o-CH₃) upotrebljeno je četiri različito supstituisanih benzaldehida. Simultanim rastvaranjem 2-hidroksiacetofenona (0,012 mol) i supstituisanog benzaldehida (0,01 mol) u 10 mL 96% etanola, uz kontinuirano mešanje, dobijen je bezbojni rastvor, koji je zatim dopunjen sa 60% NaOH (Sigma-Aldrich Inc., SAD), postepenim dodavanjem u malim količinama do postizanja crvene boje. Rastvor je onda ostavljen preko noći uz kontinuirano mešanje, da bi sledećeg dana halkon precipitirao u obliku narandžaste natrijumove soli, a ovako dobijena mikstura je držana na 0 °C tokom 24 h. Nakon toga, mikstura je razblažena ledenom vodom i zakišeljena hladnim 1 mol/L HCl (Sigma-Aldrich Inc., SAD), postepenim dodavanjem do postizanja vrednosti pH od približno 3. Nastali žuti precipitat je profiltriran pod vakuumom, ispran ledenom vodom do približno neutralne pH vrednosti, i ostavljen na vazduhu, na tamnom mestu, da se osuši. Ovako dobijena sirova mikstura je prečišćena primenom tankoslojne hromatografije (eng. *Thin Layer Chromatography*, skr. TLC) na silika gelu (TLC Silica gel 60 F₂₅₄ aluminijumske ploče, Merck, Nemačka) sa toluenom kao mobilnom fazom. Nakon uklanjanja toluena pod vakuumom, došlo je do rekristalizacije sirovih proizvoda (halkona) iz etanola. Hemijske strukture sintetisanih halkona su potvrđene primenom FTIR, ¹H NMR i ¹³C NMR spektroskopskih tehnika, kao i ESI-MS spektrometrije.



	o-OCH ₃	p-CF ₃	2,6-OCH ₃	p-F-o-CH ₃
R ₁	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₃
R ₂	-H	-CF ₃	-H	-F
R ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H

Slika 8. Postupak sinteze halkona. rt – eng. *room temperature*, sobna temperatura

3.7.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

FTIR spektri sintetisanih halkona su snimljeni pomoću Nicolet iS10 spektrometra (Thermo Fisher Scientific, SAD) u refleksionom modu tzv. ometena totalna refleksija (eng. *Attenuated Total Reflectance*, skr. ATR), u oblasti talasnih brojeva od 400-4000 cm⁻¹ i rezolucijom od 4 cm⁻¹. ATR tehnika uzorkovanja je brza, nedestruktivna i ne zahteva prethodnu pripremu uzoraka. Prilikom snimanja korišćen je OMNIC softverski paket koji dozvoljava brzo i lako dobijanje spektara, njihovu dalju obradu i analizu kao i upravljanje FTIR podacima u grafičkom okruženju.

3.7.3. Nuklearna magnetna rezonanca

Hemijske strukture sintetisanih halkona su dodatno potvrđene primenom nuklearne magnetne rezonance (skr. NMR). Pomoću Bruker Ascend 400 NMR spektrometra (Bruker, SAD), snimljeni su ¹H NMR (na 400 MHz) i ¹³C NMR (na 100 MHz) spektri, na sobnoj temperaturi u deuterisanom hloroformu (CDCl₃), korišćenjem tetrametilsilana kao internog standarda. Hemijska pomeranja (δ) su izražena u ppm, a konstante kuplovanja (*J*) u Hz. Signali su izraženi kao singlet (s), dublet (d), triplet (t), ili multiplet (m).

3.7.4. Elektrosprej jonizaciona masena spektrometrija

Molekularna formula sintetisanih halkona procenjena je na osnovu masenih spektara snimljenih primenom elektrosprej jonizacione masene spektrometrije (skr. ESI-MS) i Accela 6000 TSQ Quantum Access Max instrumenta (Thermo Fisher Scientific, SAD).

3.7.5. Svetlosna mikroskopija

Pomoću OPTICA B-500MET svetlosnog mikroskopa (Optica SRL, Italija), opremljenog OPTIKAM PRO 8LT – 4083.18 kamerom sa CCD detektorom, napravljene su fotografije na osnovu kojih je sprovedena analiza mikrostrukture sintetisanih halkona.

3.7.6. Rendgenska difrakciona analiza

Stepen kristaliničnosti sintetisanih halkona utvrđen je primenom rendgenske difrakcione analize (skr. XRD) na difraktometru Philips PW 1050 (Philips, Holandija), koji emituje Cu-Kα zračenje, talasne dužine λ=1,5406 Å (Ni filter). Uzorci su skenirani u intervalu uglova 2θ od 10-70°, uz rezoluciju skeniranja od 0,05° i brzinu skeniranja od 2 s po koraku.

3.7.7. Termalne analize

Termogravimetrijska i diferencijalna termalna analiza (skr. TGA-DTA) sprovedena je radi utvrđivanja termalne stabilnosti sintetisanih halkona, primenom instrumenta SETSYS evolution i CALISTO softvera (SETARAM, Francuska). Prilikom merenja uzoraka korišćene su posudice od alumine. Uzorci su zagrevani do 900 °C, brzinom od 10 °C/min. Za ispitivanje faznih promena u okviru regiona termalne stabilnosti utvrđenog sa TGA-DTA, upotrebljena je diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (skr. DSC). Analiza je izvršena pomoću instrumenta DSC 131 EVO i CALISTO softvera (SETARAM, Francuska), a uzorci su prilikom merenja bili hermetički zatvoreni u aluminijumske posudice od 30 µL i zagrevani brzinom od 10 °C/min u inertnoj atmosferi azota.

3.8. Ispitivanje antimikrobnih, antibiofilmskih i antivirulentnih aktivnosti halkona

3.8.1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti halkona

Antimikrobna aktivnost sintetisanih halkona protiv svih sojeva *A. baumannii* obuhvaćenih u ovoj disertaciji, uključujući ATCC 19606 soj, ispitana je primenom bujon-mikrodilucione metode prema prethodno opisanoj proceduri (3.3.3. *Bujon-mikrodiluciona metoda*, str. 41). Usled hidrofobnih osobina, halkoni su rastvoreni MHB uz dodatak dimetilsulfoksida (skr. DMSO; Sigma-Aldrich, SAD), tako da koncentracija DMSO u finalnom testiranom rastvoru bude manja od 5%, odnosno da ne utiče na antimikrobnu aktivnost ispitivanih halkona. Halkoni su testirani u opsegu koncentracija od 50-250 µg/mL. Nakon inkubacije na 37 °C tokom 18-24 h, detektovane su MIC vrednosti uz pomoć TTC. Dodatno, vremenski zavisno baktericidno dejstvo određeno je za dva selektirana halkona (o-OCH₃ i p-CF₃), na dva klinička izolata i ATCC 19606 soju, primenom *Time-kill* testa (CLSI, 1999). Početni inokulum od ≈ 10⁵ CFU/mL pripremljen je u 5 mL MHB i inkubiran na 37 °C. U definisanim vremenskim tačkama (0 h, 2 h, 4 h, 8 h i 24 h), odgovarajuća razblaženja kulture (tretirane i netretirane) su u triplikatima zasejana na MHA ploče, a nakon inkubacije na 37 °C u toku 18-24 h, izračunati su rezultati u obliku log₁₀ CFU/mL.

3.8.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti o-OCH₃ i p-CF₃ u kombinaciji sa antibioticima

Antimikrobna aktivnost halkona o-OCH₃ i p-CF₃ u kombinaciji sa antibioticima iz različitih klasa (amikacin, ciprofloksacin i meropenem) protiv *A. baumannii*, ispitana je primenom *Checkerboard* metode (Kiffer *et al.*, 2005). U ispitivanje je uključeno ukupno 20 kliničkih izolata. Sojevi su resuspendovani u fiziološkom rastvoru do gustine koja odgovara 0,5 McFarland standardu (1,5 x 10⁸ CFU/mL), a pomoću MHB razblaženi do početnog inokuluma od približno 10⁶ CFU/mL. Ovako pripremljene bakterijske suspenzije su u zapreminama od 100 µL nanošene u mikrotitarske ploče sa 96 mesta, prethodno popunjene sa po 50 µL opadajućih koncentracija halkona i antibiotika u obliku šahovske table. Halkoni su testirani u opsegu koncentracija od 12,5-150 µg/mL, meropenem od 0,5-128 µg/mL, amikacin od 1-1024 µg/mL, a ciprofloksacin od 1-128 µg/mL. Dodatno, testirane su potencijalne sinergističke interakcije između meropenema i verapamila (Alkaloid AD Skopje, Severna Makedonija) u koncentraciji od 10 µg/mL, potentnog inhibitora efluksnih pumpi (Lechner *et al.*, 2008), koje bi u slučaju pozitivnih rezultata doprinele razjašnjenju mehanizma sinergističke aktivnosti halkona i meropenema protiv određenih sojeva. MHB je upotrebljen kao hranjivi medijum, a inkubacija je sprovedena na 37 °C tokom 18-24 h. Tipovi interakcija između halkona i antibiotika procenjeni su izračunavanjem frakcionih inhibitornih koncentracija (eng. *Fractional Inhibitory Concentration*, skr. FIC) i indeksa frakcionih inhibitornih koncentracija (eng. *Fractional Inhibitory Concentration Index*, skr. FICI) prema sledećim jednačinama (A – halkon; B – antibiotik):

$$FIC_A = MIC_{AB}/MIC_A$$

$$FIC_B = MIC_{AB}/MIC_B$$

$$FICI = FIC_A + FIC_B$$

FICI vrednosti su interpretirane prema sledećem kriterijumu (Kiffer *et al.*, 2005):

- $FICI \leq 0,5$ – sinergizam;
- $0,5 < FICI \leq 1$ – parcijalni sinergizam;
- $FICI = 1$ – aditivnost;
- $1 < FICI \leq 4$ – indiferencija;
- $FICI > 4$ – antagonizam.

Dodatno je ispitan vremenski zavisn baktericidan efekat interakcije o-OCH₃ halkona i meropenema, na ATCC 19606 soju i dva klinička izolata kod kojih je pokazan sinergizam, metodom *Time-kill* testa, po goreopisanom postupku (str. 44).

3.8.3. Ispitivanje uticaja halkona na produkciju biofilma

U okviru ovih ispitivanja obuhvaćeno je testiranje uticaja svih halkona na produkciju monomikrobnog biofilma *A. baumannii*, kao i testiranje uticaja odabranih halkona na produkciju polimikrobnog biofilma, vijabilnost biofilmskih ćelija, osetljivost biofilmskih ćelija na meropenem i produkciju biofilma na kateterima.

3.8.3.1. Monomikrobni biofilm

Potencijalni inhibitorni uticaj halkona na produkciju biofilma *A. baumannii* ispitan je primenom statičke, kolorimetrijske metode, na polistirenskim mikrotitarskim pločama sa 96 mesta (3.5.2. *Test produkcije biofilma*, str. 44). Ispitana je aktivnost svih sintetisanih halkona protiv ukupno 17 kliničkih izolata, pri čemu su obuhvaćeni svi tipovi biofilmskih proizvođača (WP, MP i SP), izuzev sojeva koji ne proizvode biofilm. Testirane su dve subinhibitorne koncentracije halkona (35 i 70 µg/mL), pripremljene rastvaranjem halkona u DMSO (finalne koncentracije <1%), a TSBG je korišćen kao hranjivi medijum. Izmerene su OD₄₉₀ etanolom ekstrahovanog 0,5% safranina, a nivo produkcije biofilma je izračunat oduzimanjem srednje vrednosti OD slepe probe od OD tretirane grupe/pozitivne kontrole. Rezultati su izraženi kao procenat nivoa produkcije biofilma u odnosu na pozitivnu kontrolu.

3.8.3.2. Polimikrobni biofilm

Nivo produkcije polimikrobnog biofilma *A. baumannii* u dualnim kombinacijama sa različitim mikroorganizmima, pod uticajem o-OCH₃ i p-CF₃, ispitan je na polistirenskim mikrotitarskim pločama sa 96 mesta, po metodi opisanoj od strane Skafaroa i saradnika (Scaffaro *et al.*, 2018) uz neznatne modifikacije. U ispitivanjima su obuhvaćeni jedino izolati *A. baumannii* iz rana (ukupno 12), koji su testirani u kombinaciji sa kliničkim izolatima meticilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* (skr. MRSA), ili *Candida* spp. (Tabela 6) odnosno mikroorganizmima koji često u praksi uzrokuju polimikrobne infekcije rana. Osim toga, ispitan je uticaj dva halkona na produkciju polimikrobnog biofilma standardnih sojeva *A. baumannii* ATCC 19606 u kombinaciji sa *S. aureus* ATCC 6538 ili *C. albicans* ATCC 10231, kao i sa *P. aeruginosa* ATCC 9027 ili *K. pneumoniae* NCIMB 9111, dva Gram-negativna patogena koji takođe često kontaminiraju rane. Sojevi *A. baumannii* su inokulisani simultano sa *S. aureus*, *P. aeruginosa*, ili *K. pneumoniae*, a u slučaju kombinacije sa *C. albicans*, 1 h nakon inokulacije kvasnice da bi se omogućilo formiranje hifa. Svi sojevi su pripremljeni u početnom inokulumu od približno 10⁶ CFU/mL, u TSBG medijumu. Halkoni su testirani u koncentracijama od 35 i 70 µg/mL, a merenje i prikaz rezultata su sprovedeni na prethodno opisan način za ispitivanje uticaja na produkciju monomikrobnog biofilma.

Tabela 6. Poreklo kliničkih izolata *S. aureus*, *C. albicans* i *C. krusei*, i podaci o pacijentima iz kojih su izolovani.

Soj	Godina izolacije	Poreklo	Biološki uzorak	Pol ^a	Starost (godine)
<i>S. aureus</i> B928	2018	Beo-lab	Bris uha	ND	ND
<i>C. albicans</i> D719	2019	KBC Dragiša Mišović	Sputum	Ženski	58
<i>C. albicans</i> B122	2019	Beo-lab	Bris vagine	Ženski	31
<i>C. albicans</i> B123	2019	Beo-lab	Bris vagine	Ženski	48
<i>C. krusei</i> D693	2019	KBC Dragiša Mišović	Urin	Muški	ND

^aND – podaci nisu dostupni

3.8.3.3. Vijabilnost biofilmskih ćelija

Dodatno, na izolatima *A. baumannii* iz rana, uključenim u ispitivanje uticaja halkona na produkciju polimikrobnog biofilma, ispitan je i uticaj o-OCH₃ i p-CF₃ (u koncentracijama od 35 i 70 µg/mL) na vijabilnost biofilmskih ćelija (Sabaeifard *et al.*, 2014). Ispitana je vijabilnost biofilmskih ćelija inkubiranih u obliku monomikrobnog biofilma, kao i polimikrobnog biofilma standardnih sojeva *A. baumannii* ATCC 19606 sa *S. aureus* ATCC 6538 ili *C. albicans* ATCC 10231. Nakon prekonocne inkubacije sojeva i postupka ispiranja sa PBS pod istim uslovima kao i u slučaju kolorimetrijskog testa produkcije biofilma (3.5.2. *Test produkcije biofilma*, str. 44), mikrotitarske ploče su napunjene sa po 120 µL svežeg TSBG i 30 µL 0,5% TTC, i inkubirane još 6 h na 37 °C, u tami. U zavisnosti od broja vijabilnih biofilmskih ćelija, različit udeo TTC je redukovan do formazana, a posledično se razlikovao i intenzitet nastale crvene boje rastvora. OD su izmerene na 405 nm primenom EZ Read 400 ELISA čitača mikrotitarskih ploča. Rezultati su interpretirani kao procenat vijabilnih biofilmskih ćelija tretirane grupe u odnosu na pozitivnu kontrolu. Količina vijabilnih biofilmskih ćelija je izračunata oduzimanjem OD₄₀₅ slepe probe od srednje vrednosti OD₄₀₅ tretirane grupe/pozitivne kontrole.

3.8.3.4. Osetljivost biofilmskih ćelija *A. baumannii* na meropenem, pretretiranih sa o-OCH₃ ili p-CF₃

Osetljivost biofilmskih ćelija *A. baumannii* na meropenem, nakon inkubacije u prisustvu o-OCH₃ ili p-CF₃, ispitana je na ukupno 10 izolata iz rana. Bakterijske suspenzije su pripremljene u fiziološkom rastvoru u početnom inokulumu od približno 1,5 x 10⁸ CFU/mL, i u odnosu 1:10 pomešane sa TSBG, u sterilnim staklenim epruvetama. Dodatno, tretirane grupe su suplementirane halkonima u koncentracijama od 35 i 70 µg/mL. Finalna zapremina u svim epruvetama (tretirane i kontrolne grupe) iznosila je 5 mL. Posle inkubacije na 37 °C u toku 24 h, epruvete su isprane tri puta sa po 6 mL PBS, napunjene sa 5 mL svežeg TSBG i dobro izvorteksovane u trajanju od najmanje 1,5 min, kako bi se stimulisala disperzija biofilmskih ćelija u bujon, nakon čega su ponovo inkubirane na 37 °C, 18-24 h. Kulture biofilmskih ćelija, pripremljene na ovaj način, korišćene su za određivanje MIC za meropenem pomoću bujon-mikrodilucione metode (3.3.3. *Bujon-mikrodiluciona metoda*, str. 41). Radi evaluacije potencijalnog porasta osetljivosti biofilmskih ćelija *A. baumannii* na meropenem, nakon pretretmana u prisustvu halkona, upoređene su MIC vrednosti tretiranih i kontrolnih grupa.

3.8.3.5. Produkcija biofilma na kateterima

Produkcija biofilma na poliuretanskim kateterima, pod uticajem o-OCH₃ u koncentracijama od 35 i 70 µg/mL, ispitana je na četiri klinička izolata *A. baumannii*. Kateter je najpre očišćen pomoću sapuna i vode, zatim ispran pod mlazom vrele vode, kao i destilovanom vodom, po tri puta, i na kraju iseckan na male deliće (≈ 4 mm), koji su autoklavirani na 121 °C tokom 15 min i pojedinačno podeljeni pomoću sterilne pincete u bunariće mikrotitarske ploče. Bunarići sa delićima katetera su zatim napunjeni bakterijskim suspenzijama (≈ 1,5 x 10⁸ CFU/mL) i TSBG u odnosu 1:10, i odgovarajućim koncentracijama o-OCH₃ u slučaju tretiranih grupa, do ukupno 200 µL. Ploče su inkubirane 24 h na 37 °C, a zatim isprane tri puta sa PBS, a količina formiranog biofilma na kateterima procenjena je pomoću 0,5% TTC, dodatog u bunariće zajedno sa svežim TSBG u odnosu 1:4. Nakon inkubacije u tami, na 37 °C tokom 6 h, delići katetera su prebačeni na čiste plastične ploče, i napravljene su digitalne fotografije na beloj pozadini. Kvantifikacija biofilma formiranog na deliću katetera sprovedena je na osnovu izračunavanja indeksa crvene boje u oblasti celog delića pomoću ImageJ 1.52a softvera (National Institutes of Health, SAD). Digitalne fotografije su razdvojene po bojama crvena/zelena/plava (eng. *Red/Green/Blue*, skr. RGB), logaritamski transformisane crvene i zelene slike su integrisane, izvršena je korekcija osvetljenosti, i indeks crvene boje je izračunat primenom histogramске analize (Yamamoto *et al.*, 2008).

3.8.4. Ispitivanje uticaja o-OCH₃ i p-CF₃ na motilitet

Testovi motiliteta sprovedeni su na šest kliničkih izolata prema prethodno opisanim metodama uz određene modifikacije (Skiebe *et al.*, 2012; Harding *et al.*, 2013). Sveže prekonocne kulture sojeva pripremljene su na MHA, nakon čega su pojedinačne kolonije inokulisane u sveže, specifično pripremljene podloge. Za ispitivanje površinskog motiliteta pripremljene su podloge od 2,5 g/L NaCl, 5 g/L triptona i 4 g/L agara, a kolonije su inokulisane na površinu agara. Za ispitivanje trzajućeg motiliteta pripremljene su podloge od 5 g/L NaCl, 10 g/L triptona i 10 g/L agara, a kolonije su inokulisane probadanjem agara do dna, tako da se omogući rast na međupovršini između agara i Petrijeve ploče. Ploče su zatim zamotane parafilmom da se spreči sušenje i prodor cirkulišućeg vazduha, i inkubirane na 37 °C, u tami, tokom 42 h. Merenjima površina migracije sojevi su klasifikovani prema pokretljivosti na osnovu sledeće šeme: >400 mm² – visoko pokretljivi, 25-400 mm² – umereno pokretljivi, <25 mm² – nepokretni (Vijayakumar *et al.*, 2016). Uticaj o-OCH₃ i p-CF₃ na motilitet ispitan je inkorporiranjem halkona u podloge, tako da budu homogeno distribuirani u koncentracijama od 35 i 70 µg/mL nakon nalivanja autoklavirane podloge, dovoljno ohlađene vodeći računa da ne utiče na stabilnost halkona. Nakon završene inkubacije, agar sa podloga za ispitivanje trzajućeg motiliteta je pažljivo uklonjen, i ploče su obojene sa 15 mL 0,5% safranina radi vizualizacije zona pokretljivosti. Površine zona površinske i trzajuće pokretljivosti izmerene su primenom ImageJ 1.52a softvera iz digitalnih fotografija, a uticaj halkona je procenjen poređenjem pokretljivosti tretiranih i kontrolnih grupa.

3.8.5. Ispitivanje uticaja o-OCH₃ na gensku ekspresiju biofilm-povezanih faktora virulencije

Antivirulentna aktivnost o-OCH₃ protiv *A. baumannii* procenjena je posredstvom ispitivanja uticaja na gensku ekspresiju faktora virulencije povezanih sa produkcijom biofilma (OmpA, Bap i AbaI) i fenotipsku ekspresiju povezanih virulentnih osobina (adhezija na komponente ECM i aktivnost QS sistema).

3.8.5.1. Ekspresija *ompA*, *bap* i *abaI* gena

Uticaj različitih koncentracija (10, 35 i 70 µg/mL) o-OCH₃ na ekspresiju *ompA*, *bap* i *abaI* gena ispitan je primenom RT-qPCR metode na jednom kliničkom izolatu *A. baumannii* iz rane, kao i na ATCC 19606 soju. Prekonocne bakterijske kulture u MHB (inokulisane sa približno 1,5 x 10⁸ CFU/mL), tretirane sa o-OCH₃, kao i netretirane kontrole, podvrgnute su izolaciji totalne RNK, tretmanu DN-azom I, kao i reverznoj transkripciji, kako je prethodno opisano, i amplifikovane pomoću 7500 Real Time PCR System thermocycler aparata prema prethodno navedenim uslovima

(3.4.2. *Real-Time kvantitativna lančana reakcija polimeraze*, str. 42). Normalizacija rezultata je izvršena u odnosu na *rpoB* gen, čiji je prajmer naveden u Tabeli 4, a ostali prajmeri (Thermo Scientific, Litvanija) koji su korišćeni navedeni su u Tabeli 7.

Tabela 7. Spisak prajmera koji su korišćeni za umnožavanje gena koji kodiraju faktore virulencije *A. baumannii*.

Gen	Sekvenca prajmera (5'→3')	Referenca
<i>ompA</i>	F: TCTTGGTGGTCACTTGAAGC R: ACTCTTGTGGTTGTGGAGCA	McConnell <i>et al.</i> , 2012
<i>bap</i>	F: AATGCACCGGTACTIONTGGATCC R: TATTGCCTGCAGGGTCAGTT	De Gregorio <i>et al.</i> , 2015
<i>abaI</i>	F: CCGCCTTCCTCTAGCAGTCA R: AAAACCCGCAGCACGTAATAA	Selasi <i>et al.</i> , 2016

3.8.5.2. Adhezija na fibronektin i kolagen

Sposobnost adhezije *A. baumannii* na komponente ECM (fibronektin i kolagen) ispitana je na jednom kliničkom izolatu iz rane, kao i na ATCC 19606 soju, u prisustvu tri različite koncentracije (10, 35 i 70 µg/mL) o-OCH₃ (Smani *et al.*, 2012; Malešević *et al.*, 2017). Mikrotitarske ploče sa 96 mesta su obložene humanim fibronektinom (Serva, Nemačka) ili rekombinantnim humanim kolagenom tip I (Sigma-Aldrich Inc., SAD), u koncentracijama od 100 µg/mL, inkubacijom na 4 °C tokom 16 h. Ploče su zatim isprane tri puta sa PBS i blokirane 2% rastvorom goveđeg serumskog albumina (eng. *Bovine Serum Albumin*, skr. BSA) u PBS, na sobnoj temperaturi u toku 1 h. Posle uklanjanja BSA, ploče su opet isprane tri puta sa PBS, nakon čega su dodate prekonocne MHB kulture sojeva (inokulisane u približno 1,5 x 10⁸ CFU/mL), tretirane ili netretirane, u zapreminama od 100 µL. Ploče su zatim inkubirane na 37 °C tokom 3 h, nakon čega su nevezane bakterije isprane sa PBS, a adherirane ćelije sakupljene pomoću 0,5% rastvora Triton X-100 (Sigma-Aldrich Inc., SAD) u PBS, koji je nanošen u zapreminama od 125 µL. Sakupljene suspenzije bakterija su u dvostrukim razblaženjima zasejane na LB agar i inkubirane tokom 24 h na 37 °C, nakon čega je metodom brojanja bakterijskih kolonija izračunat procenat adheriranih ćelija.

3.8.5.3. Kolorimetrijska kvantifikacija produkcije AHL

Nivo produkcije 3-OH-C12-HSL molekula, pod uticajem o-OCH₃, ispitano je na devet različitih kliničkih izolata *A. baumannii*, primenom kolorimetrijske kvantifikacione tehnike za procenu produkcije AHL (Modarresi *et al.*, 2015). Sojevi su inokulisani (približno 1,5 x 10⁸ CFU/mL) u 5 mL MHB suplementiranog sa 35 ili 70 µg/mL o-OCH₃ i inkubirani na 37 °C tokom 24 h. Kulture u epruvetama su zatim centrifugirane 15 min na 5000 rpm u cilju izdvajanja supernatanta. Supernatanti su dodatno profiltrirani kroz membranske filtere veličine pora 0,22 µm, radi eliminacije ćelijskog debrisa, a nakon toga pomešani sa etil acetatom (Sigma-Aldrich Inc., SAD) u odnosu 2:1. Ova mikstura je vorteksovana tokom 10 min, a zatim ostavljena da odstoji 5 min, nakon čega je gornja organska faza sakupljena. Proces je ponovljen još dva puta sa preostalim vodenom fazom. Sakupljena organska faza je osušena na 40 °C, a nakon toga je po 160 µL od svakog uzorka preneto u mikrotitarske ploče, u koje je prethodno naneto: 20 µL 1:1 miksture 2 M hidrosilamina (Sigma-Aldrich Inc., SAD) i 3,5 M NaOH, i 20 µL 1:1 miksture FeCl₃ (10% u 4 M HCl) i 96% etanola. OD nastalih tamno-braon obojenih kompleksa Fe³⁺ jona i hidrosaminske kiseline, izmerene su na 520 nm pomoću EZ Read 400 ELISA čitača mikrotitarskih ploča.

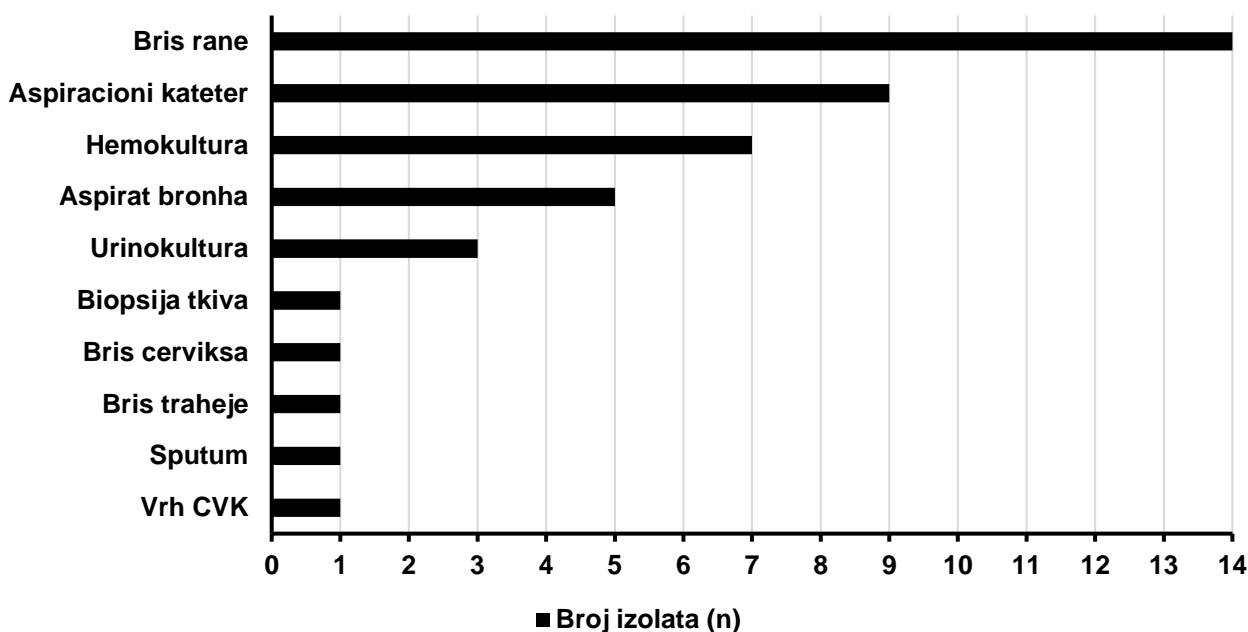
3.9. Statistička analiza

Svi testovi su ponovljeni najmanje tri puta. Rezultati su predstavljeni u obliku srednjih vrednosti \pm standardne devijacije (SD). Normalnost raspodele je ispitana primenom *Shapiro-Wilk* testa. Razlike između eksperimentalnih i kontrolnih grupa poređene su primenom Studentovog *t*-testa ili jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) uz *Tukey post hoc* test u slučaju prisustva normalne raspodele, ili pomoću *Mann-Whitney U*-testa ili neparametarske analize varijanse (*Kruskal-Wallis* test) uz *Mann-Whitney post hoc* test u slučaju odsustva normalne raspodele. Vrednosti $P < 0,05$ smatrane su statistički značajnim. Statističke analize sprovedene su primenom softvera SPSS v18.0.0 (IBM, SAD) i GraphPad Prism v8.0 (SAD).

4. REZULTATI

4.1. Poreklo sojeva i demografski podaci

Od ukupno 43 klinička izolata *A. baumannii*, sakupljena i korišćena u ispitivanjima za potrebe ove doktorske disertacije, 40 (93,02%) su bili bolnički izolati, dok su 3 (6,98%) soja izolovana u ambulantnim uslovima (Beo-lab laboratorije). Najviše sojeva izolovano je iz bioloških uzoraka pacijenata hospitalizovanih u KBC Dragiša Mišović (20 sojeva, odnosno 46,51%), 13 (30,23%) sojeva je izolovano u KBC Zvezdara, dok su ostali izolovani u KCS (5 sojeva, odnosno 11,63% iz UC, a 2 soja, odnosno 4,65% iz GAK). Sojevi su izolovani iz 10 različitih bioloških uzoraka, od čega najviše iz brisa rana (Slika 9). Pacijenti su bili prosečne starosti 67 godina, 58,14% je bilo ženskog pola, a 41,86% muškog pola. Najmlađi pacijent je bio muškarac od 23 godine, a najstariji pacijent žena od 90 godina.



Slika 9. Biološki uzorci iz kojih su izolovani sojevi *A. baumannii*.

4.2. Osetljivost kliničkih izolata *A. baumannii* na antibiotike

Na osnovu rezultata ispitivanja antimikrobne osetljivosti pomoću VITEK 2 sistema, agar-difuzione metode i bujon-mikrodilucione metode, utvrđeno je da je od 43 testirana klinička izolata, 7 (16,28%) ispoljilo PDR profil rezistencije, 2 (4,65%) soja MDR, dok su ostali (79,07%) pripadali XDR tipu (Tabela 8). Od toga, 42 (97,67%) izolata bilo je rezistentno na karbapeneme, odnosno klasifikovani su kao CRAB, a 8 (18,60%) izolata bilo je rezistentno na kolistin. Za amikacin, ciprofloksacin, meropenem i kolistin su određene navedene MIC₅₀ i MIC₉₀ vrednosti (MIC₅₀ – MIC za 50% kliničkih izolata, MIC₉₀ – MIC za 90% kliničkih izolata):

- Amikacin, MIC₅₀ >4096 µg/mL, MIC₉₀ >4096 µg/mL;
- Ciprofloksacin, MIC₅₀ = 64 µg/mL, MIC₉₀ = 128 µg/mL;
- Meropenem, MIC₅₀ = 64 µg/mL, MIC₉₀ = 256 µg/mL;
- Kolistin, MIC₅₀ = 1 µg/mL, MIC₉₀ = 32 µg/mL.

Pored kolistina, na koji je bilo osetljivo 35 (81,40%) izolata, neki izolati su pokazali osetljivost na tigeciklin (5 izolata), tobramicin (3 izolata), amikacin (3 izolata), ampicilin/sulbaktam (2 izolata), i po 1 izolat na minociklin, netilmicin, gentamicin, piperacilin/tazobaktam, meropenem, imipenem i

trimetoprim/sulfametoksazol. Treba uzeti u obzir da nisu svi izolati testirani na osetljivost na tigeciklin, tobramicin, ampicilin/sulbaktam, minociklin, netilmicin i piperacilin/tazobaktam.

Tabela 8. Rezultati testiranja osetljivosti kliničkih izolata *A. baumannii* na antibiotike primenom VITEK 2 sistema, agar-difuzione metode i bujon-mikrodilucione metode, i određeni profili rezistencije.

Soj	Rezistencija na klase antibiotika ^a	MIC (µg/mL)				Osetljivost na specifične antibiotike ^b	Profil rezistencije
		AMK	CIP	MEM	CST		
ATCC 19606	NO	8	2	2	0,5	NO	UDR
Z6142	PEN ^R , CEF ^R , CB ^R , CHL ^R , TC ^R , FQ ^R	32	16	128	0,5	MIN ^S , CST ^S	XDR
Z6228	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , TGC ^R , FQ ^R , SXT ^R	256	64	128	0,25	TOB ^S , CST ^S	XDR
Z6235	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , TGC ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	32	96	0,5	CST ^S	XDR
Z6419	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , TGC ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	64	24	0,5	CST ^S	XDR
Z6420	CB ^R , AG ^R , TGC ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	64	32	1	SAM ^S , CST ^S	XDR
Z6853	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , TGC ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	16	128	1	TGC ^S , CST ^S	XDR
Z6879	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , TGC ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	128	512	0,5	TGC ^S , CST ^S	XDR
Z7085	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , TGC ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	64	192	1	TGC ^S , CST ^S	XDR
B101	PEN ^R , CEF ^R , CB ^R , ATM ^R , AG ^R , CHL ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	64	8	0,25	CST ^S	XDR
B102	CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	256	64	64	0,5	TOB ^S , NET ^S , CST ^S	XDR

B103	CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	512	64	128	256	/	PDR
Z94	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	128	128	0,5	CST ^S	XDR
D345	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	32	128	1	CST ^S	XDR
D371	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	512	64	128	0,5	CST ^S	XDR
D441	PEN ^R , CB ^R , FQ ^R , SXT ^R	8	64	32	64	AMK ^S , GEN ^S , TOB ^S	XDR
G1108	PEN ^R , CEF ^R , AG ^R , CHL ^R , FQ ^R , SXT ^R	4	128	1	1	TZP ^S , IPM ^S , MEM ^S , AMK ^S , CST ^S	MDR
G1812	PEN ^R , CEF ^R , CB ^R , AG ^R , CHL ^R , TGC ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	64	16	32	/	PDR
D423	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	64	32	1	CST ^S	XDR
D650	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	512	64	32	16	/	PDR
D613	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	16	256	1	CST ^S	XDR
D710	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	1024	64	32	0,25	CST ^S	XDR
D755	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	512	64	96	0,5	CST ^S	XDR
D749	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	256	64	64	16	/	PDR
D811	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R ,	>4096	128	96	32	/	PDR

	SXT ^R						
D809	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	4096	32	128	0,5	CST ^S	XDR
D812	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	32	128	1	CST ^S	XDR
D863	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	32	32	64	1	CST ^S	XDR
D746	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	128	64	0,25	CST ^S	XDR
D1010	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	64	256	256	/	PDR
D1002	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	256	32	64	256	/	PDR
D989	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	128	256	0,5	CST ^S	XDR
D1107	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R	>4096	64	32	1	SXT ^S , CST ^S	XDR
D988	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	16	256	1	CST ^S	XDR
D1013	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	256	64	0,5	CST ^S	XDR
Z838	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	32	128	1	TGC ^S , CST ^S	XDR
Z1213	CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	8	16	32	0,5	SAM ^S , AMK ^S , TGC ^S , CST ^S	MDR
Z766	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	128	32	64	0,5	CST ^S	XDR

Z881	PEN ^R , CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	16	256	1	CST ^S	XDR
K111	CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	128	16	0,25	CST ^S	XDR
K112	CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	128	32	1	CST ^S	XDR
K116	CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	16	128	0,5	CST ^S	XDR
K118	CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	256	32	16	0,5	CST ^S	XDR
K119	CB ^R , AG ^R , FQ ^R , SXT ^R	>4096	64	64	1	CST ^S	XDR

R – rezistentan, S – osetljiv, PEN – penicilini, CEF – cefalosporini, CB – karbapenemi, ATM – aztreonam, AG – aminoglikozidi, CHL – hloramfenikol, TC – tetraciklini, TGC – tigeciklin, FQ – fluorohinoloni, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol, AMK – amikacin, CIP – ciprofloksacin, MEM – meropenem, CST – kolistin, MIN – minociklin, TOB – tobramicin, SAM – ampicilin/sulbaktam, NET – netilmicin, GEN – gentamicin, TZP – piperacilin/tazobaktam, IPM – imipenem, NO – nije određeno.

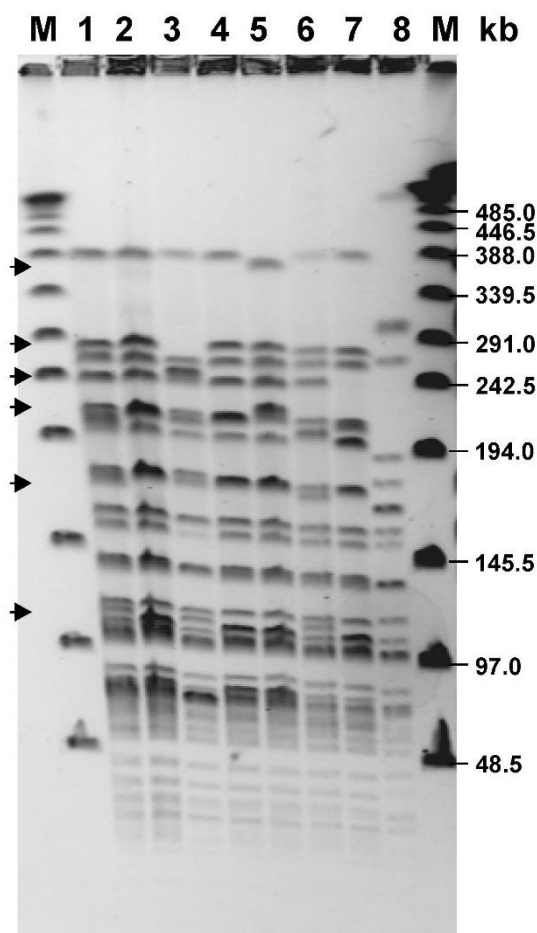
^aRezistencija na klase antibiotika određena primenom VITEK 2 sistema ili agar-difuzione metode.

^bOsetljivost na specifične antibiotike određena na osnovu rezultata VITEK 2 sistema, agar-difuzione metode i bujon-mikrodilucione metode. Granične vrednosti MIC i prečnika zona inhibicije tumačeni su na osnovu preporuka Evropskog komiteta za testiranje antimikrobne osetljivosti (eng. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, skr. EUCAST): AMK, S ≤8, R >16; CIP, S ≤0,06, R >1; MEM, S ≤2, R >8; CST, S ≤2, R >2.

4.3. Genotipizacija, analiza rezistoma i pan-genom kolistin-rezistentnih izolata *A. baumannii*

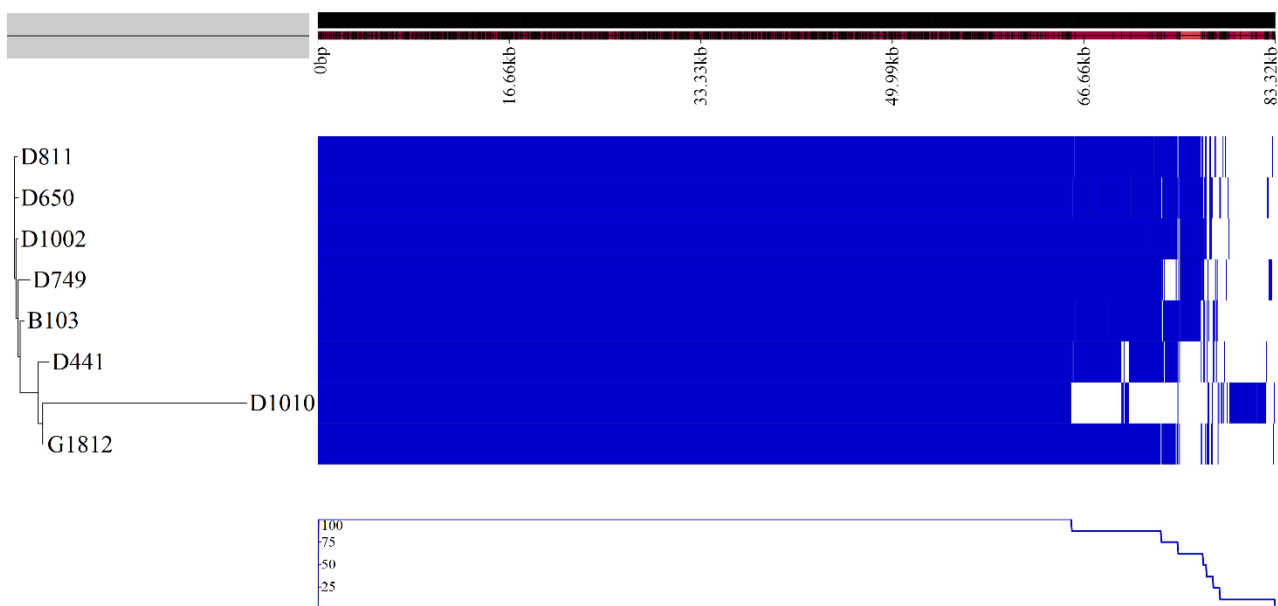
Ukupno osam kolistin-rezistentnih izolata *A. baumannii*, poreklom iz tri različite zdravstvene ustanove, identifikovano je primenom bujon-mikrodilucione metode. Čak šest izolata (D650, D749, D811, D1002, D441 i D1010) je poteklo iz KBC Dragiša Mišović, soj G1812 je izolovan u GAK – KCS, a jedan soj (B103) je izolovan iz uzorka pacijenta koji je ambulantno lečen.

PFGE analizom pokazano je da između sedam kolistin-rezistentnih izolata postoji visok nivo genetičke srodnosti (Slika 10). Uprkos tome, jedinstven obrazac traka bio je prisutan kod svih izolata. S druge strane, izolat D1010 ispoljio je znatno različit genetički profil. Primenom MLST analize (po Pasterovoj šemi) na sekvenciranim genomima je naknadno određeno da je sedam genetički povezanih izolata (B103, D650, D749, D811, D1002, G1812 i D441) pripadalo ST2 tipu sekvence, dok je D1010 izolat bio član ST492 tipa sekvence.



Slika 10. PFGE profili kolistin-rezistentnih izolata *A. baumannii* dobijeni *ApaI* digestijom. M- λ konkatemeri (New England Biolabs, SAD); 1-B103, 2-D650, 3-D749, 4-D811, 5-D1002, 6-G1812, 7-D441, 8-D1010. Strelice ukazuju na trake koje nisu prisutne kod svih izolata.

Analizom pan-genoma kolistin-rezistentnih izolata detektovano je prisustvo ukupno 4164 gena, od kojih je 79% (3278 gena) bilo prisutno kod svih izolata, odnosno grupisano je kao osnovni genom, čime je potvrđen visok nivo filogenetske srodnosti između izolata. Ostatak pan-genoma, tj. pomoćnički genom, sastojao se od 643 *shell* gena i 243 *cloud* gena. Analiza pan-genoma prikazana je na Slici 11, gde su izolati grupisani na osnovu sličnosti u sastavu pomoćničkih gena. Na osnovu ove povezanosti, može se videti da je struktura pomoćničkog genoma izolata D811, D650, D1002 i D749 veoma slična kao u slučaju B103 soja, izolovanog u ambulantnim uslovima, što ukazuje na mogućnost da su neki od srodnih bolničkih kolistin-rezistentnih izolata preneseni iz bolnice u životnu sredinu. Neznatno različit sastav pomoćničkog genoma primećen je kod D441 izolata, kao i G1812 izolata koji je potekao iz različite bolnice. Struktura genoma D1010 izolata je prema očekivanjima bila značajno različita od ostalih.



Slika 11. Vizualizacija pan-genoma kolistin-rezistentnih izolata zasnovana na osnovnim i pomoćničkim genima, koja prikazuje filogenetsku povezanost izolata prema plavim (prisutni) i belim (odsutni) fragmentima. Na dnu slike prikazan je procenat sojeva koji imaju svaki gen.

Analizom rezistoma pokazano je da pet izolata ST2 tipa (B103, D650, D749, D811 i D1002) sadrži identičan sastav gena odgovornih za rezistenciju na β -laktamske antibiotike, makrolide, aminoglikozide, hloramfenikol, tetracikline, sulfonamide i kvaternerna amonijumova jedinjenja (Slika 12). Vrlo sličan rezistom određen je i kod izolata G1812 i D441, sa razlikom da kod oba soja nije uočen gen koji kodira aminoglikozid-fosfotransferazu tipa VIa (*aph(3')-VIa*), a osim toga, D441 izolat nije sadržao ni gene koji kodiraju rezistenciju na makrolide (*msr(E)* and *mph(E)*) i aminoglikozid-metilazu (*amrA*). Genom D1010 izolata posedovao je različit sastav AME-kodirajućih gena, kao i dodatne gene koji doprinose rezistenciji na sulfonamide (*sul2*) i trimetoprim (*dfiA12*), međutim *catA1* gen koji kodira rezistenciju na hloramfenikol nije bio prisutan.

	<u>ML</u>		<u>AG</u>						<u>SXT</u>		<u>TC</u>	<u>CHL</u>	<u>BL</u>		<u>QAC</u>			
	<i>msr(E)</i>	<i>mph(E)</i>	<i>aac(3)-Ia</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA2</i>	<i>aph(3')-VIa</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>aph(6)-Id</i>	<i>armA</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA12</i>	<i>tet(B)</i>	<i>catA1</i>	<i>bla_{ADC-25}</i>	<i>bla_{OXA-23}</i>	<i>bla_{OXA-66}</i>	<i>qacE</i>
B103	●	●	●	●		●	●	●	●	●			●	●	●	●	●	●
D650	●	●	●	●		●	●	●	●	●			●	●	●	●	●	●
D749	●	●	●	●		●	●	●	●	●			●	●	●	●	●	●
D811	●	●	●	●		●	●	●	●	●			●	●	●	●	●	●
D1002	●	●	●	●		●	●	●	●	●			●	●	●	●	●	●
G1812	●	●	●	●			●	●	●	●			●	●	●	●	●	●
D441			●	●			●	●		●			●	●	●	●	●	●
D1010	●	●			●		●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●

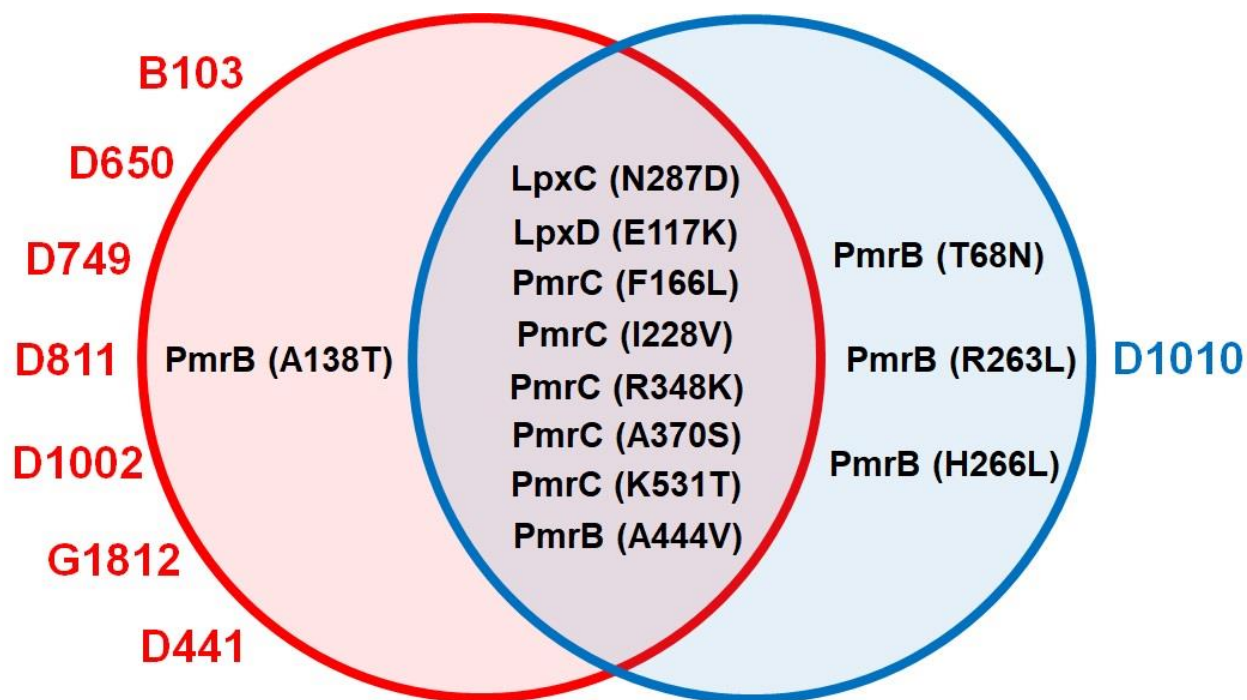
Slika 12. Rezistomi kolistin-rezistentnih *A. baumannii* sojeva. ML – makrolidi, AG – aminoglikozidi, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol, TC – tetraciklini, CHL – hloramfenikol, BL – β -laktami, QAC – kvaternerna amonijumova jedinjenja

4.4. Mehanizmi rezistencije na kolistin

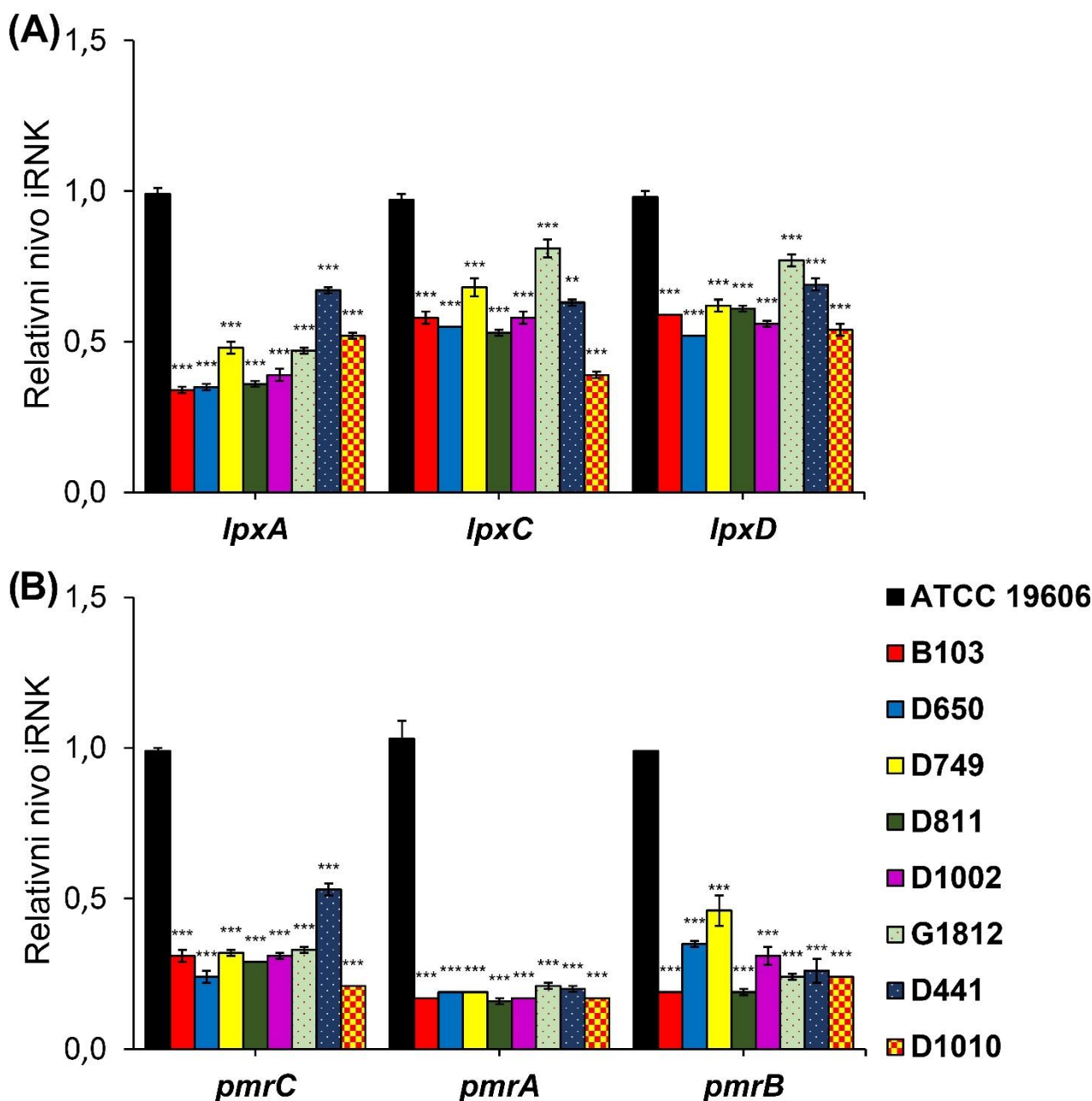
U cilju identifikacije molekularne osnove rezistencije na kolistin, genomi kolistin-rezistentnih izolata *A. baumannii* su analizirani na prisustvo aminokiselinskih modifikacija, tj. mutacija, u proteinima povezanim sa rezistencijom na kolistin (LpxA, LpxC, LpxD, PmrC, PmrA i PmrB), a ispitan je i nivo ekspresije gena koji kodiraju ove proteine.

Modifikacije u proteinima LpxA i PmrA, u poređenju sa kolistin-osetljivim *A. baumannii* ATCC 19606 sojem, nisu detektovane. Sa druge strane, nekoliko mutacija je detektovano u okviru LpxC, LpxD, PmrC i PmrB proteina (Slika 13). Identična kompozicija aminokiselinskih supstitucija u okviru ovih proteina bila je prisutna kod svih ST2 izolata. Slične mutacije bile su prisutne i kod ST492 izolata D1010, uz razliku jedino u okviru PmrB proteina. Svi ST2 izolati sadržali su A444V i A138T supstitucije u ovom proteinu, dok su A444V, T68N, R263L i H266L supstitucije bile prisutne u PmrB izolata D1010. Gen *eptA* detektovan je kod izolata B103, G1812 i D1010, međutim bez prisustva IS elemenata uzvodno od kodirajuće sekvence, a *mcr* geni nisu pronađeni ni u jednom od testiranih izolata.

Analizom genske ekspresije pokazano je da su nivoi iRNK *lpxA*, *lpxC* i *lpxD* gena bili značajno smanjeni kod svih kolistin-rezistentnih izolata u poređenju sa ekspresijom ovih gena kod kolistin-osetljivog *A. baumannii* ATCC 19606 soja (Slika 14). Pri tome, različiti izolati ispoljili su različit stepen redukcije ekspresije ovih gena. Transkripcija *pmrC*, *pmrA* i *pmrB* gena takođe je bila nishodno regulisana kod svih testiranih izolata.



Slika 13. Aminokiselinske supstitucije u okviru proteina povezanih sa rezistencijom na kolistin, identifikovane kod kolistin-rezistentnih izolata komparativnom analizom sa *A. baumannii* ATCC 19606, predstavljene u obliku Venovog dijagrama.



Slika 14. Analiza transkripcije gena povezanih sa rezistencijom na kolistin kod kolistin-rezistentnih izolata i kolistin osetljivog ATCC 19606 soja: (A) Relativna ekspresija *lpxA*, *lpxC* i *lpxD* gena, (B) Relativna ekspresija *pmrC*, *pmrA* i *pmrB* gena. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

4.5. Otpornost kliničkih izolata *A. baumannii* na baktericidno dejstvo antiseptika i topikalnih antibiotika

Primenom *Time-kill* metode ispitana je sposobnost perzistencije izolata *A. baumannii* iz rane u fiziološkom rastvoru, 3% bornoj kiselini, 0,1% etakridin laktatu i 1% klindamicin (Tabele 9 i 10). Svi izolati su pokazali sposobnost da prežive u fiziološkom rastvoru nakon 24 h inkubacije, uz neznatno smanjenje broja naraslih kolonija. Uzimajući u obzir i rezultate za standardni soj *A. baumannii* ATCC 19606, početni inokulum koji je iznosio $\sim 10^6$ CFU/mL, broj kolonija se smanjio na $4,77 \times 10^5$ CFU/mL nakon 2 h inkubacije, odnosno na $1,82 \times 10^5$ CFU/mL nakon 24 h inkubacije u proseku. Pri tome, soj Z1213 je čak pokazao i sposobnost rasta u fiziološkom rastvoru, jer je nakon 24 h izmereno prisustvo $4,79 \times 10^6$ CFU/mL. Kada je u pitanju 3% borna kiselina, svi sojevi su preživeli inkubaciju nakon 2 h, a samo tri soja (D755, D749 i D811) nisu preživela nakon 24 h.

Broj kolonija (izuzimajući rezultate sojeva koji nisu porasli nakon 24 h) se i u ovom slučaju neznatno smanjio, od $1,12-1,22 \times 10^5$ CFU/mL u proseku nakon 24 h, odnosno 2 h inkubacije. Čak tri soja (ATCC 19606, B101 i B102) su pokazala tendenciju rasta u 3% bornoj kiselini jer je detektovan veći broj kolonija nakon 24 h inkubacije u odnosu na 2 h inkubacije. Baktericidni efekat 0,1% etakridin laktata i 1% klindamicina, s druge strane, bio je mnogo efikasniji. Ukupno osam izolata uspelo je da preživi 2 h inkubacije u 0,1% etakridin laktatu, ali uz znatno smanjen broj naraslih kolonija, $3,60 \times 10^2$ CFU/mL u proseku, a samo je soj Z94 preživeo 24 h inkubacije. Inkubaciju tokom 2 h u 1% rastvoru klindamicina preživelo je pet sojeva, uz prosečnu vrednost $1,78 \times 10^2$ CFU/mL, a nijedan soj nije preživeo nakon 24 h. Treba imati u vidu da je granica detekcije prisustva kolonija bila 10^2 CFU/mL, i da na mestima gde nije uočen rast kolonija, moguće da su sojevi perzistirali u gustini populacije ispod granice detekcije.

Iz kolonija koje su preživele inkubaciju u fiziološkom rastvoru, odnosno antisepticima ili 1% klindamicinu, dodatno je ispitan nivo produkcije biofilma i upoređen sa pozitivnom kontrolom (produkcija biofilma nakon inkubacije u TSBG), kako bi se procenio uticaj biofilma na perzistenciju sojeva. Pravilnost u vidu povećane ili smanjene produkcije biofilma kod preživelih kolonija nije primećena. Neke kolonije su ispoljile jako stimulisanu produkciju biofilma, npr. u slučaju soja Z94 nakon inkubacije u 3% bornoj kiselini tokom 24 h, ili kod soja B101 nakon inkubacije u 1% klindamicinu tokom 2 h, gde je zabeležena tri puta veća količina proizvedenog biofilma u poređenju sa kontrolom. Kod drugih kolonija, produkcija je bila jako inhibirana, npr. u slučaju soja D749 nakon inkubacije u 1% klindamicinu tokom 2 h, nivo biofilma je bio pet puta manji u odnosu na kontrolu. Jedina pravilnost koja se može uočiti jeste da su svi sojevi koji su pokazali sposobnost rasta u fiziološkom rastvoru (Z1213), odnosno 3% bornoj kiselini (ATCC 19606, B101 i B102) imali povećanu sposobnost produkcije biofilma u tim slučajevima.

Tabela 9. Rast i produkcija biofilma kliničkih izolata *A. baumannii* nakon inkubacije u fiziološkom rastvoru i 3% bornoj kiselini u odnosu na pozitivnu kontrolu (TSBG). Sivim su obeležena polja gde je postignuto mikrobicidno dejstvo (\log_{10} CFU/mL <2).

Soj	Fiziološki rastvor				3% borna kiselina			
	2 h		24 h		2 h		24 h	
	Log CFU/mL	Biofilm (%)	Log CFU/mL	Biofilm (%)	Log CFU/mL	Biofilm (%)	Log CFU/mL	Biofilm (%)
ATCC 19606	5,54	67,37	5,07	201,81	4,02	119,03	5,91	214,50
Z6228	5,51	136,31	4,87	170,32	5,10	56,99	3,82	22,79
B101	5,86	160,97	4,92	191,58	4,92	145,92	6,38	216,84
B102	5,26	132,51	4,22	157,64	3,88	38,49	5,75	140,60
B103	6,26	94,65	5,00	91,00	6,05	80,96	4,22	119,56
Z94	6,32	135,61	5,40	137,56	5,22	191,71	5,22	328,78
G1108	5,43	63,25	5,37	74,48	5,00	82,91	4,70	110,74
D710	5,71	45,53	5,39	41,07	5,02	35,16	4,07	39,48
D755	5,33	106,24	5,19	140,79	5,23	37,67	<2	/ ^a
D749	5,61	79,66	5,25	104,37	4,96	53,11	<2	/
D811	5,33	93,73	5,44	72,77	5,33	79,70	<2	/
Z1213	5,93	85,18	6,68	132,27	5,91	121,64	5,54	147,53
Z766	5,73	74,84	5,59	72,98	5,74	66,15	4,87	72,67

^aZbog limita detekcije od \log_{10} CFU/mL = 2, nije zabeležen rast kolonija, tako da nije bilo moguće ispitati produkciju biofilma.

Tabela 10. Rast i produkcija biofilma kliničkih izolata *A. baumannii* nakon inkubacije u 0,1% etakridin laktatu i 1% klindamicinu u odnosu na pozitivnu kontrolu (TSBG). Sivim su obeležena polja gde je postignuto mikrobicidno dejstvo (\log_{10} CFU/mL <2).

Soj	0,1% etakridin laktat				1% klindamicin			
	2 h		24 h		2 h		24 h	
	Log CFU/mL	Biofilm (%)	Log CFU/mL	Biofilm (%)	Log CFU/mL	Biofilm (%)	Log CFU/mL	Biofilm (%)
ATCC 19606	2,92	70,69	<2	/	<2	/	<2	/
Z6228	3,46	60,20	<2	/	<2	/	<2	/
B101	<2	/ ^a	<2	/	2,52	312,41	<2	/
B102	<2	/	<2	/	<2	/	<2	/
B103	2,52	138,20	<2	/	2,12	80,53	<2	/
Z94	2,26	223,41	2,22	211,71	2,37	256,62	<2	/
G1108	2,52	92,92	<2	/	<2	/	<2	/
D710	<2	/	<2	/	<2	/	<2	/
D755	2,05	57,96	<2	/	<2	/	<2	/
D749	2,07	61,01	<2	/	2,12	19,84	<2	/
D811	2,65	110,07	<2	/	<2	/	<2	/
Z1213	<2	/	<2	/	<2	/	<2	/
Z766	<2	/	<2	/	2,12	45,63	<2	/

^aZbog limita detekcije od \log_{10} CFU/mL = 2, nije zabeležen rast kolonija, tako da nije bilo moguće ispitati produkciju biofilma.

4.6. Produkcija biofilma kliničkih izolata *A. baumannii* pri različitim uslovima

Nivo produkcije biofilma nakon inkubacije u TSBG na 37 °C tokom 24 h izmeren je za sve sojeve *A. baumannii* obuhvaćene u okviru ove disertacije. Na osnovu rezultata u obliku izmerenih vrednosti OD na 490 nm, poteklih od 96% etanolom ekstrahovanog 0,5% rastvora safranina kojim su biofilmovi obojeni, izvršena je klasifikacija sojeva u tipove biofilmskih proizvođača (SP, MP, WP, ili NP) (Tabela 11). Čak 20 (45,45%) sojeva (uključujući ATCC 19606) je proizvelo velike količine biofilma i klasifikovano je u SP tip. U umerene proizvođače, MP tip, klasifikovano je 17 (38,64%) sojeva, 6 (13,64%) sojeva je proizvelo male količine biofilma (WP tip), a svega jedan izolat (Z881) nije proizvedio biofilm (NP tip). Najveće količine biofilma u proseku su proizveli sojevi izolovani sa aspiracionog (srednja $OD_{490} = 0,481 \pm 0,208$) i centralnog venskog katetera ($OD_{490} = 0,396$). Od uzoraka humanog porekla, sojevi izolovani iz brisa rane u proseku su proizveli najviše biofilma (srednja $OD_{490} = 0,383 \pm 0,116$), zatim sojevi iz urinokulture (srednja $OD_{490} = 0,360 \pm 0,057$) i uzoraka donjeg respiratornog trakta (srednja $OD_{490} = 0,326 \pm 0,047$), a najmanje biofilma su proizveli sojevi izolovani iz hemokulture (srednja $OD_{490} = 0,290 \pm 0,036$). Sojevi SP i MP tipa su pokazali veći stepen rezistencije na amikacin i ciprofloksacin u poređenju sa sojevima WP i NP tipa. Izračunati MIC_{50} za SP i MP sojeve prema amikacinu i ciprofloksacinu bili su >4096 i 64 $\mu\text{g/mL}$, respektivno, u odnosu na 256 i 32 $\mu\text{g/mL}$ u slučaju WP i NP sojeva. Osim toga, sojevi koji su proizveli najviše količine biofilma (SP tip) bili su u proseku najmanje osetljivi na meropenem ($MIC_{50} = 128 \mu\text{g/mL}$). Od kolistin-rezistentnih sojeva, 5 su pripadali SP tipu, 2 MP tipu, a 1 WP tipu, međutim, MIC_{50} je bio najveći u slučaju sojeva MP tipa ($MIC_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 11. Nivo proizvedenog biofilma nakon inkubacije u TSBG i klasifikacija u različite tipove proizvođača biofilma.

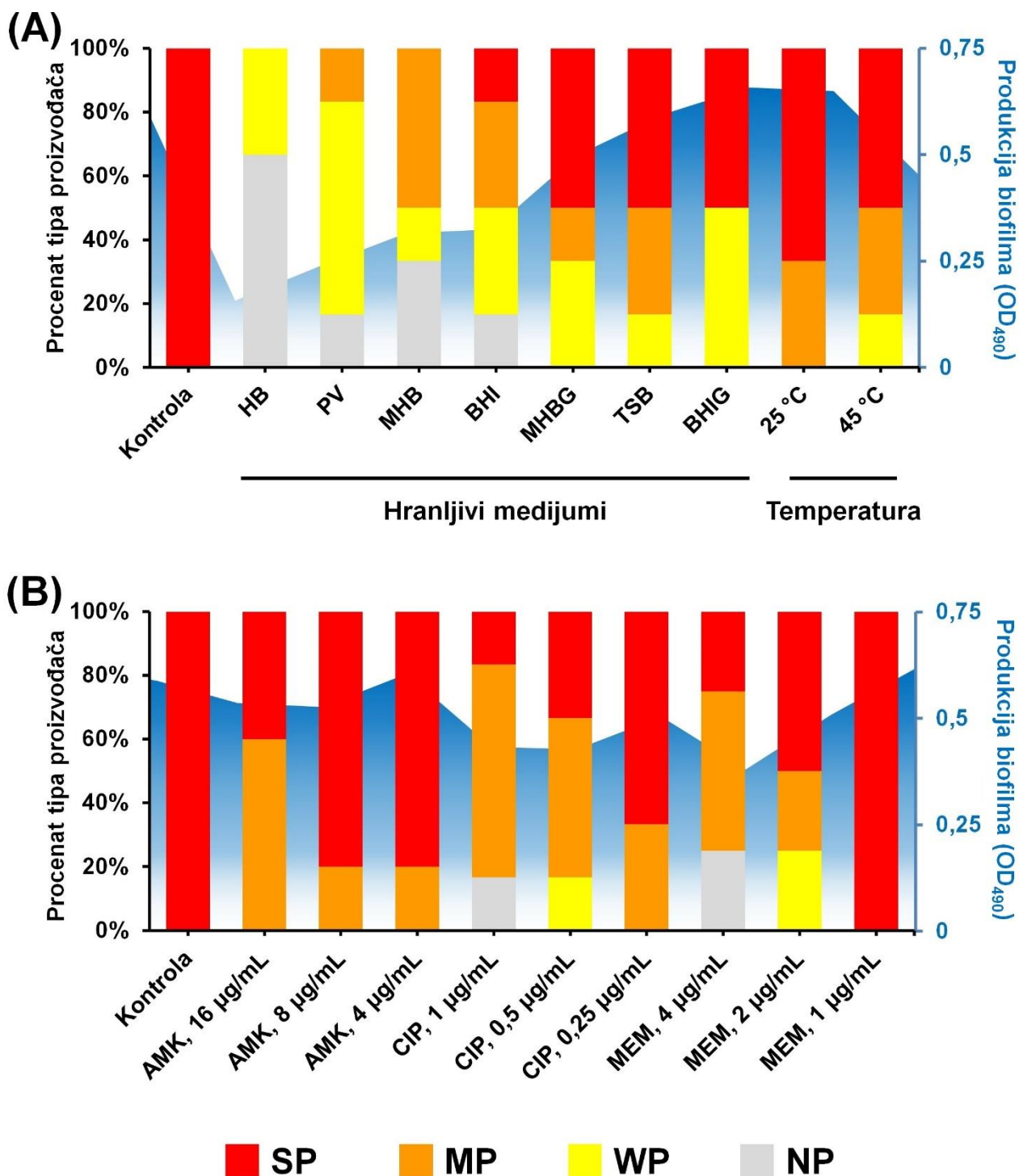
Soj	Produkcija biofilma (OD_{490})	Tip proizvođača biofilma ^a
ATCC 19606	0,493	SP
Z6142	0,260	MP
Z6228	0,208	WP
Z6235	0,193	WP
Z6419	0,508	SP
Z6420	0,212	MP
Z6853	0,316	MP
Z6879	1,072	SP
Z7085	0,296	MP
B101	0,361	SP
B102	0,210	WP
B103	0,426	SP
Z94	0,486	SP

D345	0,323	MP
D371	0,455	SP
D441	0,171	WP
G1108	0,343	MP
G1812	0,471	SP
D423	0,311	MP
D650	0,306	MP
D613	0,574	SP
D710	0,405	SP
D755	0,418	SP
D749	0,463	SP
D811	0,396	SP
D809	0,367	SP
D812	0,355	SP
D863	0,319	MP
D746	0,290	MP
D1010	1,546	SP
D1002	0,259	MP
D989	0,377	SP
D1107	0,337	MP
D988	0,485	SP
D1013	0,251	MP
Z838	0,198	WP
Z1213	0,459	SP
Z766	0,205	WP
Z881	0,118	NP
K111	0,266	MP
K112	0,410	SP

K116	0,225	MP
K118	0,271	MP
K119	0,346	MP

^aSP – izraziti proizvođač, MP – umereni proizvođač, WP – slab proizvođač, NP – ne proizvodi biofilm. Kriterijum za klasifikaciju bio je specifičan za svaki soj ponaosob, zavisno od serije inkubacije i vrednosti OD slepe probe.

Ukupno pet kliničkih izolata SP tipa (B103, Z94, D371, G1108 i Z6879) odabrano je za ispitivanje produkcije biofilma pri različitim uslovima. Rezultati su pokazali da inkubacija u različitim hranljivim medijumima značajno utiče na količinu proizvedenog biofilma (Slika 15A). Naročito je suplementacija TSB, MHB i BHI bujona glukozom do 1% stimulisala produkciju biofilma. U proseku, sojevi *A. baumannii* su proizveli za 41,54% više biofilma nakon inkubacije u prisustvu viška glukoze. Inkubacija u BHIG prouzrokovala je prosečno najveće količine proizvedenog biofilma (za 11,34% više u odnosu na TSBG). Interesantno, kod tri soja (B103, Z94 i G1108) produkcija biofilma je bila nishodno regulisana nakon inkubacije u ovom hranljivom medijumu, i ti sojevi su reklasifikovani u WP tipove. Od nesuplementiranih medijuma, najjača produkcija zabeležena je u TSB, uz neznatnu razliku u odnosu na TSBG, a za 45,55 i 46,89% jača u poređenju sa nesuplementiranim BHI bujonom, odnosno MHB. Najmanja produkcija biofilma zabeležena je u hranljivom bujonu i peptonskoj vodi, dva medijuma koja sadrže visok procenat peptona, bez glukoze. Što se tiče inkubacije pri različitim temperaturama, u proseku sojevi su najviše biofilma proizveli na sobnoj temperaturi (za 9,81% više u odnosu na 37 °C) i pored blagog smanjenja produkcije kod B103 i Z94 sojeva uz reklasifikaciju u MP tipove (Slika 15A). Najmanja produkcija zabeležena je na 45 °C (za 23,35% manje u odnosu na 37 °C).



Slika 15. Uticaj različitih uslova inkubacije (A) i subinhibitivnih koncentracija antibiotika (B) na produkciju biofilma šest sojeva *A. baumannii* SP tipa, izražen kroz promene tipova biofilmskih proizvođača, kao i nivo produkcije biofilma. AMK – amikacin, CIP – ciprofloksacin, MEM – meropenem

Na istih šest sojeva *A. baumannii* SP tipa, ispitana je produkcija biofilma i pod uticajem subinhibitivnih koncentracija antibiotika iz tri različite klase (amikacin, ciprofloksacin i meropenem). Značajno smanjenje ($P < 0,05$) produkcije biofilma u proseku postignuto je pod uticajem ciprofloksacina u koncentracijama 0,5 (za 27,75%) i 1 µg/mL (za 26,73%), kao i meropenema u koncentraciji 4 µg/mL (za 35,57%). Uticaj na produkciju biofilma se međutim pokazao soj-specifičnim, jer je u slučaju oba antibiotika produkcija biofilma bila stimulisana kod

soja D371, za razliku od ostalih testiranih sojeva. Inkubacija u prisustvu ciprofloksacina najviše je inhibirala produkciju biofilma Z94 soja, koji je reklasifikovan u NP tip, odnosno WP tip, pod uticajem 1, odnosno 0,5 µg/mL (Slika 15B). S druge strane, soj Z6879 je reklasifikovan u NP tip, odnosno WP tip, nakon inkubacije u prisustvu 4 i 2 µg/mL meropenema, respektivno. Inkubacija pod uticajem subinhibitornih koncentracija amikacina nije značajno promenila nivo proizvedenog biofilma.

4.7. Strukture, kristaliničnost i termalne osobine sintetisanih halkona

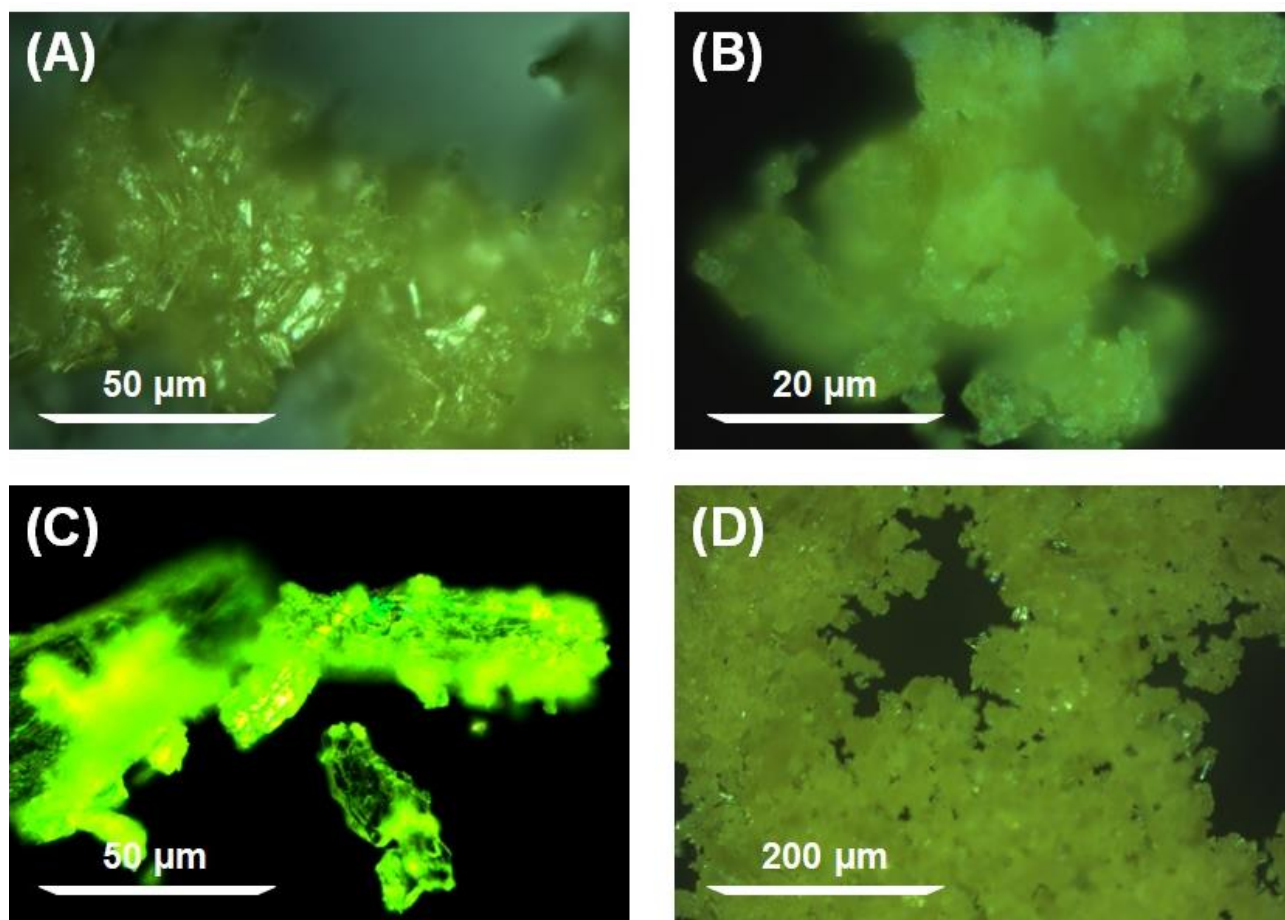
Derivati 2'-hidroksihalkona o-OCH₃, p-CF₃, 2,6-OCH₃ i p-F-o-CH₃ sintetisani su primenom bazno-katalizovane *Claisen-Schmidt* kondenzacije, u obliku žutih, kristalnih praškova (Slike 16 i 17). Strukture su potvrđene pomoću FTIR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR i ESI-MS tehnika (slike NMR spektara nalaze se u *Prilozima*, str. 184-187).

- **o-OCH₃** (C₁₆H₁₃O₃): (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-metoksifenil)prop-2-en-1-on, žut kristalan prašak, prinos: 89,05%, Tt = 101,4 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 12,93 (s, -OH, 1H); 8,25 (d, *J*=15,6, a, 1H); 7,94 (d, *J*=8, ArH-C(6'), 1H); 7,81 (d, *J*=15,6, b, 1H); 7,66 (d, *J*=8, ArH-C(6), 1H); 7,51 (t, *J*=8, ArH-C(4'), 1H); 7,43 (t, *J*=8, ArH-C(4), 1H); 7,03-6,92 (m, ArH-C(3), ArH-C(3'), ArH-C(5), ArH-C(5'), 4H); 3,95 (s, -CH₃, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 194,33; 163,61; 159,07; 141,14; 136,13; 132,18; 129,71; 129,66; 123,71; 120,87; 120,83; 120,24; 118,74; 118,57; 111,35; 55,62. ESI-MS: [M+H]⁺ *m/z* 253,088;
- **p-CF₃** (C₁₆H₁₁F₃O₂): (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-[4-(trifluorometil)fenil]prop-2-en-1-on, žut kristalan prašak, prinos: 25,58%, Tt = 98,35 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 12,65 (s, -OH, 1H); 7,96-7,92 (m, ArH-C(6'), 2H); 7,78-7,67 (m, ArH-C(2), ArH-C(3), ArH-C(5), ArH-C(6), 5H); 7,55 (t, *J*=8, ArH-C(4'), 1H); 7,06 (d, *J*=8, ArH-C(3'), 1H); 6,99 (t, *J*=8, ArH-C(5'), 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 193,34; 163,71; 143,31; 136,76; 129,67; 128,69; 126,02; 125,98; 122,58; 119,87; 118,99; 118,79. ESI-MS: [M+H]⁺ *m/z* 290,095.
- **2,6-OCH₃** (C₁₇H₁₆O₄): (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(2,6-dimetoksifenil)prop-2-en-1-on, žut kristalan prašak, prinos: 86,72%, Tt = 116,24 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 12,46 (s, -OH, 1H); 8,42 (d, *J*=16, b, 1H); 8,16 (d, *J*=16, a, 1H); 7,92 (d, *J*=8, ArH-C(6'), 1H); 7,49 (t, *J*=8, ArH-C(4'), 1H); 7,34 (t, *J*=8, ArH-C(5), 1H); 7,02 (d, *J*=8, ArH-C(3), 1H); 6,94 (t, *J*=7,6, ArH-C(4), 1H); 6,61 (d, *J*=8, ArH-C(3'), ArH-C(5'), 2H); 3,94 (s, 2-CH₃, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 195,44; 163,57; 160,63; 136,46; 135,78; 132,05; 129,79; 122,75; 120,54; 118,59; 118,43; 112,82; 103,82; 55,96; ESI-MS: [M+H]⁺ *m/z* 282,900.
- **p-F-o-CH₃** (C₁₆H₁₃FO₂): (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(4-fluoro-2-metilfenil)prop-2-en-1-on, žut kristalan prašak, prinos: 93,15%, Tt = 94,52 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 12,79 (s, -OH, 1H); 7,92 (d, *J*=8, ArH-C(6'), 1H); 7,71 (d, *J*=8, ArH-C(4'), 1H); 7,54 (d, *J*=16, a, 1H); 7,05 (d, *J*=8, ArH-C(6), 1H); 6,98-6,93 (m, ArH-C(3), ArH-C(3'), ArH-C(5), ArH-C(5'), 4H); 2,50 (s, -CH₃, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 193,60; 163,66; 141,85; 136,42; 129,90; 129,62; 128,64; 128,55; 120,93; 120,00; 118,87; 118,96; 117,94; 117,63; 113,78; 113,56; 19,96. ESI-MS: [M+H]⁺ *m/z* 254,900.

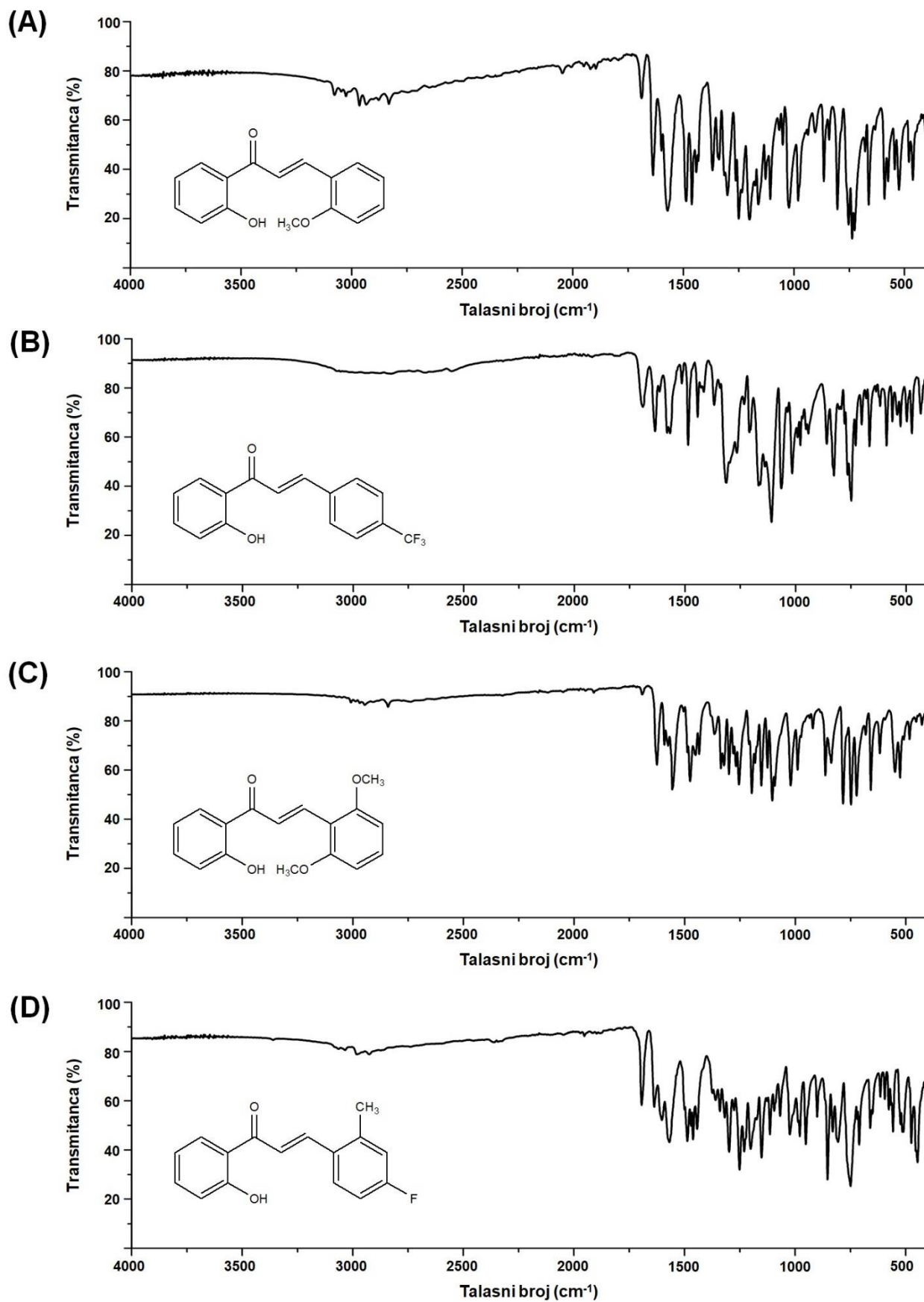


Slika 16. Makroskopski izgled halkona na primeru p-CF₃ (žut, kristalan prašak).

Rezultati FTIR analize prikazani su na Slici 18. Kod svih spektara može se uočiti vrlo mali broj pikova u regionu viših talasnih brojeva (iznad 3000 cm^{-1}), gde se karakteristično javljaju istežuće vibracije potekle od O-H veza što ukazuje da su uzorci bili suvi sa vrlo malom količinom vezane vode. U regionu nižih talasnih brojeva ($1700\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) prisutan je bio veliki broj pikova srednjeg i jakog intenziteta, poteklih od raznih vrsta savijajućih i ljućajućih vibracija, kao i C-C i C-O istežućih vibracija. Pored toga, u oblasti $624\text{-}615\text{ cm}^{-1}$ identifikovane su istežuće vibracije koje su indikativne za prisustvo fluoro funkcionalnih grupa kod jedinjenja p-CF₃ i p-F-o-CH₃. Metoksi funkcionalne grupe, specifične za jedinjenja o-OCH₃ i 2,6-OCH₃ detektovane su u oblasti $2851\text{-}2832\text{ cm}^{-1}$, dok je metil grupa p-F-o-CH₃ izazvala pojavu istežućih vibracija na 2926 cm^{-1} . Hidroksilne funkcionalne grupe uzoraka detektovane su u vidu pika malog intenziteta u oblasti $3084\text{-}3009\text{ cm}^{-1}$. Trake indikativne za karbonilnu grupu identifikovane su u regionu $1637\text{-}1626\text{ cm}^{-1}$, odnosno ispod 1700 cm^{-1} , što je karakteristično za nezasićene ketone i može poslužiti kao potvrda veze između A i B aromatičnih prstena. Prisustvo α,β -nezasićene veze može se potvrditi činjenicom da je traka C=C veze, koja tipično apsorbira IR zračenje u regionu $1660\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, pomerena naniže uz povećani intenzitet kod svih uzoraka, usled konjugacije sa karbonilnom grupom. Assignacija većine traka prikazana je u Tabeli 12.



Slika 17. Mikroskopski izgled halkona (digitalne fotografije pri različitim uvećanjima): (A) o-OCH₃, (B) p-CF₃, (C) 2,6-OCH₃, (D) p-F-o-CH₃.

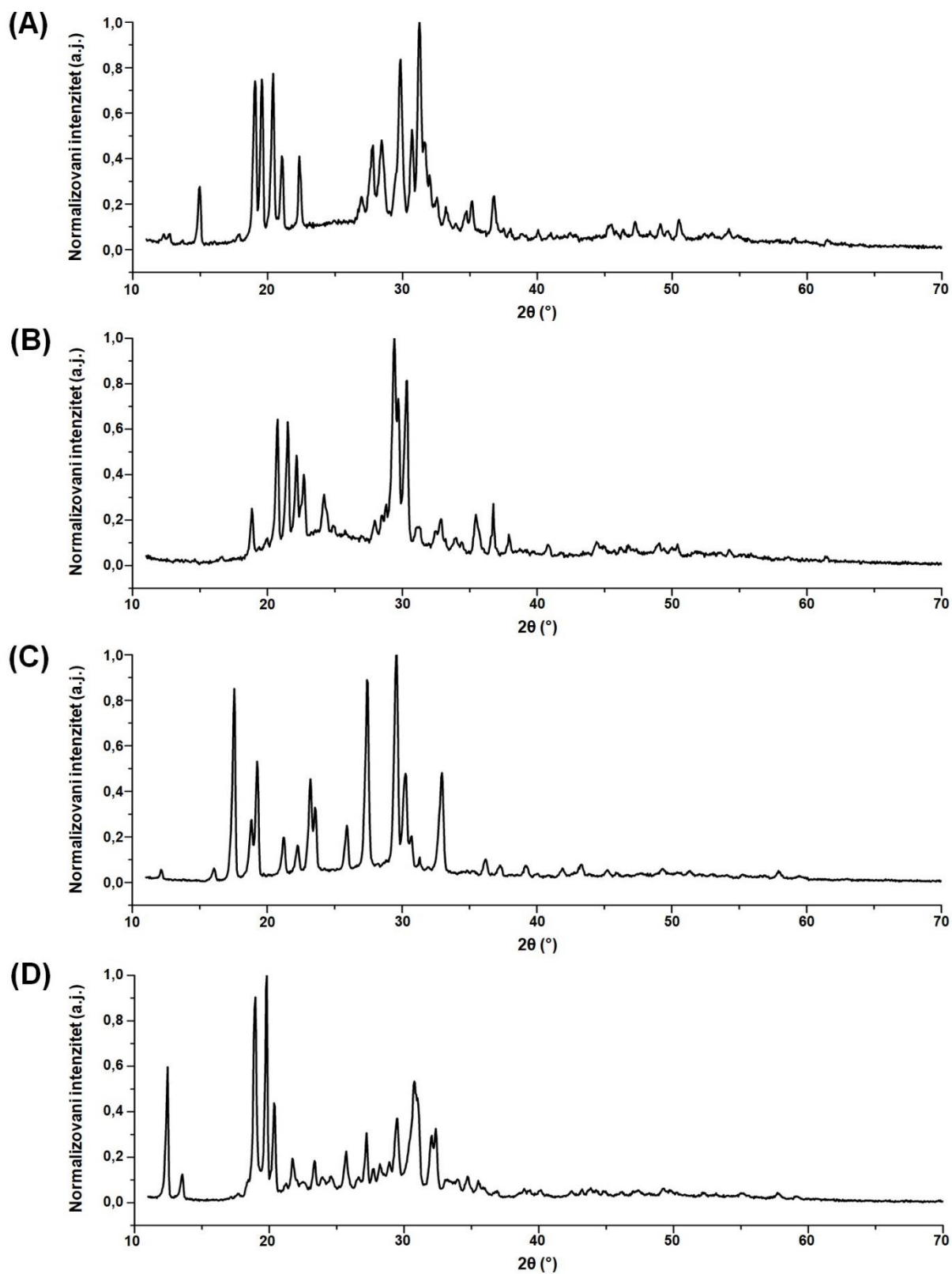


Slika 18. FTIR spektri halkona: (A) o-OCH₃, (B) p-CF₃, (C) 2,6-OCH₃, (D) p-F-o-CH₃.

Tabela 12. Asignacija traka i njihove vrednosti talasnih brojeva iz snimljenih FTIR spektara halkona.

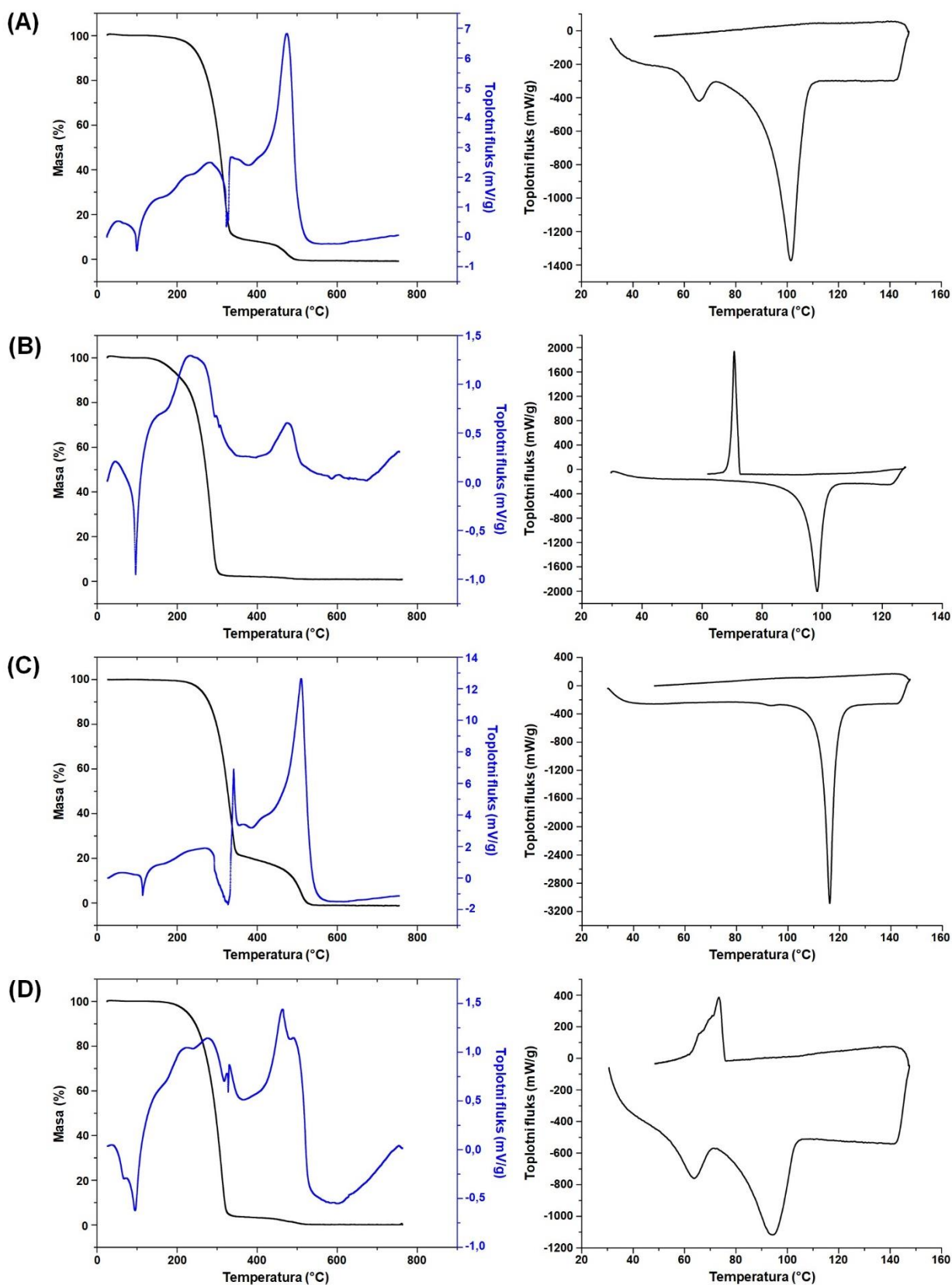
Asignacija	Talasni broj (cm ⁻¹)			
	o-OCH₃	p-CF₃	2,6-OCH₃	p-F-o-CH₃
O-H istežuće vibracije	3078	3078	3009	3084
Aromatična C-H istežuće vibracije	2965-2934 asim./sim.	~2987 asim./sim.	2969-2946 asim./sim.	~2985 asim./sim.
Metil C-H istežuće vibracije	/	/	/	2926
Metoksi C-H istežuće vibracije	2832	/	2851 i 2841	/
Karbonilna C=O istežuće vibracije	1637	1635	1626	1637
C=C istežuće vibracije	1599 i 1571	1616 i 1567	1593-1556	1603 i 1569
C-C istežuće vibracije	1487-1301	1486-1298	1488-1300	1488-1299
Aromatična C-C-C istežuće vibracije	1250	1233	1254	1252
C-O istežuće vibracije	1201-981	1209-979	1197-990	1201-980
C-H savijajuće vibracije	865-662	859-667	864-659	854-661
Aromatična C-H savijajuće vibracije	nekoliko pikova ~730	nekoliko pikova ~749	nekoliko pikova ~748	nekoliko pikova ~749
C-F istežuće vibracije	/	624-618	/	615
C-C-C ljuļajuće vibracije	591-400	589-400	549-400	595-400

Kristalno stanje uzoraka halkona ispitano je primenom XRD analize i optičke mikroskopije. Snimljeni difraktogrami (Slika 19) ukazuju na prisustvo velikog broja pikova jakog intenziteta. Najintenzivnije refleksije upadnog zračenja zabeležene su na uglovima 2θ u rasponu 17,54-23,28, odnosno 27,61-33,25 stepeni. Ovi rezultati ukazuju na prisustvo visoko kristalne strukture, što se može videti i iz snimljenih mikroskopskih slika (Slika 17).



Slika 19. Difraktogrami halkona: (A) *o*-OCH₃, (B) *p*-CF₃, (C) 2,6-OCH₃, (D) *p*-F-*o*-CH₃.

Termalne analize uzoraka halkona sprovedene su primenom TGA-DTA analize radi određivanja termalne stabilnosti i DSC analize radi dodatnog ispitivanja faznih promena u okviru regiona termalne stabilnosti (Slika 20). Rezultati TGA-DTA analize ukazali su da su svi uzorci bili stabilni do 200 °C. Nakon toga, zavisno od kompozicije funkcionalnih grupa, do naglog gubitka mase došlo je u opsegu 200-270 °C. Najmanje stabilnim pokazao se halkan p-CF₃ sa tri atoma fluora koji je izgubio 50% mase pri temperaturi od 269,79 °C. Prisustvo metoksi grupa pokazalo se da doprinosi termalnoj stabilnosti, pošto je najstabilniji bio 2,6-OCH₃ halkan sa dve metoksi grupe koji je 50% mase izgubio na 323,65 °C, a odmah posle njega o-OCH₃ halkan sa jednom metoksi grupom (303,51 °C – gubitak 50% mase). Osim toga, kod uzoraka o-OCH₃ i 2,6-OCH₃ halkona, nakon inicijalnog naglog pada mase podizanjem temperature do 335-350 °C, masa se pri višim temperaturama održala do 15-20% od početne mase, a pojava dodatnog endotermnog pika DTA signalne linije na oko 325 °C indikativna je za prisustvo dodatne temperature topljenja. Dekompozicija ostataka proizvoda (sagorevanje) odvila se na 476,35 °C u slučaju o-OCH₃, odnosno 508,67 °C u slučaju 2,6-OCH₃, što se može videti u obliku intenzivnih DTA pikova egzotermnog karaktera, koji odgovaraju procesu oksidacije. Ovaj pik je daleko manje izražen kod p-CF₃ halkona. Na DSC dijagramima se jasno može videti prisustvo endotermnog pika jakog intenziteta u regionu 94-117 °C koji odgovara temperaturi topljenja (skr. Tt) uzoraka. Kod uzoraka o-OCH₃ i p-F-o-CH₃ halkona zabeležen je još jedan endotermni događaj na nižoj temperaturi između 63-66 °C koji verovatno potiče od gubitka adsorbovane vlage. Alternativno, pošto u ovom regionu TGA signal nije pokazao smanjenje mase, pikovi mogu biti posledica promena u strukturi i uređenju molekularne konformacije pod uticajem intramolekularnih sila. Dodatno, u oblasti 70-74 °C kod dva halkona sa fluoro grupama zabeleženi su egzotermni događaji, koji ukazuju na proces kristalizacije.



Slika 20. Termalna analiza uzoraka halkona. Levo na slici su prikazani TGA-DTA dijagrami (crna linija odgovara TGA signalu, plava linija odgovara DTA signalu), desno DSC dijagrami: (A) o-OCH₃, (B) p-CF₃, (C) 2,6-OCH₃, (D) p-F-o-CH₃.

4.8. Antimikrobna aktivnost halkona protiv kliničkih izolata *A. baumannii*

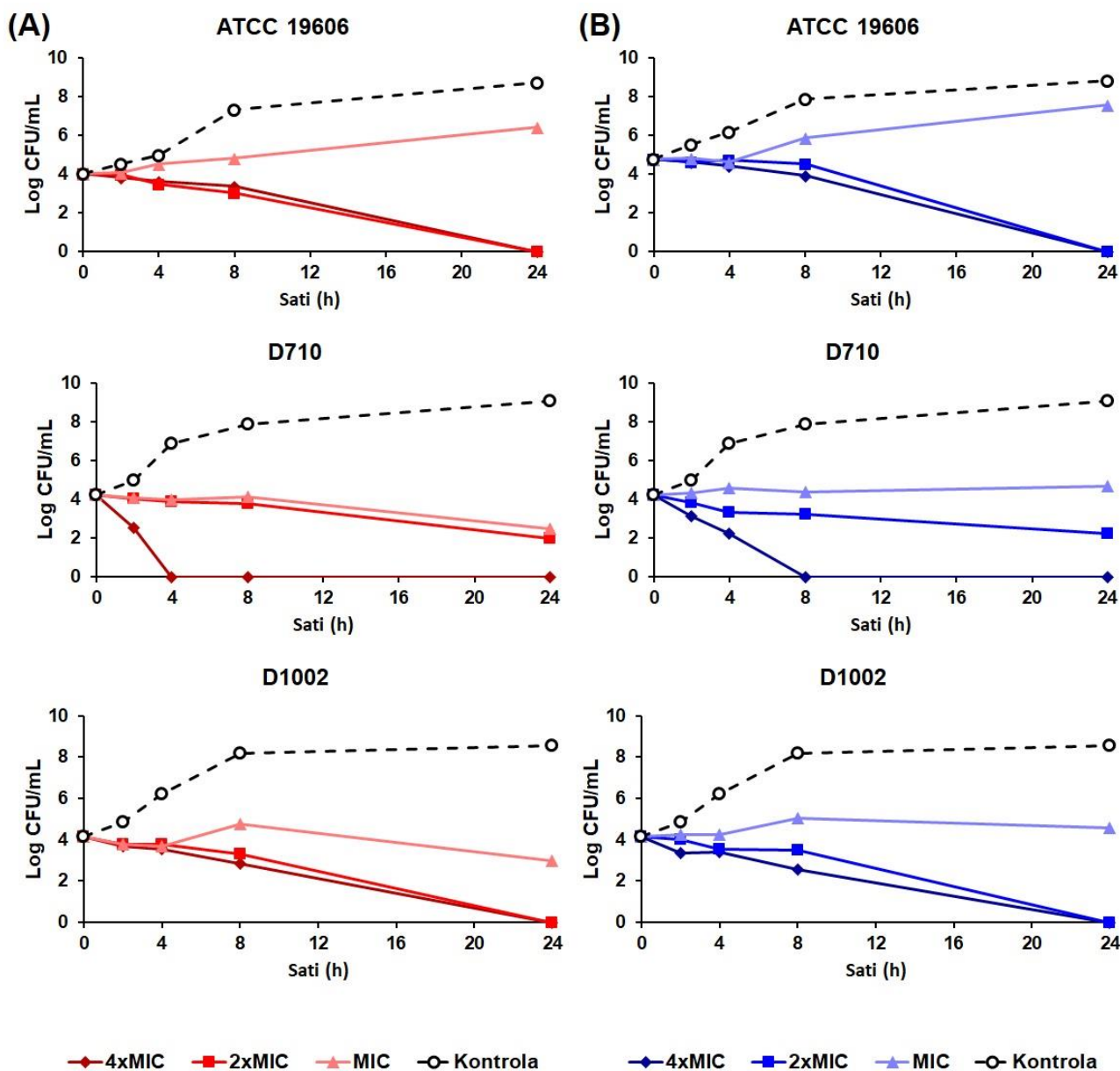
Primenom bujon-mikrodilucione metode određene su MIC vrednosti u opsegu 75-225 µg/mL za sve halkone protiv svih sojeva *A. baumannii* obuhvaćenih u ispitivanjima (Tabela 13). Izračunate MIC₅₀ i MIC₉₀ vrednosti iste su za sve halkone i iznose 100 (MIC₅₀), odnosno 200 µg/mL (MIC₉₀). Prosečno najmanje MIC vrednosti zabeležene su u slučaju o-OCH₃ (119,89 µg/mL) i 2,6-OCH₃ (118,18 µg/mL), dva halkona sa metoksi grupama. Najjaču aktivnost halkoni su u proseku ostvarili protiv kolistin-rezistentnih PDR izolata (MIC = 100 µg/mL za sve halkone), kao i protiv biofilmskih proizvođača SP tipa (MIC = 106,25-111,25 µg/mL). Izolati MDR profila rezistencije (MIC = 125-141,67 µg/mL) i izolati koji nisu proizvođači biofilma, ili proizvode male količine biofilma (MIC = 132,14-139,29 µg/mL) pokazali su se najotpornijim na inhibitorno dejstvo halkona. Takođe, znatno bolju aktivnost halkoni su ostvarili protiv sojeva izolovanih sa katetera (MIC = 95-102,5 µg/mL), u poređenju sa sojevima izolovanim iz uzoraka humanog porekla (MIC = 123,66-129,76 µg/mL).

Tabela 13. Antimikrobna aktivnost halkona o-OCH₃, p-CF₃, 2,6-OCH₃ i p-F-o-CH₃ protiv sojeva *A. baumannii* izražena u vidu MIC vrednosti.

Soj	MIC (µg/mL)			
	o-OCH ₃	p-CF ₃	2,6-OCH ₃	p-F-o-CH ₃
ATCC 19606	100	100	100	100
Z6142	100	100	125	125
Z6228	125	125	125	150
Z6235	125	125	125	125
Z6419	125	125	125	125
Z6420	125	125	125	150
Z6853	75	100	75	100
Z6879	100	100	100	125
Z7085	225	225	225	225
B101	75	100	75	75
B102	125	125	125	125
B103	100	100	125	100
Z94	100	100	100	100
D345	200	200	200	200
D371	100	100	125	100
D441	75	100	100	100

G1108	100	100	100	125
G1812	75	75	75	75
D423	100	100	100	100
D650	100	100	100	100
D613	100	100	75	100
D710	200	225	200	200
D755	100	100	100	100
D749	100	100	100	75
D811	75	75	75	100
D809	75	100	75	75
D812	75	75	75	75
D863	200	200	200	200
D746	75	100	100	75
D1010	100	100	100	100
D1002	150	150	125	150
D989	150	150	125	150
D1107	150	150	150	150
D988	100	125	100	100
D1013	100	125	100	100
Z838	125	125	100	125
Z1213	200	175	175	200
Z766	200	200	225	225
Z881	150	125	100	125
K111	125	125	125	125
K112	100	100	100	100
K116	125	125	100	100
K118	125	125	100	100
K119	125	125	125	125

Vremenski zavisan baktericidan efekat halkona ispitan je na primerima dva odabrana halkona o-OCH₃ i p-CF₃, protiv standardnog soja ATCC 19606, kao i dva klinička izolata D710 i D1002 (Slika 21). Ispitan je uticaj tri različite koncentracije (MIC, 2xMIC i 4xMIC), na sojevima koji su pokazali različitu osetljivost prema halkonima: ATCC 19606 (MIC = 100 µg/mL), D710 (MIC = 200-225 µg/mL) i D1002 (MIC = 125-150 µg/mL). Slične krive rasta zabeležene su u slučaju oba halkona uz nešto bolju baktericidnu aktivnost halkona o-OCH₃. Uzimajući u obzir da je granica detekcije bila 2 log₁₀ CFU/mL, nije bilo porasta kolonija u kulturama ATCC 19606 i D1002 tretiranim sa 2xMIC i 4xMIC oba halkona nakon 24 h. U kulturi D710 jedino je koncentracija 4xMIC (odgovara 800 µg/mL za o-OCH₃, odnosno 900 µg/mL za p-CF₃) uspešla da smanji broj kolonija ispod limita detekcije, i to nakon 8 h u slučaju p-CF₃, a nakon svega 4 h u slučaju o-OCH₃.



Slika 21. Time-kill krive rasta sojeva *A. baumannii* pod uticajem tri različite koncentracije (MIC, 2xMIC i 4xMIC) halkona: (A) o-OCH₃ (crvene linije), (B) p-CF₃ (plave linije). Napomena: granica detekcije bila je 2 log₁₀ CFU/mL.

Što se tiče tretmana sa MIC, jedino u slučaju soja ATCC 19606, bakterije su nakon početne inhibicije nastavile normalno da rastu. Razlika u baktericidnoj aktivnosti dva halkona se najbolje vidi u delovanju MIC nakon 24 h u slučaju sojeva D710 i D1002, kod kojih se početni inokulum

smanjio u proseku za 1,45 log₁₀ CFU/mL u 24 h-intervalu nakon tretmana sa o-OCH₃, a povećao u proseku za 0,45 log₁₀ CFU/mL u 24 h-intervalu nakon tretmana sa p-CF₃.

4.9. Antimikrobna aktivnost halkona o-OCH₃ i p-CF₃ u kombinaciji sa antibioticima protiv kliničkih izolata *A. baumannii*

Primenom *checkerboard* metode ispitane su interakcije između halkona (o-OCH₃ i p-CF₃) i antibiotika amikacina, ciprofloksacina i meropenema protiv 20 kliničkih izolata *A. baumannii* (Tabele 14-16). Ukupno sedam izolata izostavljeno je iz ispitivanja sinergističke aktivnosti halkona sa amikacinom, pošto nije uspostavljena MIC vrednost amikacina (MIC >4096 µg/mL), neophodna za izračunavanje FICI. Različiti tipovi interakcija između halkona i amikacina zabeleženi su kod različitih sojeva. Sinergističke interakcije nisu zabeležene, ali zato jesu parcijalne sinergističke interakcije protiv 7 sojeva (50%) u slučaju oba halkona. Halkon o-OCH₃ pokazao je nešto bolju sinergističku aktivnost sa amikacinom pošto su zabeležene 3 aditivne interakcije (21,43%) i FICI u opsegu 0,51-1,12, naspram jedne aditivne interakcije (7,14%) i FICI u opsegu 0,51-1,5 u slučaju p-CF₃.

Tabela 14. Antimikrobna aktivnost halkona o-OCH₃ i p-CF₃ u kombinaciji sa amikacinom protiv sojeva *A. baumannii* predstavljena u obliku FICI vrednosti i efekta interakcije.

Soj	MIC _{komb} (µg/mL) ^a			Ef. ^b	MIC _{komb} (µg/mL)			Ef.
	AMK	o-OCH ₃	FICI		AMK	p-CF ₃	FICI	
ATCC 19606	1	75	0,87	PSY	4	12,5	0,62	PSY
Z6142	16	50	1	AD	16	50	1	AD
B102	128	75	1,1	IN	128	75	1,1	IN
B103	128	50	0,75	PSY	32	75	0,81	PSY
D371	256	12,5	0,62	PSY	64	50	0,62	PSY
G1108	2	12,5	0,62	PSY	2	12,5	0,62	PSY
D650	256	50	1	AD	32	100	1,2	IN
D710	8	25	1,12	IN	8	25	1,1	IN
D749	256	12,5	1,12	IN	256	50	1,5	IN
D809	1024	50	0,92	PSY	1024	50	0,75	PSY
D863	2	100	0,51	PSY	2	100	0,51	PSY
D1002	64	50	0,58	PSY	64	50	0,58	PSY
Z1213	4	100	1	AD	4	100	1,07	IN
Z766	128	12,5	1,06	IN	128	12,5	1,06	IN

^aMIC_{komb} – MIC jednog agensa u kombinaciji sa drugim agensom. AMK – amikacin.

^bEf. – efekat interakcije. PSY – parcijalni sinergizam, AD – aditivnost, IN – indiferencija.

Tabela 15. Antimikrobna aktivnost halkona o-OCH₃ i p-CF₃ u kombinaciji sa ciprofloksacinom protiv sojeva *A. baumannii* predstavljena u obliku FICI vrednosti i efekta interakcije.

Soj	MIC _{komb} (µg/mL) ^a			Ef. ^b	MIC _{komb} (µg/mL)			Ef.
	CIP	o-OCH ₃	FICI		CIP	p-CF ₃	FICI	
ATCC 19606	1	25	0,75	PSY	1	25	0,75	PSY
Z6142	8	50	1	AD	16	50	1,5	IN
Z6235	16	50	0,9	PSY	32	12,5	1,1	IN
Z6879	32	50	0,75	PSY	32	50	0,75	PSY
Z7085	64	12,5	1,06	IN	64	12,5	1,06	IN
B102	16	12,5	0,35	SY	16	12,5	0,35	SY
B103	16	50	0,75	PSY	16	50	0,75	PSY
Z94	64	12,5	0,62	PSY	8	100	1,06	IN
D345	16	12,5	0,56	PSY	16	12,5	0,56	PSY
D371	16	50	0,75	PSY	32	12,5	0,62	PSY
G1108	64	75	1,25	IN	64	75	1,25	IN
D650	16	50	0,75	PSY	16	50	0,75	PSY
D710	8	50	0,75	PSY	8	50	0,72	PSY
D749	32	50	1	AD	32	25	0,75	PSY
D809	16	50	1,17	IN	16	50	1	AD
D863	32	25	1,12	IN	32	50	1,25	IN
D1010	32	25	0,75	PSY	32	12,5	0,62	PSY
D1002	16	25	0,67	PSY	16	50	0,83	PSY
D1107	32	25	0,67	PSY	32	25	0,67	PSY
Z1213	16	12,5	1,06	IN	16	12,5	1,07	IN
Z766	32	50	1,25	IN	32	12,5	1,06	IN

^aMIC_{komb} – MIC jednog agensa u kombinaciji sa drugim agensom. CIP – ciprofloksacin.

^bEf. – efekat interakcije. SY – sinergizam, PSY – parcijalni sinergizam, AD – aditivnost, IN – indiferencija.

Sinergistička interakcija između halkona i ciprofloksacina zabeležena je samo u jednom slučaju (4,76%) protiv soja B102. Najviše je zabeleženo parcijalnih sinergističkih interakcija, 12 (57,14%) u slučaju o-OCH₃, a 11 (52,38%) u slučaju p-CF₃. Zabeležene su i 3 aditivne interakcije, 2 (9,52%) sa o-OCH₃, a 1 (4,76%) sa p-CF₃. FICI vrednosti kretale su se u opsegu 0,35-1,25 za o-OCH₃ i 0,35-1,5 za p-CF₃, tako da se može zaključiti da je o-OCH₃ pokazao bolju sinergističku aktivnost i sa ciprofloksacinom.

Najviše sinergističkih interakcija zabeleženo je između halkona i meropenema, 3 (14,29%) u slučaju o-OCH₃, a 2 (9,52%) u slučaju p-CF₃. Bolju sinergističku aktivnost pokazao je o-OCH₃ pošto je pored više sinergističkih interakcija ispoljio i više parcijalnih sinergističkih interakcija, 11 (52,38%) naspram 8 (38,40%), i više aditivnih interakcija, 5 (23,81%) naspram 4 (19,05%) u slučaju p-CF₃. Izračunat je opseg FICI vrednosti 0,44-1,25 za o-OCH₃ i 0,4-1,69 za p-CF₃. Dodatno, ispitana je sinergistička aktivnost meropenema sa verapamilom (inhibitor efluksnih pumpi) protiv svih kliničkih izolata, koja bi mogla pomoći rasvetljavanju mehanizma sinergističke aktivnosti meropenema sa halkonima. Najveća sinergistička aktivnost zabeležena je protiv soja D710, u slučaju koga se MIC meropenema u kombinaciji sa 10 µg/mL verapamila smanjio za čak 16 puta, odnosno na 2 µg/mL. Pošto se prema EUCAST kriterijumu za određivanje osetljivosti za koncentraciju od 2 µg/mL smatra da je soj osetljiv, može se zaključiti da je u prisustvu verapamila kod ovog soja ponovo ostvarena osetljivost na meropenem. Kako je najjača sinergistička interakcija između oba halkona i meropenema zabeležena upravo protiv ovog soja, može se zaključiti da određeni doprinos u sinergističkoj interakciji ima uticaj halkona na efluksne pumpe *A. baumannii*. Pored toga, blaga sinergistička aktivnost meropenema sa verapamilom zabeležena je i protiv sojeva Z6142, Z94, D1002, D1010 i D1107, pošto se MIC dvostruko smanjio u prisustvu verapamila. Interesantno, protiv soja D371, u slučaju kojeg je pokazana sinergistička interakcija između o-OCH₃ i meropenema, nije pokazana sinergistička aktivnost meropenema sa verapamilom.

Dodatno je ispitano vremenski zavisno baktericidno delovanje kombinacije o-OCH₃/meropenem protiv tri soja *A. baumannii* (Slika 22). Meropenem je testiran u koncentracijama od 8 µg/mL (EUCAST granična koncentracija) protiv sojeva D710 i D1002, odnosno 0,5 µg/mL protiv soja ATCC 19606. U slučaju soja D710, protiv koga je *checkerboard* metodom zabeležena najjača sinergistička interakcija, došlo je do smanjenja početnog inokuluma za 0,38 log₁₀ CFU/mL u 8 h-intervalu, nakon čega su bakterije nastavile normalno da rastu dostižući vrednost od 5,78 log₁₀ CFU/mL nakon 24 h što je za 3,30 log₁₀ CFU/mL manje u poređenju sa kontrolom. Inhibicija rasta u poređenju sa kontrolom zabeležena je i kod soja D1002, protiv koga je prethodno pokazana parcijalna sinergistička interakcija. Tretirane bakterije D1002 pokazale su znatno sporiji rast što je rezultiralo da u 8 h-intervalu broj kolonija bude manji za 3,61 log₁₀ CFU/mL u odnosu na kontrolu. Nakon toga, bakterije su nastavile ubrzano da rastu i dostigle vrednost od 7,22 log₁₀ CFU/mL nakon 24 h. U slučaju ATCC 19606 soja, protiv koga nije pokazano postojanje interakcije, nije zabeležena značajna razlika između kriva rasta tretirane i kontrolne grupe.

Tabela 16. Antimikrobna aktivnost halkona o-OCH₃ i p-CF₃ u kombinaciji sa meropenemom protiv sojeva *A. baumannii* predstavljena u obliku FICI vrednosti i efekta interakcije (sa leve strane), i MIC meropenema u kombinaciji sa verapamilom (sa desne strane).

Soja ^a	MIC _{komb} (µg/mL) ^b		FICI	Ef. ^c	MIC _{komb} (µg/mL)		FICI	Ef.	MIC MEM (µg/mL)	
	MEM	o-OCH ₃			MEM	p-CF ₃			Bez VER ^d	+ VER, 10 µg/mL
ATCC 19606	1	50	1	AD	1	75	1,25	IN	2	2
Z6142	64	40	0,9	PSY	64	40	0,9	PSY	128	64
Z6235	48	62,5	1	AD	48	62,5	1	AD	96	96
Z6879	128	50	0,75	PSY	128	50	0,75	PSY	512	512
Z7085	96	40	0,68	PSY	96	40	0,68	PSY	192	192
B102	32	62,5	1	AD	32	62,5	1	AD	64	64
B103	32	50	0,75	PSY	32	50	0,75	PSY	128	128
Z94	32	25	0,5	SY	32	25	0,5	SY	128	64
D345	32	120	0,85	PSY	64	120	1,1	IN	128	128
D371	32	25	0,5	SY	32	50	0,75	PSY	128	128
G1108	0,5	75	1,25	IN	0,5	75	1,25	IN	1	1
D650	16	70	1,2	IN	16	70	1,2	IN	32	32
D710	2	75	0,44	SY	2	75	0,40	SY	32	2
D749	32	15	0,65	PSY	32	60	1,1	IN	64	64

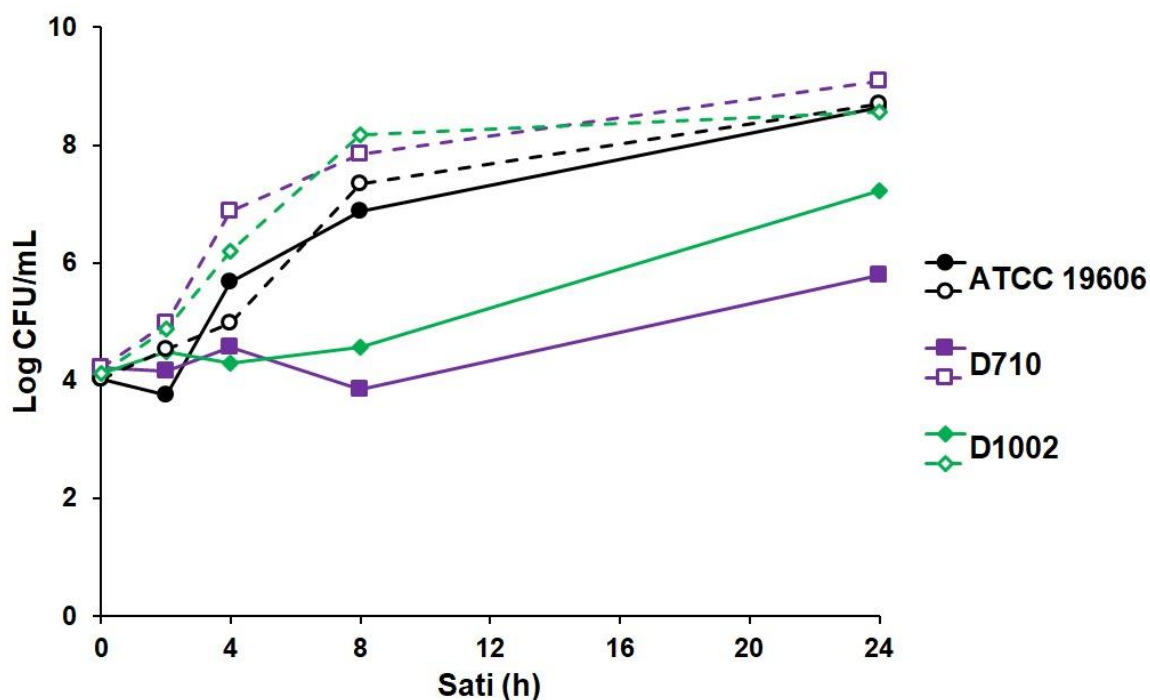
D809	64	20	0,77	PSY	64	80	1,3	IN	128	128
D863	32	20	0,6	PSY	32	20	0,6	PSY	64	64
D1010	128	50	1	AD	128	50	1	AD	256	128
D1002	32	40	0,77	PSY	32	40	0,77	PSY	64	32
D1107	16	75	1	AD	16	75	1	AD	32	16
Z1213	2	120	0,66	PSY	32	120	1,69	IN	32	32
Z766	4	120	0,59	PSY	4	120	0,66	PSY	64	64

^aSivo su obojeni sojevi kod kojih je meropenem ispoljio sinergističku aktivnost sa verapamilom.

^bMIC_{komb} – MIC jednog agensa u kombinaciji sa drugim agensom. MEM – meropenem.

^cEf. – efekat interakcije. SY – sinergizam, PSY – parcijalni sinergizam, AD – aditivnost, IN – indiferencija.

^dVER – verapamil (inhibitor efluksnih pumpi).



Slika 22. Time-kill krive rasta *A. baumannii* pod uticajem kombinacije o-OCH₃ (0,5xMIC) i meropenema (0,5 µg/mL za ATCC 19606, odnosno 8 µg/mL za D710 i D1002). Test grupe predstavljene su punim linijama i obojenim simbolima, a kontrolne grupe isprekidanim linijama i neobojenim simbolima.

4.10. Antibiofilmska aktivnost halkona protiv kliničkih izolata *A. baumannii*

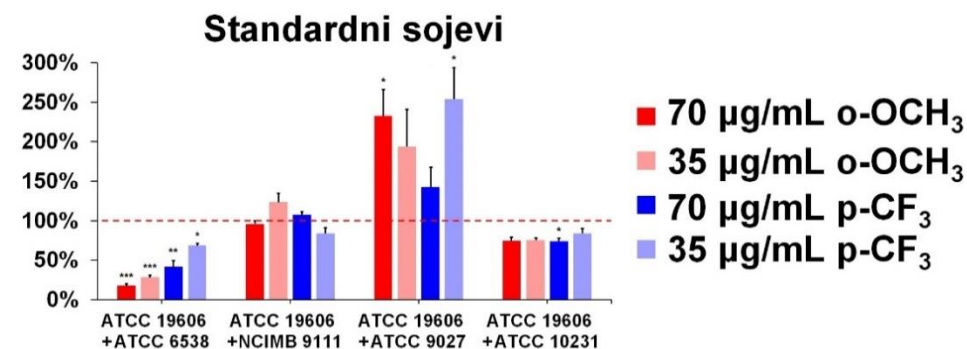
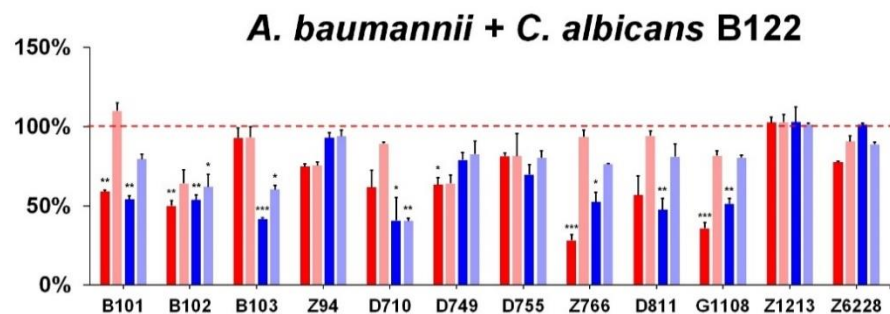
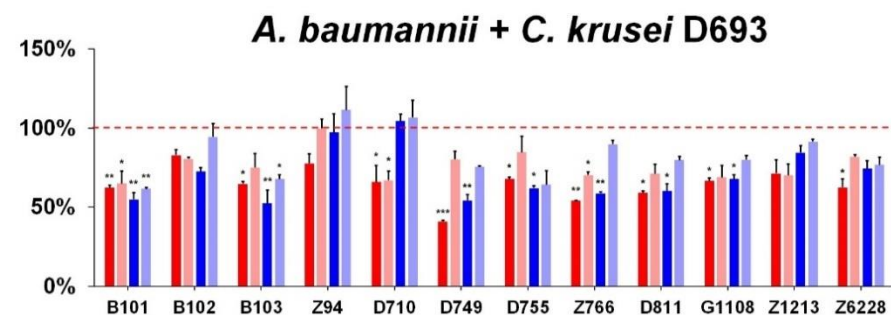
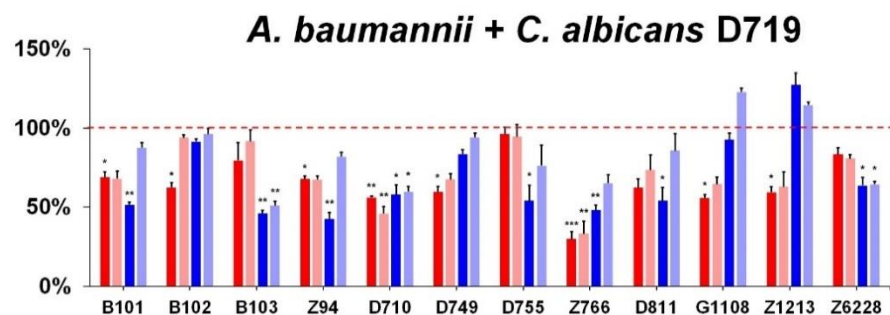
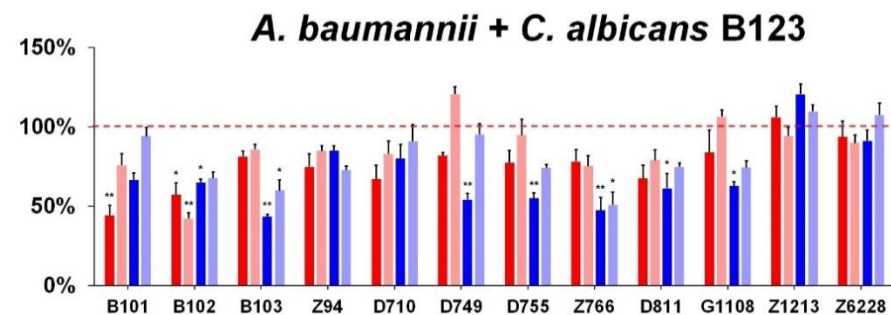
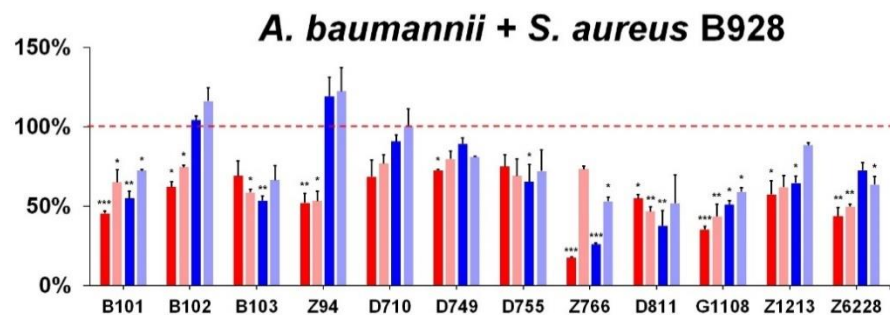
Potencijalna sposobnost inhibicije biofilma od strane halkona ispitana je protiv kliničkih izolata *A. baumannii*, obuhvativši sve tipove biofilmskih proizvođača, izuzev sojeva koji ne proizvode biofilm (Tabela 17). Ispitivanja su sprovedena sa dve subinhibitorne koncentracije (sub-MIC): 35 i 70 µg/mL. Najjača inhibicija produkcije biofilma postignuta je pomoću o-OCH₃ i p-CF₃ halkona. Halkon o-OCH₃ je postigao značajnu inhibiciju kod 66,67% ispitivanih sojeva, uz prosečno smanjenje produkcije za 35,53%, odnosno kod 5,56% ispitivanih sojeva uz prosečno smanjenje produkcije za 16,43%, u koncentracijama od 70 i 35 µg/mL. Najveći stepen inhibicije postignut je kod sojeva MP tipa, od čega najviše kod soja G1108, koji je inkubiran u prisustvu 70 µg/mL o-OCH₃ proizveo za 48,47% manje biofilma. U proseku je najslabiji efekat zabeležen kod sojeva WP tipa. Najznačajnije, produkcija biofilma bila je inhibirana u slučaju svih sojeva (opseg 17,83-35,53%) od strane 70 µg/mL o-OCH₃. Halkon p-CF₃ je postigao značajnu inhibiciju kod 61,11% ispitivanih sojeva, odnosno 16,67% ispitivanih sojeva u koncentracijama od 70, odnosno 35 µg/mL, a proizveo je i veći stepen inhibicije kod individualnih sojeva, pošto je inhibirao produkciju biofilma kod sojeva Z6879, B103, D441, D749 i D811 za više od 56% nakon primene u koncentraciji od 70 µg/mL. Ipak, u proseku stepen inhibicije je bio nešto manji u poređenju sa o-OCH₃, pošto je izračunata prosečna inhibicija za 33,30% u koncentraciji od 70 µg/mL, odnosno za 18,27% u koncentraciji od 35 µg/mL, a produkcija biofilma kod sojeva Z1213 i Z766 nije bila inhibirana. Pored toga, primećeno je da su određeni sojevi bili osetljiviji na halkone sa specifičnim funkcionalnim grupama, npr. soj B103, kod kojeg je produkcija biofilma bila inhibirana za 57,50% nakon primene 70 µg/mL p-CF₃, odnosno za čak 71,83% u slučaju 70 µg/mL p-F-o-CH₃, oba halkona sa fluoro grupama. Halkon p-F-o-CH₃ je inače u proseku proizveo najslabiji stepen inhibicije, od 23,87% u koncentraciji od 70 µg/mL, odnosno 7,44% u koncentraciji od 35 µg/mL. S druge strane, halkoni sa metoksi grupama pokazali su bolju aktivnost protiv sojeva B102, D345, Z1213 i Z766. Određeni sojevi, poput D371, G1108 i D811, bili su podjednako osetljivi na sve tipove halkona.

Tabela 17. Nivo produkcije biofilma sojeva *A. baumannii* pod uticajem dve subinhibitorne koncentracije halkona, izražen u procentima produkcije u odnosu na netretiranu kontrolu (sivo obojena polja ističu statistički značajnu inhibiciju). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Soj	Produkcija biofilma u odnosu na netretiranu kontrolu (%)							
	o-OCH ₃		p-CF ₃		2,6-OCH ₃		p-F-o-CH ₃	
	70 µg/mL	35 µg/mL	70 µg/mL	35 µg/mL	70 µg/mL	35 µg/mL	70 µg/mL	35 µg/mL
ATCC 19606	78,09±3,24	87,17±4,82	76,42±2,23*	90,15±1,75	79,46±3,87	88,21±1,23	83,46±2,50	99,87±6,27
Z6228	71,34±5,12	97,86±6,54	94,10±5,01	88,52±5,07	73,48±4,98	95,96±3,22	88,12±7,03	99,43±5,41
Z6853	55,52±3,94**	59,61±8,02*	56,63±7,13*	78,93±6,42	94,85±6,70	97,10±4,12	95,08±4,98	95,92±9,57
Z6879	54,18±2,97**	89,62±1,55	36,89±4,80***	57,19±2,03**	67,62±3,22*	75,92±5,56	92,15±1,91	87,16±7,26
B101	72,80±4,14	78,02±5,78	86,17±7,74	93,97±6,69	78,92±6,08	99,65±6,50	80,03±5,44	106,82±7,06
B102	71,72±2,64*	80,29±2,31	88,90±3,81	92,84±1,77	60,71±2,35**	64,27±3,88*	74,24±6,71	80,31±3,46
B103	59,52±6,68*	94,88±9,52	42,50±3,96***	75,14±3,75	71,08±4,22	77,75±5,80	28,17±4,73***	63,33±4,21**
Z94	59,93±8,64*	77,00±11,23	55,73±5,17**	57,06±12,31	72,38±10,11	96,42±11,88	77,20±9,12	102,07±9,33
D345	61,46±0,85***	88,16±2,54	61,64±3,15**	89,97±4,64	46,97±1,89***	71,49±3,60*	94,39±3,69	112,63±8,41
D371	49,07±4,10***	77,93±4,55	51,26±3,00***	53,60±2,16***	56,81±1,47***	64,56±3,53**	47,16±6,11**	100,34±4,85
D441	53,10±4,49**	73,18±5,13	41,95±5,71***	66,10±4,99*	78,14±3,58	96,64±6,01	91,18±3,54	78,91±9,98
G1108	51,53±3,47***	82,79±2,42	48,95±0,67***	85,13±1,20	48,67±3,99***	78,94±3,93	48,99±1,83***	73,80±4,59
D710	56,23±6,31*	91,49±10,22	92,51±6,14	93,92±11,52	63,46±7,23	89,74±9,45	59,93±12,02	96,77±10,44

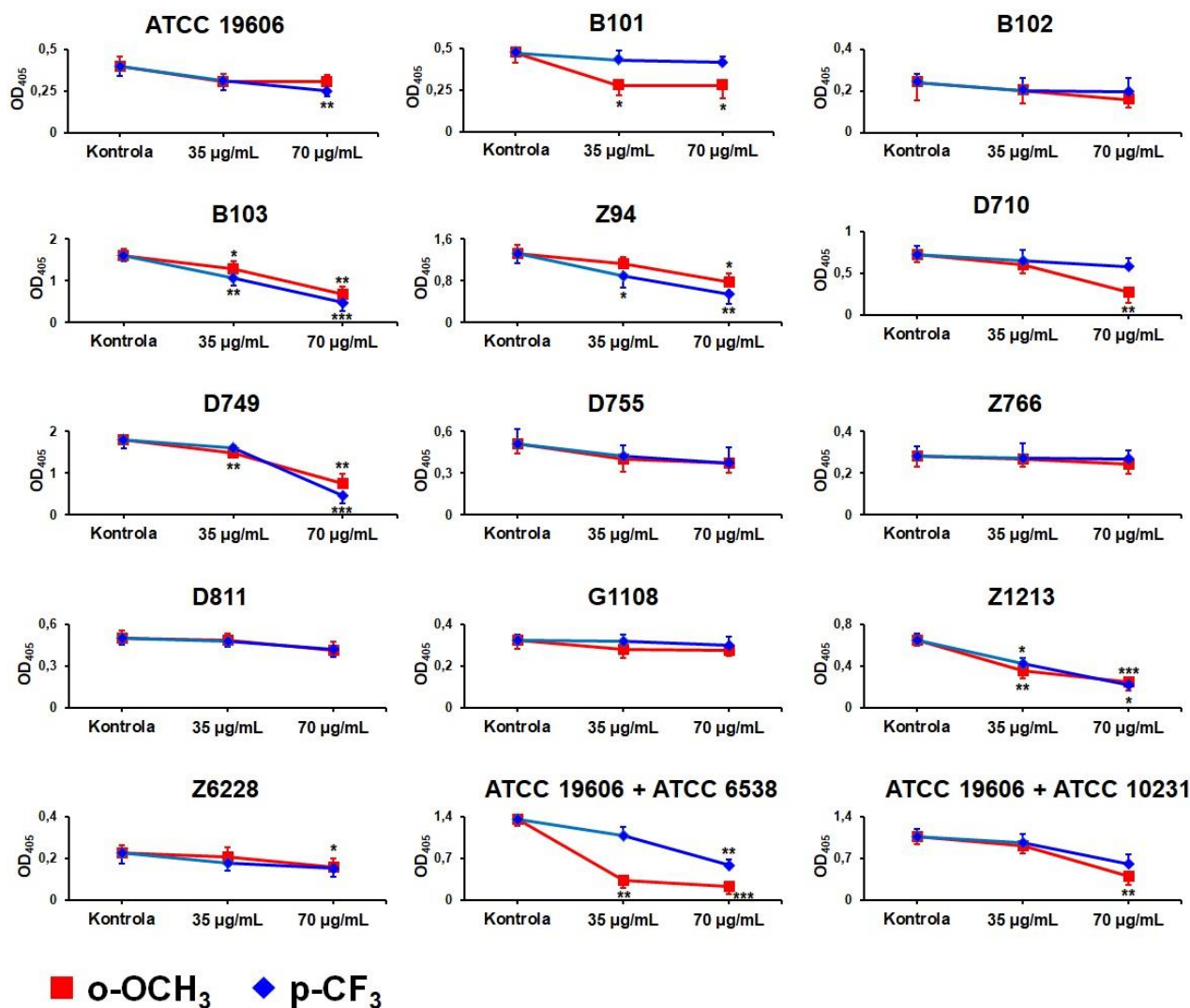
D755	78,27±5,13	83,09±6,70	70,14±7,71	87,14±5,20	80,12±3,36	85,97±7,11	82,04±7,64	90,31±5,87
D749	60,98±3,31**	82,16±4,43	41,64±3,62***	81,41±3,28	54,85±4,08**	88,01±4,17	70,03±3,24*	87,37±2,26
D811	66,06±3,61*	80,80±4,65	43,74±4,22***	78,90±3,03	68,81±4,52*	90,15±1,86	61,72±1,03***	98,74±4,16
Z1213	78,51±4,52	76,57±8,25	107,15±14,18	103,71±9,56	74,22±7,98	80,41±12,38	100,39±13,80	97,28±7,88
Z766	82,17±7,17	103,72±8,36	104,29±5,73	97,48±8,04	86,67±3,47	98,14±8,55	96,03±10,22	94,95±10,48

Na osnovu rezultata inhibicije produkcije monomikrobnog biofilma, halkoni o-OCH₃ i p-CF₃ su odabrani za dalje ispitivanje uticaja na produkciju polimikrobnog biofilma izolata rana *A. baumannii* u kombinaciji sa drugim čestim uzročnicima infekcija rana (Slika 23). Najpre je ispitana produkcija polimikrobnog biofilma standardnih sojeva *A. baumannii* sa *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, ili *C. albicans*. Najjača inhibicija postignuta je u slučaju kombinacije *A. baumannii* + *S. aureus*, pri čemu je o-OCH₃ dozno-zavisno inhibirao produkciju biofilma za čak 82,30%, odnosno 71,79%, u koncentracijama od 70, odnosno 35 µg/mL. Halkoni su inhibirali i produkciju biofilma kombinacije *A. baumannii* + *C. albicans*, ali je jedino u slučaju 70 µg/mL p-CF₃ zabeležena statistički značajna razlika u poređenju sa kontrolom (smanjenje za 25,93%). S druge strane, halkoni nisu pokazali uticaj na produkciju polimikrobnog biofilma *A. baumannii* + *K. pneumoniae*, a produkcija polimikrobnog biofilma *A. baumannii* + *P. aeruginosa* je čak bila stimulirana nakon inkubacije u prisustvu halkona. Usled toga, u narednim eksperimentima ispitivan je uticaj halkona samo na kombinacijama *A. baumannii* izolata iz rana sa kliničkim izolatima *S. aureus* ili *Candida* spp. U skladu sa rezultatima sa standardnim sojevima, o-OCH₃ je jače inhibirao produkciju biofilma kombinacija MRSA izolata B928 sa izolatima rana *A. baumannii*. Pri koncentraciji od 70 µg/mL o-OCH₃ produkcija polimikrobnog biofilma kliničkih izolata *S. aureus* + *A. baumannii* bila je u proseku inhibirana za 45,58% (opseg 24,98-82,51%). Osim toga, o-OCH₃ je, primenjen u obe koncentracije, inhibirao produkciju biofilma u slučaju svih sojeva, dok p-CF₃ nije uticao na produkciju biofilma *A. baumannii* sojeva B102 i Z94 sa *S. aureus* izolatom. Kada su u pitanju kombinacije izolata *A. baumannii* sa *C. albicans* ili *C. krusei*, različiti sojevi su pokazali različitu osetljivost zavisno od strukture halkona. Na primer, u skladu sa rezultatima inhibicije monomikrobnog biofilma, pokazalo se da je produkcija polimikrobnog biofilma soja B103 sa *Candida* spp. osetljivija na dejstvo p-CF₃, a produkcija polimikrobnog biofilma sojeva Z1213 i Z766 sa *Candida* spp. generalno osetljivija na dejstvo o-OCH₃ (izuzetak kombinacija *A. baumannii* Z766 + *C. albicans* B123). Dozno-zavisna inhibicija produkcije polimikrobnog biofilma postojala je u većini slučajeva, a zbirno u proseku je jača inhibicija *A. baumannii* + *C. albicans* polimikrobnog biofilma postignuta sa p-CF₃ (32,27% pri 70 µg/mL, odnosno 19,42% pri 35 µg/mL). Halkon o-OCH₃ je prosečno nešto jače inhibirao produkciju *A. baumannii* + *C. krusei* polimikrobnog biofilma (35,36% pri 70 µg/mL, odnosno 23,81% pri 35 µg/mL).



Slika 23. Produkcija polimikrobnog biofilma kliničkih izolata *A. baumannii* iz rane u kombinaciji sa MRSA izolatom i različitim izolatima *Candida* spp., kao i standardnog soja *A. baumannii* ATCC 19606 u kombinaciji sa standardnim sojevima *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* i *C. albicans*, pod uticajem o-OCH₃ i p-CF₃, izražena u procentima u odnosu na netretiranu kontrolu (isprekidana linija). **P* < 0,05, ***P* < 0,01, ****P* < 0,001

Vijabilnost biofilmskih ćelija bila se takođe smanjila pod uticajem ispitivanih halkona (Slika 24). Halkon *o*-OCH₃ je izazvao značajno smanjenje vijabilnosti kod većeg broja testiranih sojeva, a u slučaju B101 i D710, kao i ATCC 19606 u kombinaciji sa *S. aureus* ATCC 6538, što je u skladu sa rezultatom uticaja na produkciju polimikrobnog biofilma. Takođe, *o*-OCH₃ je izazvao veće smanjenje vijabilnosti ćelija polimikrobne zajednice *A. baumannii* ATCC 19606 + *C. albicans* ATCC 10231. S druge strane, vijabilnost biofilmskih ćelija sojeva ATCC 19606, B103 i Z94 se nešto više smanjila pod uticajem *p*-CF₃. Dozna zavisnost redukcije vijabilnosti je pokazala u svim slučajevima.



Slika 24. Vijabilnost biofilmskih ćelija *A. baumannii* nakon inkubacije u obliku monomikrobnog ili polimikrobnog biofilma, pod uticajem *o*-OCH₃ i *p*-CF₃, izražena u obliku OD₄₀₅ crvene boje formazana, u poređenju sa netretiranom kontrolom. **P* < 0,05, ***P* < 0,01, ****P* < 0,001

Pored toga što su halkoni pokazali sposobnost redukcije količine proizvedenog biofilma i vijabilnosti biofilmskih ćelija, testiran je i potencijalni uticaj na promenu osetljivosti biofilmskih ćelija prema meropenemu (Tabela 18), antibiotiku sa kojim su halkoni proizveli najveći broj sinergističkih interakcija. Nakon kultivacije biofilma *A. baumannii* izolata rana u prisustvu 70 µg/mL *o*-OCH₃ ili *p*-CF₃, biofilmske ćelije su izolovane i uzgojene do svežih kultura koje su ispitivane na osetljivost prema meropenemu. Interesantno, rezultati su pokazali da se kod pretretiranih biofilmskih ćelija soja D710 MIC meropenema smanjio za čak 16 puta, odnosno do MIC ispod EUCAST granične vrednosti (2 µg/mL). S druge strane, MIC biofilmskih ćelija soja B103 se smanjio 4 puta, ali samo nakon pretretmana sa *o*-OCH₃, a interesantno u slučaju soja D749

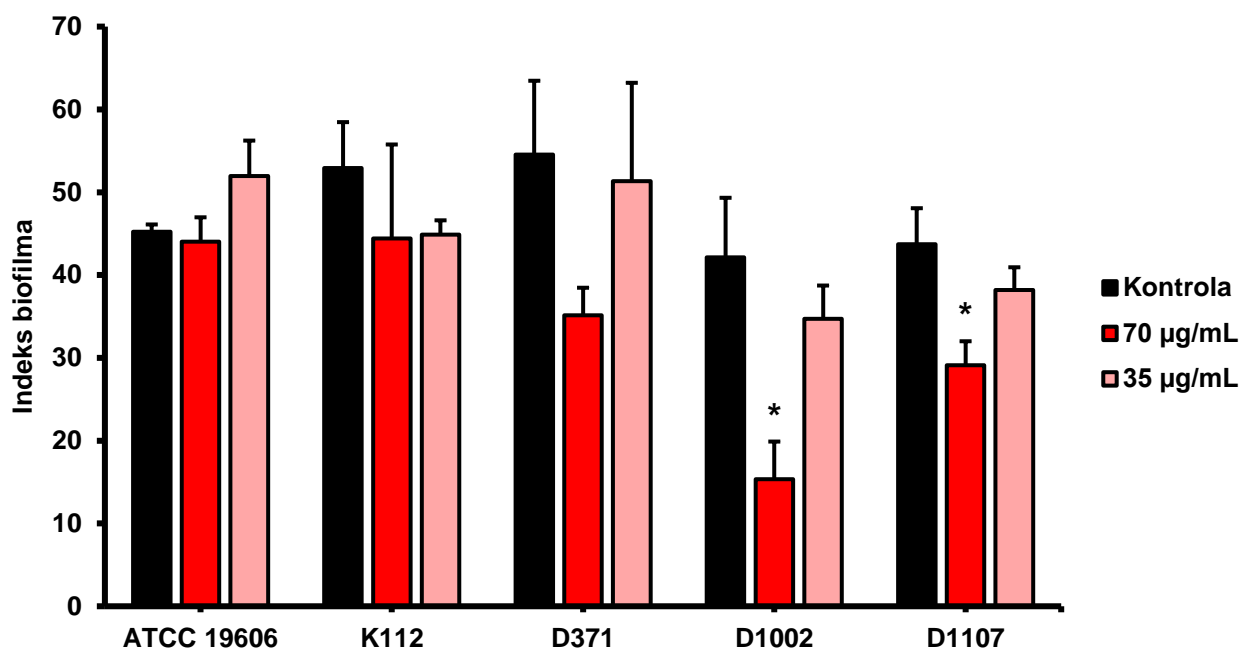
isti rezultat je proizveo p-CF₃. Dvostruko smanjenje MIC zabeleženo je i kod soja B102, nakon pretretmana sa p-CF₃.

Tabela 18. Antimikrobna aktivnost meropenema protiv biofilmskih ćelija izolata rana *A. baumannii* pretretiranih sa 70 µg/mL o-OCH₃ ili p-CF₃ u poređenju sa kontrolom bez pretretmana.

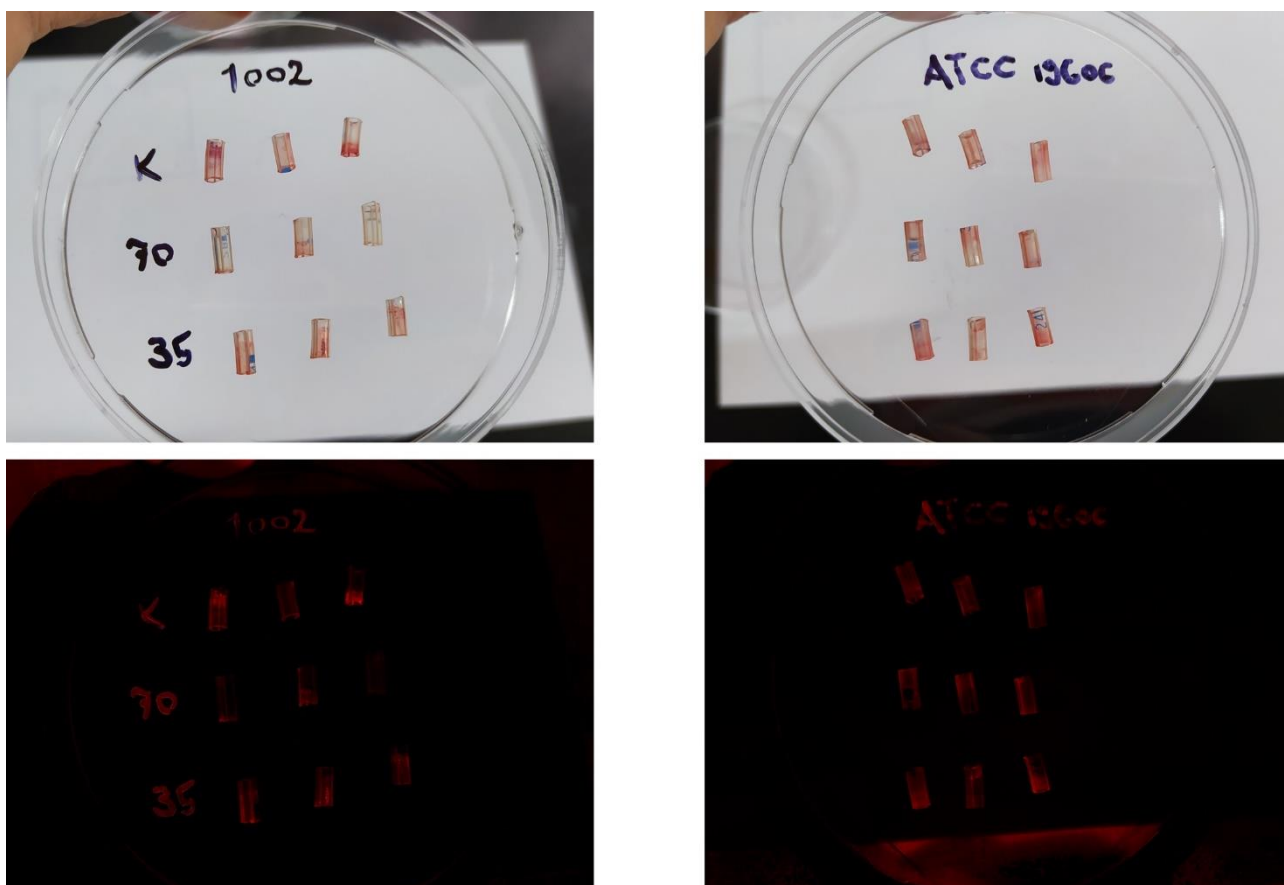
Soj	MIC MEM na biofilmske ćelije (µg/mL)		
	Netretirane	Pretretirane sa o-OCH ₃	Pretretirane sa p-CF ₃
B101	16	16	16
B102	128	128	64
B103	128	32	128
Z94	128	128	128
D710	32	2	2
D749	32	32	8
D755	128	128	128
Z766	128	128	128
D811	64	64	64
Z6228	128	128	128

MEM – meropenem

Poslednji test u okviru ispitivanja antibiofilmskih aktivnosti halkona odnosio se na ispitivanje uticaja o-OCH₃ na produkciju biofilma na kateterima (Slike 25 i 26). Test je sproveden na sojevima izolovanim sa aspiracionog katetera (D371), kao i iz hemokulture (K112) i urinokulture (D1002 i D1107), koji su infekcije uzrokovali najverovatnije nakon kolonizacije centralnog ili perifernog venskog, odnosno urinarnog katetera. Takođe, uključen je i standardni soj ATCC 19606. Statistički značajna inhibicija produkcije biofilma na kateterima postignuta je samo u slučaju sojeva izolovanih iz urinokulture pod uticajem 70 µg/mL o-OCH₃. Produkcija biofilma soja D1002 na kateteru bila je inhibirana za čak 63,56%. Takođe, inkubacija soja D371 izolovanog sa aspiracionog katetera u prisustvu 70 µg/mL o-OCH₃ dovela je do smanjenja produkcije biofilma na kateteru za 35,59%, međutim statistički značajna razlika nije pokazana. Inhibicija produkcije biofilma nije postignuta jedino u slučaju ATCC 19606 soja.



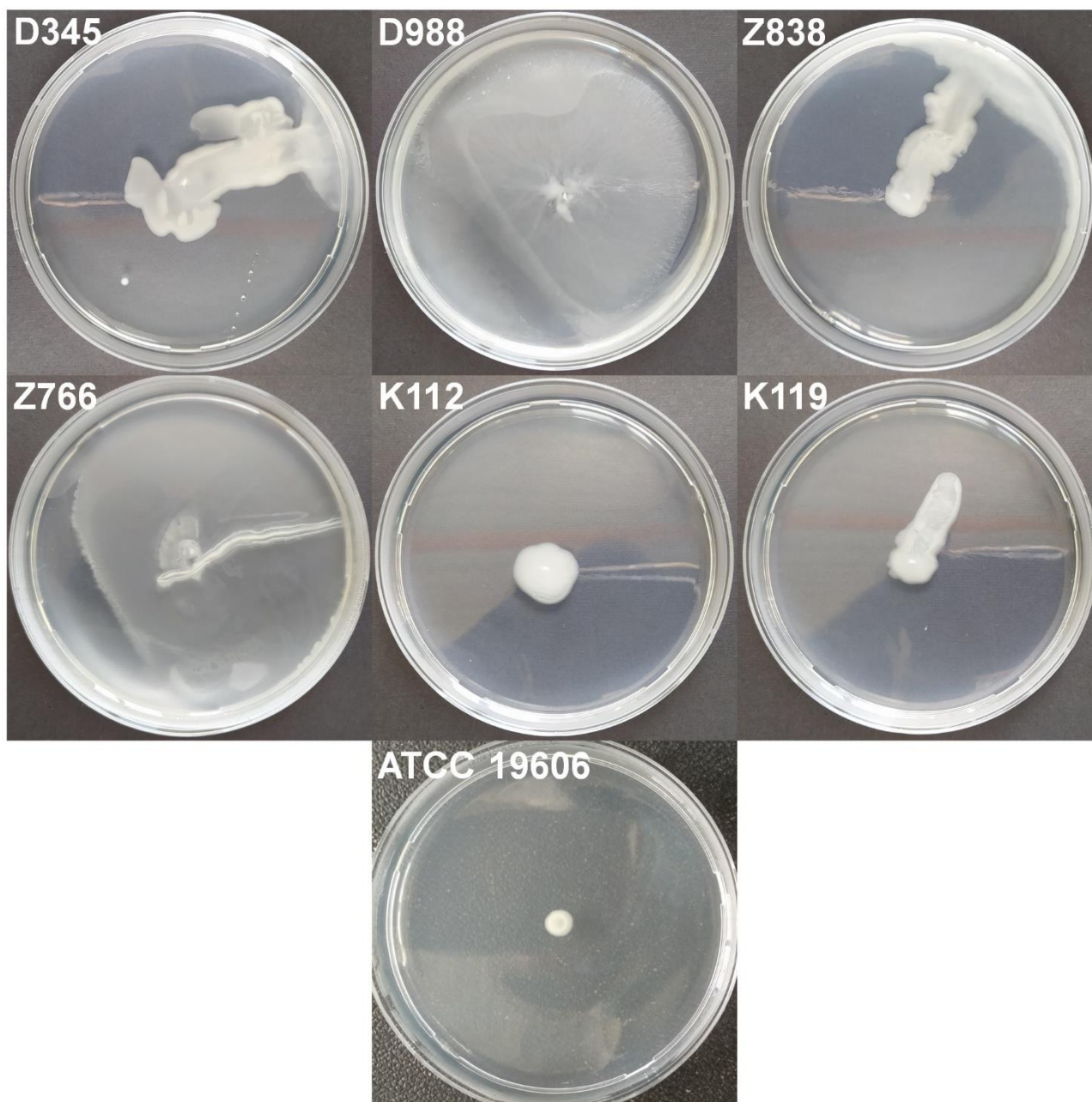
Slika 25. Produkcija biofilma sojeva *A. baumannii* na kateteru pod uticajem o-OCH₃ izražena u obliku indeksa biofilma koji predstavlja indeks crvene boje formazana izračunat primenom histogramске analize. **P* < 0,05



Slika 26. Produkcija biofilma sojeva D1002 i ATCC 19606 na kateterima pod uticajem o-OCH₃ u koncentracijama od 70 (srednji triplikot) i 35 µg/mL (donji triplikot), u odnosu na netretiranu kontrolu (gornji triplikot). Gornji red – digitalne fotografije, donji red – slike dobijene razdvajanjem fotografija po RGB, kombinovanjem log₁₀ R i log₁₀ G i korekcije osvetljenosti.

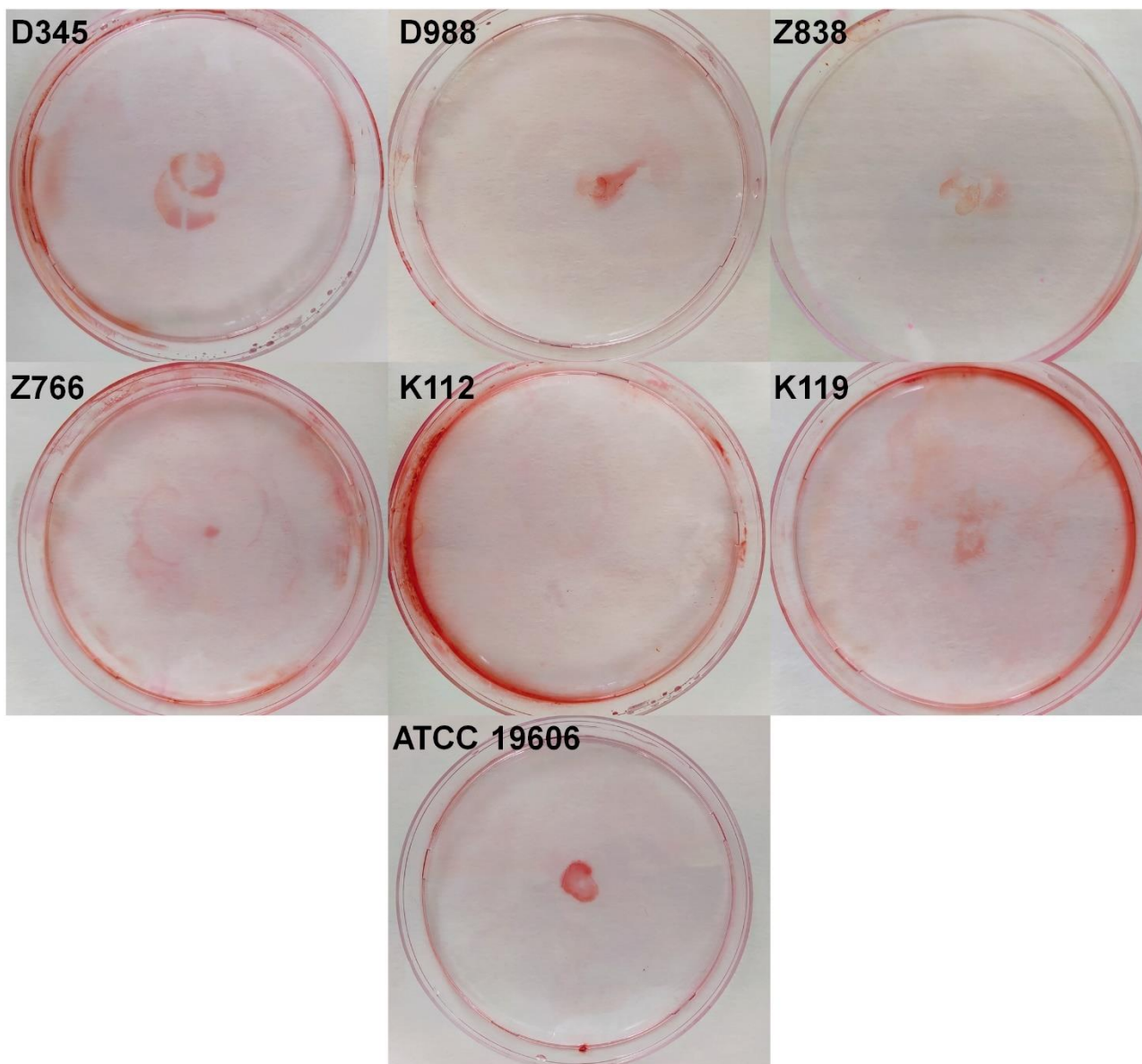
4.11. Inhibicija motiliteta kliničkih izolata *A. baumannii* od strane halkona *o*-OCH₃ i *p*-CF₃

Uticaj *o*-OCH₃ i *p*-CF₃ na površinski i trzajući motilitet ispitan je na šest kliničkih izolata: tri izolata iz hemokulture (Z838, K112 i K119) i po jedan izolat iz donjeg respiratornog trakta (D345), urinokulture (D988) i rane (Z766). U ispitivanjima je obuhvaćen i standardni ATCC 19606 soj. Na osnovu rezultata testova površinskog motiliteta (Slika 27), sojevi D345, D988, Z838 i Z766 klasifikovani su kao visoko pokretljivi (površina migracije >400 mm²), sojevi K112 i K119 pokazali su se umereno pokretljivim (površina migracije 25-400 mm²), dok je soj ATCC 19606 bio nepokretan (površina migracije <25 mm²). Sojevi D345, Z838, K112 i K119 ispoljili su identičan tip površinskog motiliteta, uz različiti obim pokretljivosti, dok su sojevi D988 i Z766 ispoljili drugačiji tip motiliteta, uz pojavu široke transparentne zone, trepljaste po obodu, koja hipotetički prethodi širenju kolonija. Pri tome soj D988 je odmah počeo da migrira u svim pravcima, dok je Z766 u početku favorizovao samo jedan pravac.



Slika 27. Oblici površinskog motiliteta testiranih netretiranih sojeva *A. baumannii*.

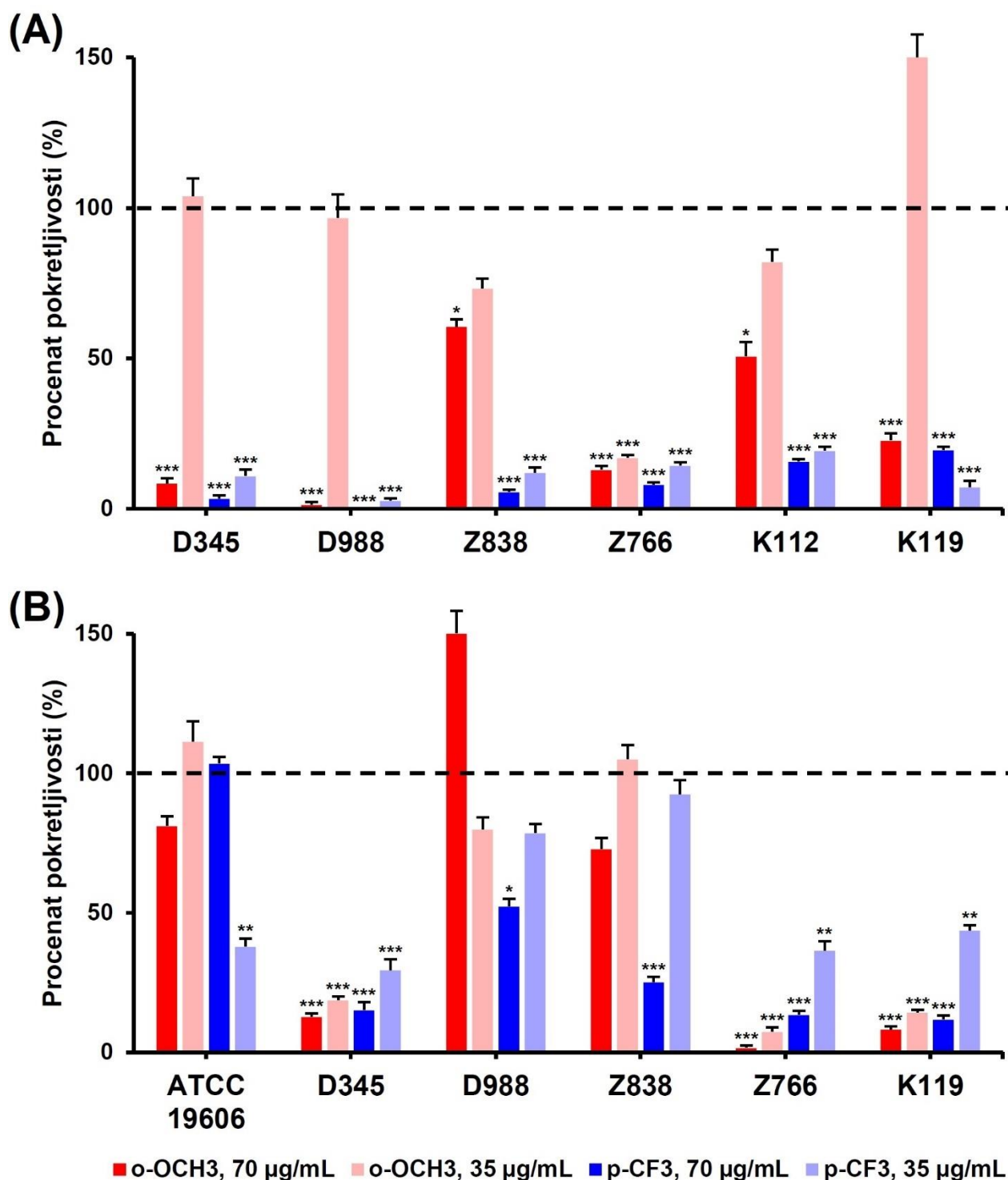
Najveći obim trzajuće pokretljivosti ispoljio je Z766 soj, koji je jedini klasifikovan kao visoko pokretljiv prema ovom tipu motiliteta (Slika 28). Svi ostali sojevi bili su umereno pokretljivi, izuzev soja K112 koji je klasifikovan kao nepokretan. Istovremeno, soj Z766 je jedini ispoljio različiti oblik motiliteta, uz teško vidljivu zonu, koja se nešto intenzivnije obojila jedino po obodima i koja verovatno predstavlja transparentnu zonu. Slab intenzitet boje verovatno potiče od činjenice da je Z766 soj slab proizvođač biofilma (WP), koji podleže bojenju safraninom.



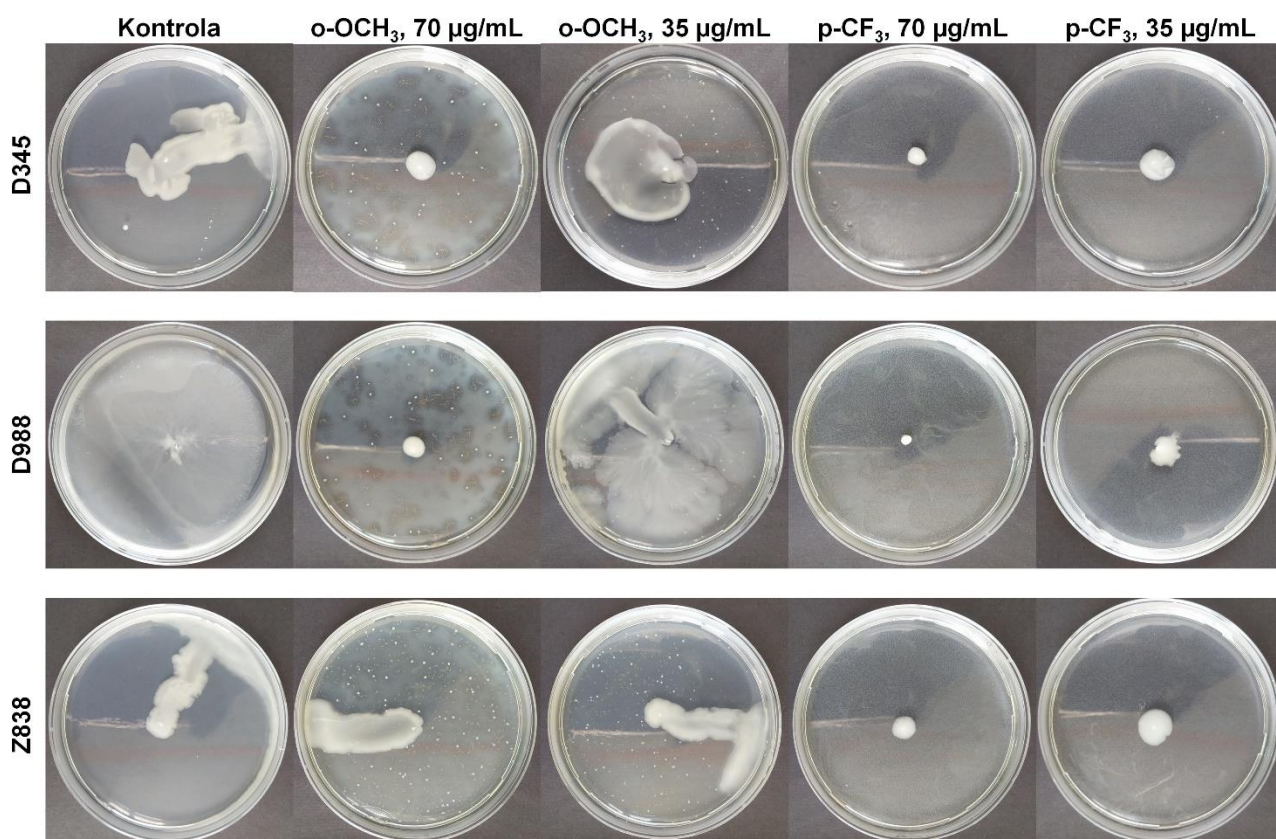
Slika 28. Oblici trzajućeg motiliteta testiranih netretiranih sojeva *A. baumannii*.

U ispitivanja uticaja halkona na motilitet nisu bili uključeni nepokretni sojevi. Rezultati su pokazali da halkoni značajno utiču, odnosno u najvećem broju slučajeva inhibiraju oba tipa motiliteta. Posebno izrazitu inhibitornu aktivnost ispoljio je p-CF₃ halkon koji je značajno inhibirao površinski motilitet svih testiranih sojeva u obe koncentracije (Slika 29A). Površinski motilitet se pod uticajem ovog halkona u proseku smanjio za čak 91,33% (opseg 80,52-99,74%), odnosno 89,06% (opseg 80,89-97,48%), pri koncentracijama od 70 i 35 µg/mL, respektivno. Nešto slabiji uticaj halkon p-CF₃ je imao na trzajući motilitet, pošto je u proseku smanjio obim migracije za 63,25%, odnosno 47,02%, u koncentracijama od 70, odnosno 35 µg/mL, a zanimljivo inhibicija motiliteta u slučaju soja ATCC 19606 postignuta je jedino sa nižom koncentracijom (Slika 29B). Halkon o-OCH₃ je značajno inhibirao površinski motilitet svih testiranih sojeva jedino u koncentraciji od 70 µg/mL, u proseku za 74%, dok je niža koncentracija delovala jedino u slučaju

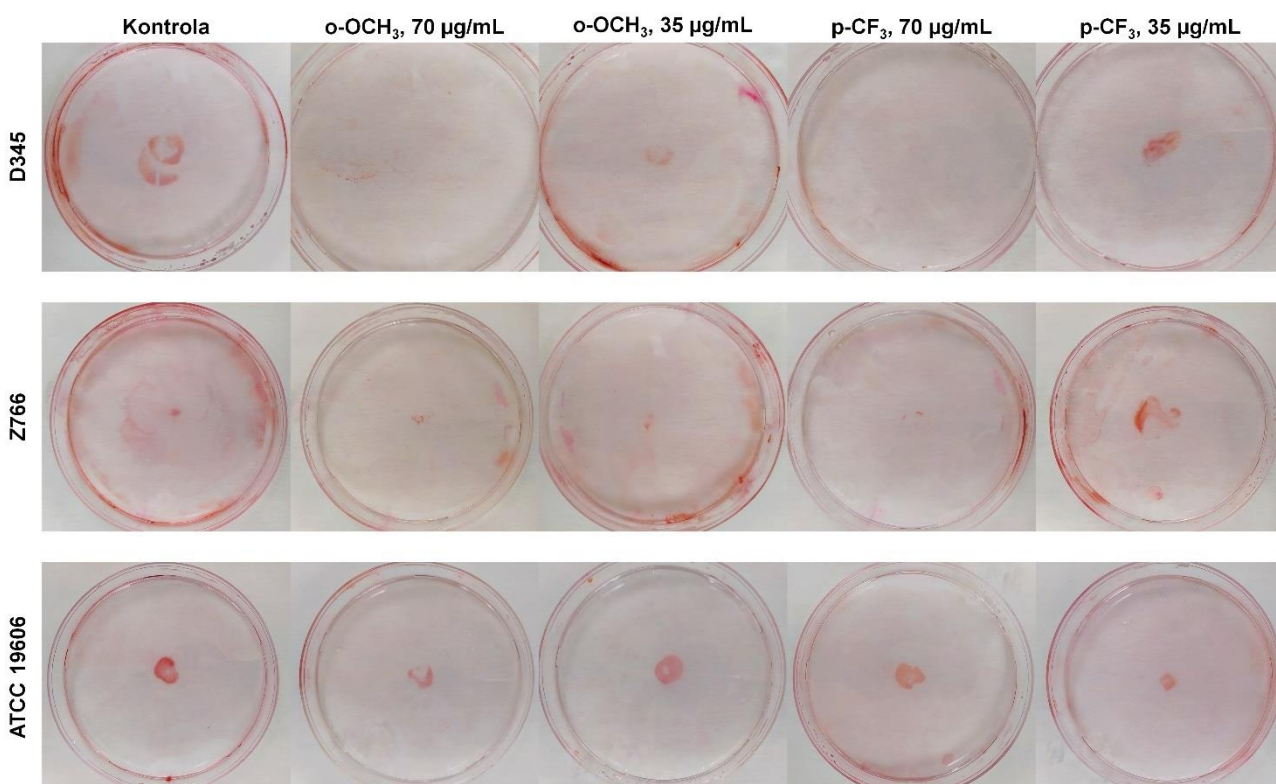
Z766 soja. Trzajući motilitet se pod uticajem ovog halkona redukovao prosečno za 45,66%, odnosno 44%, pri koncentracijama od 70, odnosno 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Primeri inhibicije površinskog i trzajućeg motiliteta pod uticajem halkona prikazani su na Slikama 30 i 31.



Slika 29. Obim površinskog (A) i trzajućeg (B) motiliteta *A. baumannii* sojeva pod uticajem halkona, izražen u obliku procenta zone migracije u poređenju sa netretiranom kontrolom (isprekidana linija). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$



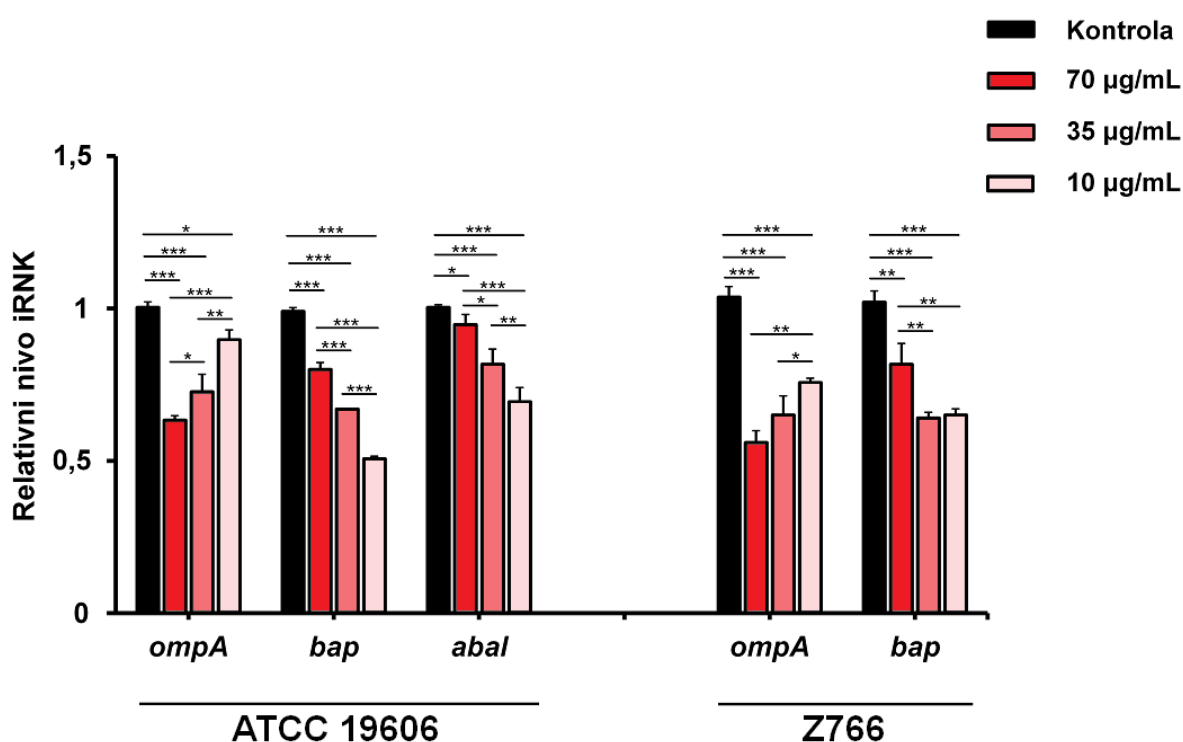
Slika 30. Inhibicija površinskog motiliteta pod uticajem halkona na primeru tri soja *A. baumannii*.



Slika 31. Inhibicija trzajućeg motiliteta pod uticajem halkona na primeru tri soja *A. baumannii*.

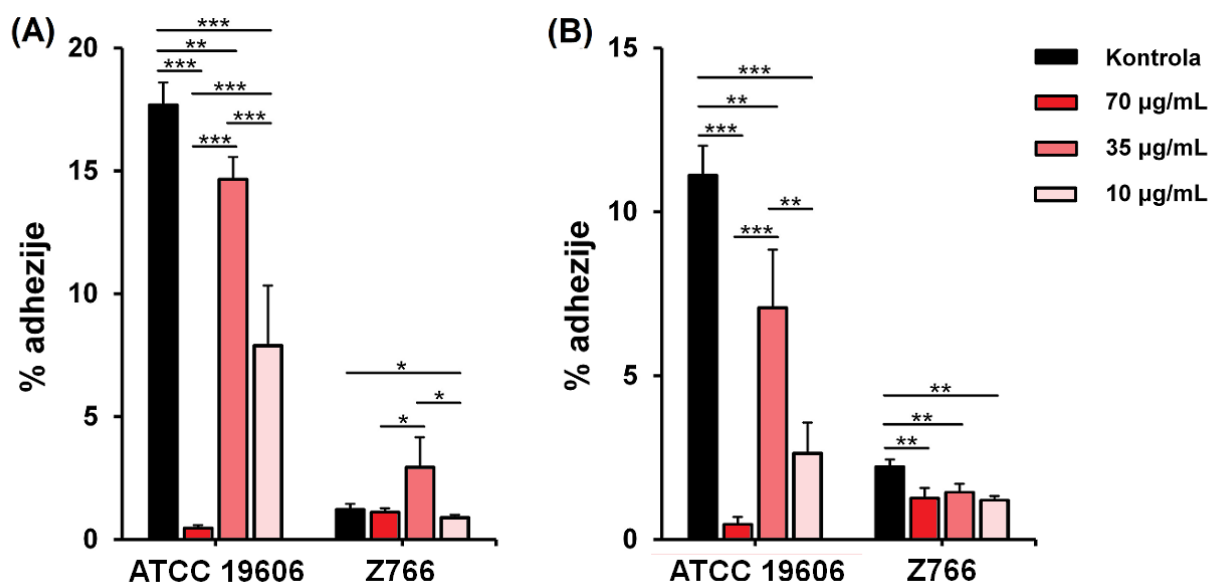
4.12. Antivirulentna aktivnost halkona o-OCH₃ protiv *A. baumannii*

Kao halkon koji je pokazao najpotentniju antibiofilmsku aktivnost protiv *A. baumannii* sojeva, o-OCH₃ je selektiran za ispitivanje uticaja na gensku ekspresiju faktora virulencije povezanih sa produkcijom biofilma kod *A. baumannii*: *ompA*, *bap* i *abaI* (Slika 32). Ispitivanje je sprovedeno sa tri sub-MIC (10, 35 i 70 µg/mL) o-OCH₃, na sojevima Z766 i ATCC 19606. Rezultati su pokazali da sve testirane koncentracije o-OCH₃ uzrokuju statistički značajnu nishodnu regulaciju ekspresije svih testiranih gena. Nivoi iRNK *ompA* gena, koji kodira protein povezan sa brojnim virulentnim osobinama *A. baumannii*, bili su smanjeni nakon inkubacije u prisustvu o-OCH₃, na dozno-zavisni način, pri čemu je koncentracija od 70 µg/mL indukovala 1,58x i 1,85x nishodnu regulaciju kod sojeva ATCC 19606, odnosno Z766. Zanimljivo, u slučaju gena *bap* i *abaI* postignuta je inhibicija ekspresije na obrnuto proporcionalni dozno-zavisni način. Ekspresija *Bap*-kodirajućeg gena kod ATCC 19606 bila je skoro dvostruko redukovana od strane 10 µg/mL o-OCH₃. Kada je u pitanju *abaI* gen, inkubacija ATCC 19606 soja u prisustvu 10 µg/mL o-OCH₃ rezultirala je 1,45x nishodnom regulacijom, dok kod Z766 nije detektovana ekspresija ovog gena.



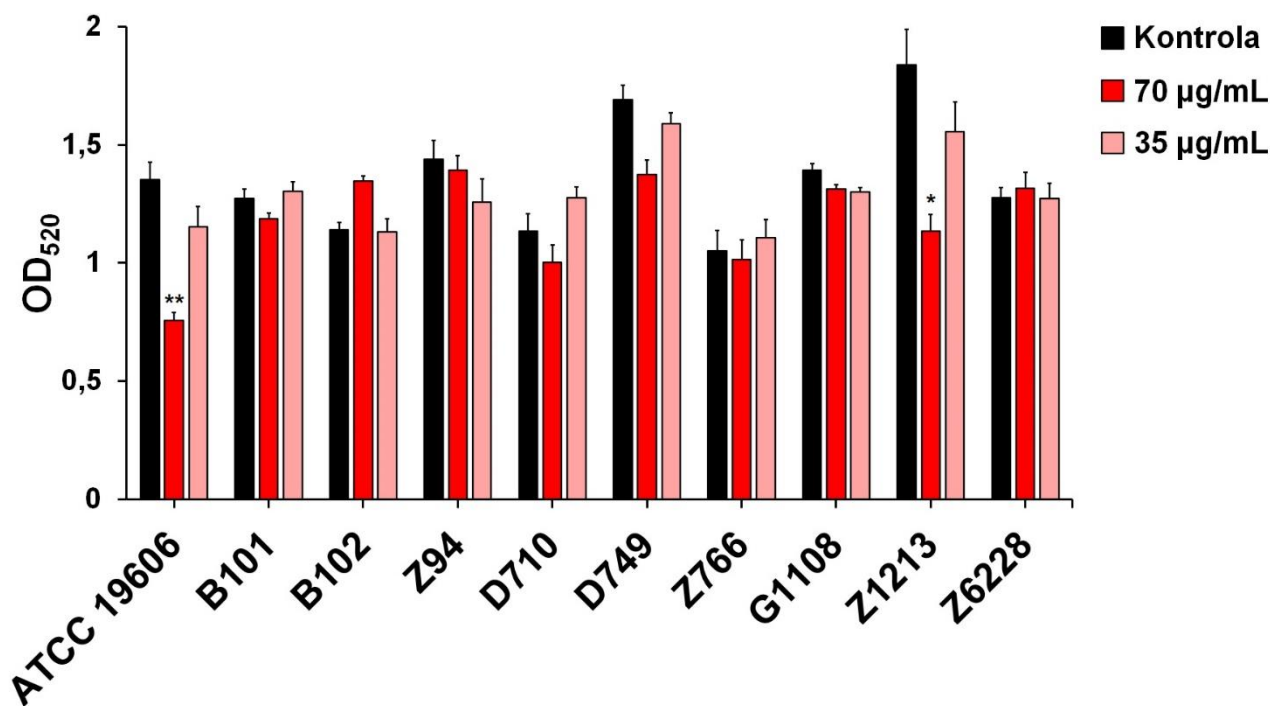
Slika 32. Relativna iRNK ekspresija *ompA*, *bap* i *abaI* gena kod dva soja *A. baumannii* tretiranih halkonom o-OCH₃ u koncentracijama 10-70 µg/mL. **P* <0,05, ***P* <0,01, ****P* <0,001

Sposobnost adhezije *A. baumannii* sojeva ATCC 19606 i Z766 tretiranih sa o-OCH₃ (10-70 µg/mL) testirana je posredstvom evaluacije afiniteta vezivanja za fibronektin i kolagen (Slika 33). Poređenjem rezultata kontrolnih grupa, može se primetiti da je soj ATCC 19606 pokazao je znatno veću sposobnost vezivanja za oba ECM proteina, pošto je nakon ispiranja, 11,1-17,6% ćelija ovog soja ostalo vezano za proteine, naspram 1,1-2,2% u slučaju soja Z766. Takođe, jača inhibicija adhezije od strane o-OCH₃ postignuta je u slučaju standardnog soja. Soj ATCC 19606 bio je gotovo u potpunosti lišen sposobnosti adhezije prilikom inkubacije u prisustvu 70 µg/mL o-OCH₃. Zanimljivo, najslabija inhibicija postignuta je sa 35 µg/mL. Što se tiče soja Z766, jedino je sposobnost vezivanja za kolagen bila statistički značajno redukovana od strane svih testiranih koncentracija o-OCH₃.



Slika 33. Procenat ćelija dva soja *A. baumannii* adheriranih za komponente ECM nakon tretmana različitim koncentracijama halkona o-OCH₃. (A) adhezija za fibronektin, (B) adhezija za kolagen. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Na kraju, ispitan je uticaj o-OCH₃ u koncentracijama od 35 i 70 µg/mL na produkciju 3-OH-C12-HSL molekula od strane *A. baumannii* (Slika 34). Rezultati su pokazali da je statistički značajna inhibicija postignuta jedino kod sojeva ATCC 19606 i Z1213 nakon inkubacije u prisustvu 70 µg/mL o-OCH₃. Kod ostalih sojeva, o-OCH₃ nije indukovao inhibiciju, ili je inhibicija bila minimalna. Najmanja produkcija AHL, poređenjem kontrolnih grupa, zabeležena je kod soja Z766. Budući da kod ovog soja prethodno nije detektovana ekspresija *abaI* gena zaduženog za indukciju translacije AHL-produkujućeg enzima, postoji mogućnost da izmerena OD₅₂₀ potiče od nekih drugih laktonskih molekula koji su bili prisutni u supernatantu kulture.



Slika 34. Produkcija AHL molekula od strane sojeva *A. baumannii*, pod uticajem o-OCH₃, izražena u obliku OD₅₂₀ vrednosti tamno braon obojenih feri-hidroksamat kompleksa. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

5. DISKUSIJA

A. baumannii, zajedno sa još četiri patogene (*A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. seifertii* i *A. dijkshoorniae*) i jednom nepatogenom vrstom (*A. calcoaceticus*), sačinjava Acb kompleks visoko srodnih mikroorganizama (Vijayakumar *et al.*, 2019). Precizna diferencijacija između ovih vrsta i definitivna identifikacija *A. baumannii* predstavlja veliki izazov za mikrobiologe. Prva identifikaciona šema za diferencijaciju između *Acinetobacter* vrsta, koju su predložili Buve i Grimon (Bouvet i Grimont, 1986), sastojala se od 28 fenotipskih testova, uključujući fiziološke, nutritivne i enzimske testove, a kasnije je dopunjena i testovima rasta na različitim temperaturama (37, 41 i 44 °C), hidrolize želatina, asimilacije izvora ¹⁴C i produkcije kiseline u metabolizmu glukoze (Peleg *et al.*, 2008). Uprkos tome što je šema obuhvatala veliki broj fenotipskih testova, to i dalje nije omogućavalo pouzdanu identifikaciju bakterija Acb kompleksa na nivou vrste, a pored toga sprovođenje tih testova nije pogodno za primenu u rutinskoj dijagnostičkoj praksi (Howard *et al.*, 2012). U kliničkim mikrobiološkim laboratorijama postoje brojni komercijalni automatizovani sistemi, poput API 20NE, VITEK 2, Phoenix, Biolog, MicroScan WalkAway i Accelerate Pheno™ system, koji se mogu koristiti u identifikaciji *Acinetobacter* spp. Zasnivaju se na različitim tehnologijama identifikacije, uključujući merenje rasta mikroorganizama posredstvom biohemijskih ili fizioloških parametara, produkcije CO₂, boje, turbiditeta, detekciju promena u fluorescenciji usled konzumacije biohemijskih ili ugljenohidratnih supstrata, merenje produkcije ili potrošnje toplote itd. Nijedan od ovih testova, međutim, ne pruža mogućnost diferencijacije između vrsta Acb kompleksa, što je i očekivano s obzirom da automatizovani testovi nisu posebno dizajnirani za identifikaciju *Acinetobacter* spp. i nisu sveobuhvatni po pitanju diferencijacionih testova (Peleg *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014b; Vijayakumar *et al.*, 2019). Identifikaciju *A. baumannii* na nivou vrste je moguće sprovesti primenom molekularnih dijagnostičkih testova. U pojedinim mikrobiološkim laboratorijama postoji mogućnost sprovođenja PCR amplifikacije specifičnih genskih targeta *A. baumannii*. U tom smislu mogu se koristiti prajmeri za 16S rRNK gene, 16S-23S rRNK intergenski region ITS (eng. *Internal Transcribed Spacer*), *rpoB*, *gyrB*, *recA*, ili *bla*_{OXA-51}, ili multipleks prajmeri za određene kombinacije navedenih gena. Nijedan od targeta ne pruža 100% specifičnost i senzitivnost, ali su se najpouzdanijim pokazali *rpoB*, *gyrB* i 16S-23S rRNK ITS region (Vijayakumar *et al.*, 2019). Su i saradnici (Soo *et al.*, 2013) su razvili i LAMP metodu amplifikacije (eng. *Loop-Mediated Isothermal Amplification*) 16S-23S rRNK ITS regiona, koja pruža 100x veću osetljivost u odnosu na multipleks PCR. Visoko preciznu i pouzdanu identifikaciju pruža ARDRA (eng. *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) metoda, koja podrazumeva primenu određenih kombinacija restrikcionih enzima na amplifikovane 16S rRNK gene (Vanechoutte *et al.*, 1995), kao i genomske komparativne analize, uključujući DDH i poređenje sličnosti određenih segmenata genoma nakon WGS (Vijayakumar *et al.*, 2019). Ove metode su ipak vrlo zametne i skupe, i nisu pogodne za primenu u dijagnostičkoj praksi. Kao najpraktičnija, visoko precizna metoda za dijagnozu članova Acb kompleksa na nivou vrste istakla se MALDI-TOF (eng. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) masena spektrometrija, koja je sve više zastupljena u kliničkoj praksi, a zasniva se na poređenju rezultata sa referentnim masenim spektrima iz baze podataka (Vijayakumar *et al.*, 2019; Garza-González *et al.*, 2020). Pokazan je uticaj metodoloških razlika u sprovođenju MALDI-TOF na senzitivnost i specifičnost identifikacije kada je u pitanju *A. baumannii*, pri čemu se najpouzdaniji rezultati dobijaju kada se za pripremu uzoraka koristi modifikovana ekstrakcija bakterijskih kolonija kombinacijom acetonitril-mravlja kiseline rastvarača (Vijayakumar *et al.*, 2019). Takođe, potencijalno visoko efikasna metoda za dijagnostiku *Acinetobacter* spp. na nivou vrste u rutinskoj praksi, zbog brzine, pristupačne cene i ekonomičnosti, mogla bi da bude FTIR spektroskopija, za koju su Souza i saradnici (Souza *et al.*, 2014) pokazali da pruža mogućnost diferencijacije između vrsta Acb kompleksa.

U okviru ove doktorske disertacije identifikovano je ukupno 43 kliničkih izolata *A. baumannii*. Sojevi su inicijalno identifikovani kao članovi Acb kompleksa primenom VITEK 2

sistema, da bi potvrda identifikacije *A. baumannii* na nivou vrste bila sprovedena kombinacijom nekoliko testova. Najpre su svi sojevi inkubirani na 44 °C, kako bi se sa >85% preciznošću eliminisala mogućnost prisustva *A. pittii*, *A. seifertii*, *A. dijkshoorniae*, ili eventualno *A. calcoaceticus* kao kontaminanta kliničkih uzoraka, koji ne rastu ili rastu <13% slučajeva na 44 °C (<https://apps.szu.cz/anemec/anemec.htm>). Radi dalje diferencijacije između *A. baumannii* (rast na 44 °C u 100% slučajeva) i *A. nosocomialis* (rast na 44 °C u 95% slučajeva) poređeni su FTIR spektri kultura izolata sa spektrom soja *A. baumannii* ATCC 19606 kao referentnog standarda, tako da se dobije visokospecifična identifikacija *A. baumannii* na nivou vrste. Dodatno, kod kolistin-rezistentnih sojeva, podvrgnutih WGS sekvenciranju, potvrda identifikacije je sprovedena i sekvenciranjem 16S rRNK gena.

Sojevi *A. baumannii*, sakupljeni u periodu 2017-2018 za potrebe ove disertacije, u najvećem broju slučajeva su izolovani kao uzročnici pneumonije, iz uzoraka donjeg respiratornog trakta (aspirat bronha, bris traheje, ili sputum) ili aspiracionog katetera. Veliki broj sojeva bio je izolovan i iz inficiranih rana i hemokultura, a pacijenti su u većem procentu bile žene prosečne starosti 67 godina. Gotovo identičnu strukturu demografskih podataka i porekla sojeva *A. baumannii* zabeležili su i Luković i saradnici (2020), koji su identifikovali ukupno 237 izolata *A. baumannii* od 280 sojeva inicijalno identifikovanih kao Acb kompleks, sakupljenih iz sedam različitih gradova sa teritorije cele Srbije u periodu od januara do juna 2018. godine. Sojevi su najčešće bili poreklom iz donjeg respiratornog trakta (aspirat traheje, aspirat bronha, ili sputum), ili iz eksudata rana i hemokulture. U ređim slučajevima sojevi su izolovani iz urinokulture ili sa vrha centralnog venskog katetera, a jedan soj je izolovan iz cerebrosposinalne tečnosti kao uzročnik meningitisa. Pacijenti su bili najčešće stariji muškarci, prosečne starosti 66 godina i najčešće su bili lečeni u jedinicama intenzivne nege nakon invazivnih hirurških zahvata. Takođe, u drugoj studiji, 332 izolata *A. baumannii* sakupljenih sa više različitih lokacija u Srbiji, Crnoj Gori i Bosni i Hercegovini, u periodu 2016-2017, najčešće su poticali iz kliničkih uzoraka donjeg respiratornog trakta, a nakon toga iz eksudata hirurških rana i hemokulture (Gajic *et al.*, 2020). U obe studije, prevalenca CRAB je iznosila >92%, što je u saglasnosti sa rezultatima našeg istraživanja, a zanimljivo MIC₅₀ karbapenema u te dve studije iznosio je 8-16 µg/mL, što je čak 4-8x manje u odnosu na MIC₅₀ karbapenema prema sojevima iz ove disertacije, doduše različita metoda (Etest) je korišćena za ispitivanje antimikrobne osetljivosti. Takođe, u skladu sa našim rezultatima, u obe studije su sojevi u >90% slučajeva bili rezistentni na antibiotike iz klasa cefalosporina, aminoglikozida i fluorohinolona. Manji procenat rezistencije zabeležen je na ampicilin/sulbaktam (<59%), tobramicin (<74%), tigeciklin (<25%) i kolistin, a zanimljivo u studiji Gajić i saradnika (2020), čak skoro 40% sojeva bilo je osetljivo na tetraciklin. Rezistencija na kolistin kod sojeva sakupljenih u periodu 2016-2017 iznosila je svega 2,1%, dok se procenat dvostruko povećao u slučaju sojeva sakupljenih 2018. godine (4,3%). Ovaj zabrinjavajući trend porasta rezistencije na polimiksine potvrđen je u našem istraživanju, gde je zabeležen još veći procenat rezistencije na kolistin (>18%) kod sojeva sakupljenih u približno istom periodu (prva polovina 2018. godine), ali je korišćen različit test ispitivanja antimikrobne osetljivosti (ComASP u odnosu na bujon-mikrodilucionu metodu). Osim toga, u obe studije je izračunat MIC₅₀ <0,25 µg/mL, odnosno više od četiri puta manji od MIC₅₀ kolistina prema sojevima iz ove disertacije.

Studije genotipizacije sojeva izolovanih 2018. godine u Srbiji, koje su sproveli Luković i saradnici (2020), pokazale su prisustvo tri ST tipa (ST2, ST492 i ST636) u približno istom odnosu. Izolati ST2 i ST492 tipa pripadaju široko rasprostranjenom IC II klonu, dok se izolati ST636 vode kao sporadični (Zarrilli *et al.*, 2013; Lukovic *et al.*, 2020). Molekularna karakterizacija ovih sojeva je dodatno sprovedena analizom prisustva OXA karbapenemaza. Svi izolati ST2 tipa sadržali su od stečenih jedino OXA-23-kodirajuće gene, i to *bla*_{OXA-23}, a izolati ST492 i ST636 tipova sadržali su *bla*_{OXA-72}, gen koji kodira oksacilinazu iz grupe OXA-40 enzima. Svi izolati sadržali su *bla*_{OXA-66} varijantu gena koji kodira intrinzičku, hromozomsku OXA-51 karbapenemazu. Enzimi OXA-40 i OXA-23 grupe bili su najprevalentniji i među pedijatrijskim CRAB izolatima iz Beograda,

sakupljenim u periodu 2012-2014. Pored toga, više od trećine ovih izolata produkovalo je i OXA-58 enzime (Novovic *et al.*, 2015), koji nisu zabeleženi među sojevima iz 2018. godine i koji su inače i na međunarodnom nivou sve ređe zastupljeni tokom poslednjih godina (Djahmi *et al.*, 2014; Rosales-Reyes *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018b). U skladu sa tim, ni kod izolata uključenih u naša istraživanja nisu pronađeni *bla*_{OXA-58} geni. Izolati ST2 tipa koji produkuju enzime OXA-23 ili OXA-40 grupa zabeleženi su kao predominantni u Srbiji i u studiji koju su sprovedeli Kostjanec i saradnici (Kostjanec *et al.*, 2021) na 137 CRAB sojeva izolovanih iz hemokulture u periodu 2016-2018. Od toga, izolati ST2/OXA-23 su globalno rasprostranjeni (Zarilli *et al.*, 2013), dok su izolati ST2/OXA-72 pronađeni samo u određenim državama, uglavnom Istočne Evrope i Bliskog Istoka (Srbija, Hrvatska, Poljska, Ukrajina, Litvanija i Liban) (Franolić-Kukina *et al.*, 2011; Povilonis *et al.*, 2013; Dagher *et al.*, 2019; Higgins *et al.*, 2020; Sloczynska *et al.*, 2021), kao i Južne Amerike (Brazil i Peru) (Vasconcelos *et al.*, 2015; Levy-Blitchtein *et al.*, 2018), premda je zabeleženo i širenje na Daleki Istok, uključujući Japan gde su izolati ST2/OXA-72 pronađeni na površini svežeg povrća (Soliman *et al.*, 2021). S druge strane, izolati ST492 tipa mnogo su ređe zastupljeni, prvi put opisani kod pacijenta iz Srbije koji je nakon komplikacija posle urinarne kateterizacije hospitalizovan u Francuskoj (Dortet *et al.*, 2016), i dugo se smatralo da su ograničeni samo na teritoriju Srbije (Lukovic *et al.*, 2020). U nedavnim studijama je potvrđeno prisustvo ST492 i među sojevima izolovanim u Mađarskoj u periodu 2012-2017 (Balazs *et al.*, 2021), kao i u Hrvatskoj, Rumuniji i Crnoj Gori u periodu 2016-2018 (Lukić-Grić *et al.*, 2019; Kostjanec *et al.*, 2021). Dorte i saradnici (Dortet *et al.*, 2016) su na inicijalno izolovanom soju *A. baumannii* ST492 iz urinokulture, koji su nazvali MAL, odredili da poseduje XDR profil rezistencije, odnosno osetljiv je bio samo na tigecklin i kolistin, i detaljno su analizirali rezistom nakon sprovedenog WGS. Rezistom se definiše kao skup genskih determinanti rezistencije na antibiotike, antiseptike i teške metale u okviru jednog genoma (D'Costa *et al.*, 2006). Oni su odredili da je rezistencija na karbapeneme kod ovog soja prvenstveno bila posredovana hiperekspresijom intrinzičke hromozomske ADC-25 cefalosporinaze, usled insercije *ISAbal* uzvodno od kodirajuće sekvence, kao i prisustvom stečene plazmidske OXA-72 karbapenemaze. Prisustvo *bla*_{OXA-72} gena kod izolata ST492 tipa je kasnije potvrđeno i među izolatima iz perioda 2016-2018, od kojih su neki izolati sadržali i MBL karbapenemazu NDM-1 (Lukovic *et al.*, 2020; Kostjanec *et al.*, 2021). Zanimljivo, kod izolata ST492 tipa obuhvaćenog u našem istraživanju (D1010), nije pronađen *bla*_{OXA-72} gen, već je soj proizvodio OXA-23 karbapenemazu, što je karakteristika izolata ST2 tipa. Štaviše, soj D1010 ispoljio je visok nivo rezistencije na kolistin, baš kao i pet sojeva ST2 (D650, D749, D811, D1002 i D441) izolovanih u istom periodu, u istoj zdravstvenoj ustanovi (KBC Dragiša Mišović), na osnovu čega se može zaključiti da je između ovih sojeva došlo do HGT, što je rezultiralo i modifikacijom u rezistomu. Sa izuzetkom razlike u OXA enzimima, soj D1010 posedovao je skoro identičan rezistom kao i MAL soj (uz odsustvo *aph(3')-VIa* gena u D1010, koji se verovatno u međuvremenu izgubio), što ukazuje na njihovo zajedničko poreklo. Kod oba soja je detektovana OXA-66 varijanta hromozomske OXA-51 grupe karbapenemaza, ali Dorte i saradnici nisu pronašli prisustvo *ISAbal* uzvodno od *bla*_{OXA-66} gena što je indikativno za bazalnu ekspresiju i odsustvo učešća ovog tipa enzima u rezistenciji na karbapeneme. Kao i u slučaju MAL soja, ni kod D1010 soja nisu pronađeni stečeni geni odgovorni za rezistenciju na fluorohinolone, ali su Dorte i saradnici detektovali mutacije u *GyrA* i *ParC* koje najverovatnije posreduju u rezistenciji (Gu *et al.*, 2015). Drugu liniju kolistin-rezistentnih sojeva identifikovanih u našoj studiji, činili su ST2 sojevi izolovani u tri različite zdravstvene ustanove u Beogradu, za koje je PFGE analizom i analizom pan-genoma pokazan visok nivo srodnosti. Svi sojevi su od stečenih karbapenemaza-kodirajućih gena posedovali samo *bla*_{OXA-23} gene, a ostatak rezistoma se razlikovao jedino kod sojeva G1812 (odsustvo *aph(3')-VIa* gena), izolovanog u GAK KCS, a zanimljivo i D441 (odsustvo *aph(3')-VIa*, *msr(E)*, *mph(E)* i *armA*) izolovog kao i većina ostalih kolistin-rezistentnih sojeva u KBC Dragiša Mišović. Budući da je soj D441 sadržao sličnu kompoziciju AME enzima kao i ostali sojevi, od kojih se razlikovao jedino po odsustvu 16S rRNK metilaza-kodirajućeg gena (*armA*), može se zaključiti da je ovaj enzim imao ključan doprinos u rezistenciji ostalih kolistin-rezistentnih sojeva na aminoglikozide. Posledično, soj D441 jedini nije klasifikovan kao PDR prema profilu

rezistencije. Kod ovog soja nisu detektovani ni *msr(E)* i *mph(E)* geni koji kodiraju rezistenciju na makrolide, međutim ćelije *A. baumannii* su intrinzički rezistentne na makrolide zbog niske permeabilnosti ćelijskog zida, i prisustvo ovih gena nije presudno u determinaciji rezistencije na makrolide (Dortet *et al.*, 2016). Interesantan, a istovremeno i zabrinjavajući podatak, proistekao iz rezultata našeg istraživanja, jeste da je PDR soj B103, visoko srodnog genotipa sa ostalim PDR sojevima iz KBC Dragiša Mišović, izolovan u vanbolničkoj ustanovi, što ukazuje na mogućnost da je *A. baumannii* univerzalno rezistentnog fenotipa, potencijalno unet u vanbolničku sredinu. Takvi slučajevi su i prethodno zabeleženi, i sojevi rasprostranjenih multirezistentnih bolničkih ST tipova često se mogu pronaći u životnoj sredini, gde se, zahvaljujući visokoj toleranciji na desikaciju i formaciji robusnih biofilmova, mogu održati tokom dugih perioda na neživim predmetima sa kojima ljudi ostvaruju direktan kontakt (Soliman *et al.*, 2021). Pored toga, ovi sojevi su pokazali i sposobnost infekcije raznih domaćih životinja i kućnih ljubimaca (Pomba *et al.*, 2014; Herivaux *et al.*, 2016; Ewers *et al.*, 2017; Klotz *et al.*, 2018). Tako su Mišić i saradnici (2018) izolovali *A. baumannii* ST1 tipa sa PDR profilom rezistencije iz biološkog uzorka jednog psa u Srbiji, primljenog u privatnu veterinarsku kliniku 2016. godine. Prisustvo nekoliko ST1 sojeva detektovali su i Kostjanev i saradnici (2021) među kliničkim izolatima iz srpskih bolnica sakupljenih od 2016. do 2018. godine. Ovi podaci ukazuju na mogućnost cirkulacije nekoliko univerzalno rezistentnih sojeva različitih ST tipova u životnoj sredini na prostoru Srbije.

Kao što je u uvodu navedeno, rezistencija na kolistin je najčešće posredovana prekomernom produkcijom PEtn transferaza, uglavnom PmrC, a u ređim slučajevima EptA ili *mcr*-kodiranim PEtn transferazama, ili gubitkom LOS usled mutacione inaktivacije *lpxA*, *lpxC*, ili *lpxD* lipid A biosintetičkih gena, što je manje zastupljeni mehanizam (Kyriakidis *et al.*, 2021). Komparativnom i transkripcionom analizom sekvenci *lpxACD* i *pmrCAB* operona kolistin-rezistentnih sojeva identifikovanih u okviru ove studije i kolistin-osetljivog ATCC 19606 soja, detektovani su potencijalni mehanizmi rezistencije na kolistin. Aminokiselinske alteracije pronađene su u okviru PmrB senzor kinaze i PmrC PEtn transferaze, sistema koji učestvuju u modifikaciji LOS, kao i u okviru LpxC i LpxD, LOS biosintetičkih enzima. Alteracije A444V (svi izolati) i A138T (ST2 izolati) u PmrB proteinu su, međutim, prethodno primećene i kod mnogih kolistin-osetljivih sojeva, tako da se ne mogu povezati sa učešćem u rezistenciji na kolistin (Oikonomou *et al.*, 2015; Nhu *et al.*, 2016; Nurtop *et al.*, 2019; D'Onofrio *et al.*, 2020; Jovcic *et al.*, 2021). S druge strane, izolat D1010 je sadržao i dodatne mutacije u okviru regiona koji odgovara domenu histidin kinaze PmrB proteina (R263L i H266L) (Nhu *et al.*, 2016), koji je često izmenjen kod kolistin-rezistentnih izolata (Arroyo *et al.*, 2011; Lesho *et al.*, 2013; Cafiso *et al.*, 2019; Nutrop *et al.*, 2019; Jovcic *et al.*, 2021), tako da se može pretpostaviti da su ove mutacije doprinele rezistenciji na kolistin. Osim toga, PmrB soja D1010 sadržao je i T68N mutaciju, koja nije opisana u postojećoj literaturi, i njenu potencijalnu ulogu u rezistenciji neophodno je ispitati. Aminokiselinske supstitucije identifikovane u okviru PmrC proteina (F166L, I228V, R348K, A370S i K531T), takođe su prethodno opisane, ali bez definisanog doprinosa rezistenciji na kolistin (Jovcic *et al.*, 2021). Svi izolati su sadržali identične aminokiselinske alteracije u okviru LpxC (N287D) i LpxD (E117K) proteina, prethodno detektovane i kod mnogih kolistin-osetljivih sojeva, tako da najverovatnije nemaju ulogu u rezistenciji na kolistin (Oikonomou *et al.*, 2015; Nutrop *et al.*, 2019; Jovcic *et al.*, 2021). Transkripcionim analizama je međutim otkrivena značajna nishodna regulacija gena koji kodiraju ove proteine (*lpxC* i *lpxD*), kao i *lpxA*, što kao posledicu ima značajno smanjenu produkciju LOS, i to se takođe može smatrati potencijalnim mehanizmom rezistencije na kolistin (Moffatt *et al.*, 2010; Jovcic *et al.*, 2021). S druge strane, iznenađujući rezultat jeste značajna inhibicija ekspresije *pmrC*, *pmrA* i *pmrB* gena, s obzirom da je najčešće prisutna hiperekspresija ovih gena kod kolistin-rezistentnih *A. baumannii* sojeva (Adams *et al.*, 2009; Beceiro; 2011). Učešće *eptA*- i *mcr*-kodiranih PEtn transferaza u rezistenciji na kolistin nije pokazano, iako je EptA pronađena kod tri kolistin-rezistentna soja, ali bez neophodnog prisustva *ISAbal* uzvodno od *eptA* genske sekvence.

Sposobnost perzistencije *A. baumannii* u bolničkoj sredini, koja je omogućila globalno širenje multirezistentnih klonova, velikim delom potiče od proizvodnje robusnih biofilmova i tolerancije na dezinfekciona sredstva. Dezinfekciona sredstva se opsežno koriste u bolničkoj sredini, topikalno u svrhu higijene ruku i dekolonizacije kože i rana (antiseptici), kao i za uklanjanje vijabilnih mikroorganizama sa neživih predmeta i površina (dezinficijensi u užem smislu reči) (Harbarth *et al.*, 2014). Uprkos tome što primena dezinficijensa i antiseptika predstavlja visoko efektivan metod kontrole transmisije multirezistentnih nozokomijalnih patogena, činjenica da učestala neracionalna i nepravilna upotreba ovih sredstava može značajno uticati na epidemiološku situaciju, često je zanemarena (Meyer i Cookson, 2010; Harbarth *et al.*, 2014). Naime, u praksi dezinfekciona sredstva se često nanose u subefektivnim koncentracijama usled pogrešnog rukovanja (prekomerno razblaživanje, izostanak direktnog kontakta preporučene koncentracije sa mestom inokulacije, neusklađenost dezinfekcije i brisanja vlage koja pogoduje razvoju biofilmskih struktura itd.) (Heinzel, 1998, Weber *et al.*, 2007; Meyer i Cookson, 2010), što dovodi do raznošenja vijabilnih mikroorganizama sa inicijalne tačke kontaminacije na okolne površine prilikom brisanja, a takođe pruža mogućnost selekcije rezistentnih sojeva (Russell, 2004; Bergen *et al.*, 2009). S druge strane, mikroorganizmi mogu posedovati ili razviti rezistenciju na dezinfekciona sredstva, koja se odnosi na sposobnost preživljavanja mikroorganizama u prisustvu ispravno primenjenih dezinficijensa u koncentracijama koje se inače smatraju mikrobicidnim (Maillard, 2013; Harbarth *et al.*, 2014). Rezistencija može poticati od urođene karakteristike (npr. struktura ćelijskog zida) određene vrste mikroorganizma koja je čini manje osetljivom na specifične dezinficijense (intrinzička rezistencija), kao i od određene faze životnog ciklusa (npr. biofilm, spora) u kome se ćelija nalazi, ili fenotipskog stanja indukovano izlaganjem inicijalno suboptimalnim koncentracijama dezinficijensa (fenotipska tolerancija) (Russell, 2004). Gram-negativne bakterije inače poseduju intrinzički manju osetljivost na dezinfekcione supstance kao što su heksahlorofen, diamidin, kvaternerna amonijumova jedinjenja i triklozan, zbog specifične strukture ćelijskog zida i prisustva hidrofobne spoljašnje membrane, a kao posebno rezistentan rod istakao se *Pseudomonas* spp. koji može da perzistira ili čak i da se razmnožava u prisustvu visokih koncentracija određenih dezinfekcionih sredstava (Inoue i Horikoshi, 1989; Russell, 1999). Jedan od ekstremnih primera jeste i pronalazak vijabilnih ćelija *Serratia marcescens* izolovanih iz otirača za noge natopljenog visoko koncentrovanim amfoteričkim dezinficijensom, koje su nakon izolacije pokazale i mogućnost razmnožavanja u mikrobicidnim koncentracijama tog istog dezinficijensa, a ujedno su bile rezistentne i na benzalkonijum hlorid (Langsrud *et al.*, 2003). Iako autori nisu uradili analizu na molekularnom nivou, vrlo je verovatno da se radi o primeru fenotipske tolerancije, proistekle zbog prisustva veće količine organskih materija u otiraču, koja je uzrokovala da prisutne koncentracije budu subefektivne. Ovaj primer ujedno ukazuje na važnost uklanjanja prljavštine prilikom dezinfekcije površina, što je još jedan aspekt koji se često zanemaruje u praksi (Meyer i Cookson, 2010). Ipak, najveći razlog za zabrinutost predstavlja širenje genski posredovane, stečene rezistencije na dezinfekciona sredstva. Dezinfekcione supstance pripadaju mnogim grupama sa različitim mehanizmima mikrobicidnog dejstva, tako da su specifični mehanizmi stečene rezistencije ređe zastupljeni i većinom su posredovani efluksnim pumpama (Maillard, 2018). Posebno su rasprostranjeni plazmidski *qac* geni, inkorporirani u okviru integrona klase I, koji kodiraju rezistenciju na različita dezinfekciona sredstva, pre svega kvaternerna amonijumova jedinjenja i hlorheksidin, od kojih su *qacE* i *qacEAI* varijante najzastupljenije kod Gram-negativnih patogena (Kucken *et al.*, 2000; Buffet-Bataillon *et al.*, 2016). Osim toga, brojne efluksne pumpe odgovorne za rezistenciju multirezistentnih sojeva na različite klase antibiotika, istovremeno vrše efluks određenih dezinfekcionih supstanci, što ukazuje na postojanje unakrsne rezistencije (Maillard, 2018), stoga, moguće je da prečesto izlaganje subefektivnim koncentracijama dezinficijensa može indukovati selekciju multirezistentnih sojeva (McBain i Gilbert, 2001). Unakrsnu rezistenciju može promovisati i fenotipska tolerancija na dezinficijense u vidu modifikacija u metabolizmu i kompoziciji porina ćelijskog zida (Maillard, 2018), a takođe, na primeru *Listeria monocytogenes* pokazano je da aplikacija subletalnih koncentracija dezinficijensa može indukovati ekspresiju određenih faktora virulencije (Kastbjerg *et al.*, 2010). Sveobuhvatno,

postoji opravdana sumnja da je opsežna i često neracionalna primena dezinfekcionih sredstava u bolničkoj sredini promovisala širenje sojeva koji su virulentniji i rezistentniji na antibiotike (Meyer i Cookson, 2010). Imajući u vidu da se tokom poslednjih godina upotreba dezinfekcionih sredstava znatno povećala na mnogim mestima, uključujući zdravstvene ustanove, kozmetičke industrije i domaćinstva, gde je primena vrlo često bez jasne indikacije i nepravilna, jasno je da ovoj problematici ubuduće mora ozbiljnije da se pristupi (Harbarth *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2021).

Osetljivost bolničkih sojeva *A. baumannii* na dezinfekciona sredstva daleko je manje ispitivana u poređenju sa osetljivošću na antibiotike. Prvi objavljeni radovi na ovu temu pokazali su da su sojevi *A. baumannii* osetljivi na dezinficijense i antiseptike, koji se često koriste u praksi (60% propanol, polivinilpirolidon jodid, triklozan, 4% hlorheksidin glukonat, natrijum tozil hloramid, i komercijalne kombinacije alkohola sa različitim dezinfekcionim supstancama), kada se primene u upotrebnim koncentracijama u skladu sa preporukama. Takođe, pokazali su da nema značajne razlike između osetljivosti epidemijskih, sporadičnih i standardnih sojeva *A. baumannii*, sakupljenih tokom '90-ih godina (Martro *et al.*, 2003; Wisplinghoff *et al.*, 2007). Ipak, u oba rada pokazano je da sa razblaživanjem ispitivanih dezinfekcionih sredstava, efikasnost mikrobicidne aktivnosti naglo opada. Martro i saradnici (2003) su pokazali da subefektivnost uzrokuje i blago razblaživanje raznih komercijalnih antiseptika za dezinfekciju ruku, što je čest slučaj u praksi, da se nakon pranja sapunom i vodom, ruke u potpunosti ne osuše pre aplikacije dezinfekcionog sredstva. Wisplinghoff i saradnici (Wisplinghoff *et al.*, 2007) su pokazali da pri većim razblaženjima svih ispitivanih antiseptika u većini slučajeva izostaje kompletna inhibicija, odnosno smanjenje ispod 3 log₁₀ CFU/mL kako su definisali mikrobicidnu efektivnost. Kawamura-Sato i saradnici (Kawamura-Sato *et al.*, 2010) su dalje na izolatima (epidemijskim i sporadičnim) s početka 2000-ih godina takođe pokazali izostanak veze između multirezistencije i osetljivosti na dezinfekciona sredstva, ali su identifikovali 10% izolata sa smanjenom osetljivošću na dezinficijense, od kojih su svi bili multirezistentni. Oni su takođe pokazali da se mikrobicidna aktivnost dezinficijensa kao što su benzetonijum hlorid, benzalkonijum hlorid i alkil diaminoetil glicin hidrohlorid znatno smanjuje u prisustvu organskog materijala (u studiji testiran u vidu 3% BSA). Od testiranih dezinfekcionih sredstava jedino je 4% hlorheksidin glukonat zadržao mikrobicidnu efikasnost, ali su autori dalje pokazali da repetitivne pasaže sojeva pri koncentraciji koja odgovara 1/2 MIC, dovode do razvoja fenotipske tolerancije i neosetljivosti na hlorheksidin (Kawamura-Sato *et al.*, 2008). Iako su multirezistentni sojevi pokazali samo redukovanu osetljivost na ispitane dezinficijense (mikrobicidna aktivnost i dalje postoji u slučaju pravilne primene), kada se uzme obzir da se u praksi dezinfekciona sredstva vrlo često subdozirano primenjuju, usled nepravilne upotrebe ili kontaminacije organskim materijalom, jasno je da to može pružiti selektivnu prednost lozama multirezistentnih sojeva u odnosu na sojeve koji su osetljiviji na dezinficijense. To je potvrđeno u kasnijim studijama sa novijim bolničkim sojevima *A. baumannii*, jer je pokazana statistički značajna povezanost između multirezistencije i redukovane osetljivosti na hlorheksidin glukonat, hlorheksidin diglukonat, triklozan i benzalkonijum hlorid i benzetonijum hlorid, dezinfekcione supstance koje su ujedno dobri supstrati za efluksne pumpe (Fernández-Cuenca *et al.*, 2015; Hayashi *et al.*, 2017). Fernandez-Kuenka i saradnici (Fernandez-Cuenca *et al.*, 2015) su dodatno pokazali povezanost između ushodne regulacije gena koji kodiraju komponente AdeABC i AmvA efluksnih pumpi i prethodnog izlaganja sub-baktericidnim koncentracijama navedenih dezinfekcionih supstanci, a takođe su primetili nishodnu regulaciju porina (CarO, OmpA, ili Omp33-36) u određenim slučajevima. Konačno, u studijama sprovedenim u Maleziji i Kini sa multirezistentnim, odnosno karbapenem-rezistentnim sojevima *A. baumannii*, pokazano je prisustvo *qacE* i *qacEΔ1* gena u visokim procentima (30%-73% *qacE* i 77% *qacEΔ1*). Sojevi koji su sadržali *qacE* ispoljili su značajno smanjenu osetljivost (u vidu porasta MIC vrednosti) na dezinfekcione supstance poput hlorheksidin glukonata, benzalkonijum bromida i benzetonijum hlorida, dok isti rezultat nije pokazan u slučaju sojeva koji su sadržali *qacEΔ1* varijantu gena (Babaei *et al.*, 2015; Guo i Li, 2019). U našoj studiji, *qacE* geni su detektovani kod svih osam sekvenciranih kolistin-rezistentnih izolata (100%), što ukazuje na verovatnoću da su i u bolnicama u Beogradu

rasprostranjeni sojevi sa redukovanom osetljivošću prema dezinfekcionim sredstvima, kao posledica selektivnog pritiska zbog kontinuiranog izlaganja subefektivno primenjenim sredstvima sa hlorheksidinom, kvaternernim amonijumovim jedinjenjima, ili drugim katjonskim površinski aktivnim supstancama.

Čest oblik infekcije izazvane vrstom *A. baumannii*, treći po incidenci posle pneumonije i bakterijemije, jeste infekcija dubokih rana, pre svega teških opekotina, i hirurških i dijabetesnih rana (Wong *et al.*, 2017; Zurawski *et al.*, 2019). Antiseptici koji se koriste za tretman rana razlikuju se po sastavu ili se primenjuju u znatno nižoj koncentraciji u odnosu na antiseptike za dekolonizaciju kože. Na primer, hlorheksidin se zbog citotoksičnosti primenjuje u koncentraciji od 0,05% (1:80 razblaženje 4% hlorheksidina) (Atiyeh *et al.*, 2009), kojom se često ne postiže mikrobicidna aktivnost protiv *A. baumannii* (Wisplinghoff *et al.*, 2007; Kawamura-Sato *et al.*, 2010; Fernandez-Cuenca *et al.*, 2015; Hayashi *et al.*, 2017; Guo i Li, 2019). Između ostalih antiseptika za tretman rana, često se koriste i rastvori 3% borne kiseline ili 0,1% etakridin laktata (Wainwright, 2001; Drosou *et al.*, 2003; Reinhardt *et al.*, 2005; Atiyeh *et al.*, 2009; Tepedelen *et al.*, 2016). Mikrobicidna aktivnost ovih antiseptika protiv multirezistentnih kliničkih izolata *A. baumannii* po prvi put je ispitana u okviru ove doktorske disertacije. Kako su testirani sojevi (svi izolati iz rana i ATCC 19606 soj) pokazali sposobnost perzistencije tokom kratkog izlaganja navedenim antisepticima, dalji testovi su bili usmereni ka ispitivanju sposobnosti perzistencije tokom dužih vremenskih perioda (2 i 24 h). Naime, postoje brojni primeri bolničkih epidemija uzrokovanih kontaminacijom dezinfekcionih sredstava multirezistentnim bakterijskim vrstama poput *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *S. marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* i drugih (Weber *et al.*, 2007). U skladu sa tim, ideja našeg istraživanja bila je da se ispita mogućnost nastanka potencijalne bolničke epidemije kao posledica kontaminacije preparata 3% borne kiseline ili 1% etakridin laktata multirezistentnim sojevima *A. baumannii*. Rezultati naših analiza su pokazali da takva mogućnost zaista postoji, pošto je 100%, odnosno 62% testiranih izolata preživelo inkubaciju tokom 2 h u 3% bornoj kiselini, odnosno 0,1% etakridin laktatu. Osim toga, 77% izolata je preživelo u 3% bornoj kiselini tokom čitavih 24 h, a tri soja su pokazala čak i sposobnost razmnožavanja u ovom dezinfekcionom sredstvu, što je prethodno pokazano za druge Gram-negativne patogene poput *P. aeruginosa* i *S. marcescens* u različitim dezinfekcionim sredstvima (Carson *et al.*, 1972; Langsrud *et al.*, 2003). Sposobnost perzistencije *A. baumannii* u 0,1% rastvoru etakridin laktata bila je mnogo manja pošto je samo jedan izolat preživeo tokom 24 h, a i nakon 2 h se broj kolonija kod 92% izolata smanjio ispod 3 log₁₀ CFU/mL, što su određeni autori tumačili kao mikrobicidnu efektivnost (Wisplinghoff *et al.*, 2007). Moguće je da ovoj perzistenciji doprinosi ushodna regulacija AmvA efluksne pumpe, za koju je pokazano da vrši efluks jedinjenja sličnih etakridinu, kao što su akrudin narandžasto i akriflavin (Rajamohan *et al.*, 2010), a mogućnost kontaminacije komercijalnih proizvoda sa etakridin laktatom je i ranije zabeležena na primeru *Burkholderia* spp. (Oie i Kamiya, 1996). Pored antiseptika, ispitali smo i mogućnost perzistencije *A. baumannii* u fiziološkom rastvoru koji se u praksi koristi za ispiranje rana (Griffiths *et al.*, 2001) i pokazali 100% preživljavanje nakon 24 h, što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima (Infante *et al.*, 2012). Jedan soj je pokazao i mogućnost razmnožavanja, što je takođe prethodno demonstrirano u slučaju drugih multirezistentnih bakterijskih vrsta kao što su *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* i *Enterobacter aerogenes*, koji su pokazali sposobnost rasta u destilovanoj vodi ili fiziološkom rastvoru (Favero *et al.*, 1971; Kongsamran i Dhiraputra, 1972; Infante *et al.*, 2012). Na kraju, ispitali smo mogućnost perzistencije u 1% rastvoru klindamicina koji se topikalno koristi u tretmanu akni, radi procene mogućnosti kontaminacije sredstava sa antimikrobnim jedinjenjima različitog mehanizma dejstva (inhibicija sinteze proteina vezivanjem za 50S subjedinicu ribozoma) (Kasten, 1999; Gold *et al.*, 2005). Rezultati su pokazali da preparat 1% klindamicina ima najjaču baktericidnu aktivnost protiv *A. baumannii* od svih ispitivanih sredstava, pošto je samo 38% sojeva preživelo inkubaciju tokom 2 h (svi ispod 3 log₁₀ CFU/mL), a nijedan tokom 24 h. Studije sa dezinfekcionim sredstvima zaokružili smo ispitivanjem eventualne povezanosti između nivoa produkcije biofilma i sposobnosti perzistencije *A. baumannii* u

fiziološkom rastvoru ili antisepticima. Naime, u postojećoj literaturi mogu se pronaći radovi koji ukazuju da produkcija biofilma može povećati otpornost prema dezinfekcionim sredstvima (hlorheksidin i kvaternerna amonijumova jedinjenja), a takođe pokazana je i mogućnost inhibicije produkcije biofilma pomoću određenih antiseptika (oktenidin dihidrohlorid) (Narayanan *et al.*, 2016; Ivanković *et al.*, 2017). Ipak, takva vrsta povezanosti u slučaju naših analiza nije primećena. Dok je kod nekih sojeva produkcija biofilma znatno porasla, kod drugih je došlo do jake inhibicije, nezavisno od testiranog preparata. Može se smatrati da je to posledica uticaja na ekspresiju različitih genskih segmenata, a uzevši u obzir visoko varijabilan genom *A. baumannii*, posebno u delu koji kodira faktore virulencije koji su usko povezani sa produkcijom biofilma, a takođe da je produkcija biofilma multifaktorski regulisana, logično je očekivati da će različiti sojevi reagovati na različite načine u smislu produkcije biofilma, pod uslovom da neka zajednička komponenta nije targetirana (Colquhoun i Rather, 2020).

A. baumannii spada među patogene koji mogu proizvoditi značajne količine biofilma. Biofilm doprinosi sposobnosti perzistencije u spoljašnjoj sredini i pre svega toleranciji na desikaciju, i samim tim mogućnosti diseminacije epidemijskih multirezistentnih sojeva *A. baumannii* (Vidal *et al.*, 1996; Roca *et al.*, 2012; Espinal *et al.*, 2012). Osim toga, biofilm kao zatvorena struktura od polimernog matriksa pruža protektivni mehanizam ćelijama *A. baumannii* od antimikrobnih stresora i antibiotika tokom infekcije humanog domaćina, i kao takav je potencijalno važan faktor virulencije (Espinal *et al.*, 2012). Čapartegi-Gonzalez i saradnici (Chapartegi-Gonzalez *et al.*, 2018) pokazali su da sojevi koji proizvode veće količine biofilma mogu da prežive u nutritivno limitiranim uslovima čak 60 dana, nakon čega u slučaju rehidracije, mogu još dodatno intenzivirati produkciju biofilma. Takođe, pokazano je da članovi Acb kompleksa u proseku proizvode trostruko više biofilma u odnosu na druge *Acinetobacter* vrste koje su slabi patogeni i retko su zastupljene u bolničkim sredinama (*A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*, *A. junii*) (Marti *et al.*, 2011). Od toga, ubedljivo najveće količine mogu da proizvedu *A. baumannii* i *A. nosocomialis*. Različite studije zabeležile su različite procenatne biofilmskih proizvođača među *A. baumannii* bolničkim izolatima, zavisno od geografskog područja i filogenetskog porekla. Od sojeva, pripadajućih sporadičnim ST tipovima, izolovanih u bolnicama u Hong Kongu, svega 60% proizvodilo je biofilm (Shenkutie *et al.*, 2020). Takođe, Eze i Zovalati (Eze i Zowalaty, 2019) su među sojevima izolovanim iz spoljašnje sredine (uzorci vode) urbanih i ruralnih bolnica Južne Afrike detektovali čak 32% sojeva koji ne proizvode biofilm. U našoj studiji, od 43 kliničkih izolata, samo jedan izolat nije proizvodio biofilm. Među proizvođačima biofilma, čak 45% pripadalo je SP tipu, 39% MP tipu, a 14% sojeva je slabo produkovalo biofilm (WP tip). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima ispitivanja produkcije biofilma 154 klinička izolata iz tajvanske bolnice, gde je 45% sojeva bilo SP tipa, 32% MP tipa, a 16% WP tipa (Yang *et al.*, 2019). Osim toga, nekoliko studija je pokazalo da sojevi koji pripadaju IC II klonu (pre svega sojevi ST2 tipa) proizvode veće količine biofilma od sporadičnih izolata i sojeva koji pripadaju ostalim klonskim lozama (Giannouli *et al.*, 2013; Vijayakumar *et al.*, 2016). Uzimajući u obzir da su sojevi IC II klona rasprostranjeni u Jugoistočnoj Evropi (Nafplioti *et al.*, 2020) i da su među sekvenciranim kolistin-rezistentnim sojevima iz naše studije svi pripadali IC II klonu (sedam ST2 i jedan ST492), identifikacija velikog procenta biofilmskih proizvođača u našoj studiji može se smatrati očekivanom. To potvrđuju i rezultati studije koju su sproveli Vukotić i saradnici (2020), gde je >90% od 103 kliničkih izolata, prikupljenih iz različitih bolnica u Srbiji, proizvodilo veće količine biofilma. Podaci da biofilm značajno doprinosi toleranciji na desikaciju, kao i da je produkcija biofilma znatno veća kod *A. baumannii* u poređenju sa drugim *Acinetobacter* vrstama, a zatim još veća kod epidemijskih sojeva pripadajućih IC II klonu, idu u prilog hipotezi da produkcija biofilma spada među ključne osobine koje su omogućile vrsti *A. baumannii* da postane perzistentan i rasprostranjen bolnički patogen (Roca *et al.*, 2012). Naši rezultati takođe pokazuju da sojevi koji su izolovani iz mesta koje je više izloženo spoljašnjoj sredini (kateteri, rane) proizvode veće količine biofilma u odnosu na sojeve izolovane iz unutrašnjosti humanog organizma. Najmanje količine biofilma proizvodili su izolati iz hemokulture što je u skladu sa rezultatima Vidžajakumar i

saradnika (Vijayakumar *et al.*, 2016). Kada je reč o uticaju biofilma *A. baumannii* u *in vivo* uslovima, nekoliko studija se bavilo ispitivanjem povezanosti između produkcije biofilma i rezistencije na antibiotike, međutim, rezultati su kontradiktorni. Dok su neki istraživači pokazali da su sojevi koji proizvode veće količine biofilma ujedno i rezistentniji na različite antibiotike (Babapour *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2019), drugi istraživači su dobili suprotne rezultate (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008; Espinal *et al.*, 2012; Shenkutie *et al.*, 2020). Kao moguće objašnjenje razloga zašto je većina izolata XDR i PDR tipa proizvodila manje količine biofilma, Šenkutie i saradnici (Shenkutie *et al.*, 2020) navode manju potrebu za indukcijom ovog dodatnog zaštitnog mehanizma kod navedenih sojeva. Rezultati ovih autora da su same biofilmske ćelije izrazitih biofilmskih proizvođača (SP) daleko rezistentnije na imipenem, ciprofloksacin i kolistin, u odnosu na njihove planktonske ćelije (prosečno 2048 puta veća MIC i 1024 puta veća MBC (eng. *Minimum Bactericidal Concentration*, minimalna baktericidna koncentracija) vrednost potrebna za eradikaciju biofilmskih ćelija), idu u prilog toj hipotezi. Biofilm je pokazao najveći doprinos rezistenciji na imipenem, kako autori pretpostavljaju zbog povećane ekspresije i lučenja β -laktamaza, kao i zbog zabeležene povećane ekspresije *adeFGH* efluksne pumpe. Ciprofloksacin je prema očekivanjima takođe pokazao potrebu za mnogo većom MBC za eradikaciju biofilmskih ćelija budući da ne deluje na metabolički dormantne perzisterske ćelije, dok je najmanja promena zabeležena u slučaju kolistina, čija baktericidna aktivnost može čak da se poveća u anaerobnim uslovima kakvi su prisutni u dubljim slojevima biofilma (Pamp *et al.*, 2008; Shenkutie *et al.*, 2020). Sa druge strane, rezultati naših istraživanja sugerisu da sojevi koji proizvode veće količine biofilma u proseku su rezistentniji na amikacin i ciprofloksacin. Jang i saradnici (Yang *et al.*, 2019), koji su sličnu distribuciju biofilmskih proizvođača zabeležili među izolatima iz tajvanske bolnice, takođe su pokazali da je nivo produkcije biofilma direktno proporcionalan smanjenoj osetljivosti na aminoglikozide, kao i na neke β -laktamske antibiotike. Linearan porast rezistencije na meropenem zavisno od produkcije biofilma u našoj studiji nije zabeležen, ali su sojevi SP tipa bili prosečno najmanje osetljivi na ovaj antibiotik. Identičan rezultat zabeležili su i Vidžajakumar i saradnici (Vijayakumar *et al.*, 2016) na kliničkim izolatima iz Indije. Takođe, 62,5% kolistin-rezistentnih sojeva iz naše studije pripadalo je SP tipu biofilmskog proizvođača. Razloge za nekonzistentnost rezultata kada je u pitanju povezanost stepena rezistencije na antibiotike i nivoa produkcije biofilma moguće je pronaći i u primenjenoj metodologiji. Naime, u našem istraživanju kao i u studiji koju su sprovedli Jang i saradnici (Yang *et al.*, 2019) obuhvaćen je veoma mali procenat nisko rezistentnih sojeva, UDR profila rezistencije, za razliku od studija koje su dokazale obrnutu povezanost (Espinal *et al.*, 2012; Shenkutie *et al.*, 2020). Moguće je da upravo ti sojevi proizvode najveće količine biofilma, a činjenica je da je ATCC 19606, jedini soj UDR profila rezistencije upotrebljen u našem istraživanju, proizvodio više biofilma od 90% ostalih testiranih sojeva.

Kao što je pokazano, produkcija biofilma značajno doprinosi perzistenciji *A. baumannii* u bolničkoj sredini (Espinal *et al.*, 2012; Chapartegui-Gonzalez *et al.*, 2018), međutim, produkcija biofilma u spoljašnjoj sredini odvija se pri različitim uslovima u odnosu na uslove koji se primenjuju u konvencionalnim metodama ispitivanja biofilma. Pre svega, *A. baumannii* u spoljašnjoj sredini produkuje biofilm na sobnoj temperaturi pri nutritivno limitiranim uslovima. Iz tog razloga, odlučili smo da testiramo uticaj temperature i hranljivih medijuma različitih nutritivnih sastava na produkciju biofilma nekoliko kliničkih izolata *A. baumannii*. Pokazano je da na sobnoj temperaturi, testirani sojevi zbirno proizvode čak i veću količinu biofilma u odnosu na temperaturu ljudskog tela. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim nalazima da je pri nižim temperaturama stimulirana produkcija biofilma *A. baumannii* (Nucleo *et al.*, 2009; Marti *et al.*, 2011; Pour *et al.*, 2011; De Silva *et al.*, 2018). De Silva i saradnici (2018) su pokazali da u većoj produkciji biofilma soja ATCC 17978 na 28 °C, ulogu ima termoregulacija koja dovodi do diferencijalne ekspresije faktora virulencije povezanih sa produkcijom biofilma. Pri nižoj temperaturi, prisutna je bila hiperekspresija *csu* operona, koji kodira pile koji učestvuju u adheziji za abiotičke površine (Tomaras *et al.*, 2003). Shodno tome, pojačana adhezija za površine pri nižim temperaturama doprinosi povećanoj produkciji biofilma *A. baumannii*. S druge strane, na temperaturi od 37 °C, soj

ATCC 17978 proizveo je manju količinu biofilma, ali je produkcija bila regulisana povećanom ekspresijom *ompA* gena i *paa* operona, koji kodiraju proteine koji značajno doprinose virulenciji *A. baumannii* u humanom organizmu (Kroger *et al.*, 2016; Nie *et al.*, 2020). U našoj studiji je, međutim, pokazano da ne ispoljavaju svi sojevi povećanu produkciju biofilma na nižoj temperaturi, jer su dva klinička izolata od ukupno šest ispitivanih SP sojeva, proizvela manje biofilma (za 52-57%) u tim uslovima. Ovaj rezultat se može pripisati genomskoj varijabilnosti *A. baumannii*, jer na primer ne eksprimiraju svi sojevi Csu pile (McConnell *et al.*, 2013), što bi mogao biti slučaj i kod navedena dva izolata, a istovremeno ukazuje na potrebu obuhvatanja većeg broja sojeva *A. baumannii* u dodatna ispitivanja uticaja temperature spoljašnje sredine na produkciju biofilma. *A. baumannii* spada među retke *Acinetobacter* vrste koje mogu u 100% slučajeva perzistirati na temperaturi od 44-45 °C (Bouvet i Grimont, 1987), međutim, doprinos perzistenciji specifičnih faktora do sada nije ispitivan. Stoga, ispitali smo nivo produkcije biofilma kliničkih izolata prilikom inkubacije na temperaturi od 45 °C i pokazali da produkcija biofilma *A. baumannii* čak i pri ovim uslovima opstaje na visokom nivou, iako je smanjena u poređenju sa kontrolom. S druge strane, nutritivni sastav hranljivog medijuma primenjenog za kultivaciju biofilma značajno je uticao na količinu proizvedenog biofilma. Kao standardni hranljivi medijum u studijama biofilma korišćen je tripton soja bujon suplementiran sa 1% glukoze (TSBG), u skladu sa preporukama Stepanovića i saradnika (2007), kao medijum koji najviše stimuliše produkciju biofilma kod *Staphylococcus* spp. Pokazalo se da *A. baumannii* takođe proizvodi velike količine biofilma u prisustvu ovog tipa medijuma, ali i u prisustvu ostalih medijuma suplementiranih glukozom do 1% (BHI bujon i MHB). Prosečno najveću količinu biofilma, šest testiranih sojeva je proizvelo u prisustvu BHIG bujona, ali uz velike soj-specifične razlike. Produkcija biofilma u slučaju tri soja bila je manja u poređenju sa standardnim TSBG medijumom za čak 71-89%. Nukleo i saradnici (Nucleo *et al.*, 2009) su takođe pokazali da suplementacija nutritivno siromašnih medijuma sa 0,4% glukoze ili 0,2% saharoze, snažno stimuliše produkciju biofilma kod *A. baumannii*. Pored toga, testirali su i uticaj LB medijuma obogaćenog peptonom, za koji su pokazali da inhibira produkciju biofilma, što je opet u skladu sa rezultatima naših eksperimenata, pošto su testirani sojevi proizveli daleko najmanje količine biofilma nakon inkubacije u peptonskoj vodi i hranljivom bujonu, dva medijuma bogata peptonima. Od nesuplementiranih hranljivih medijuma, ubedljivo najveća produkcija biofilma zabeležena je nakon inkubacije u TSB, koji i u originalnom sastavu sadrži najveći procenat glukoze, i ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim nalazima (Gentile *et al.*, 2014). Prema tome, kada je u pitanju uticaj nutritivnog sastava hranljivih medijuma, iz postojećih rezultata se može zaključiti da prisustvo glukoze stimuliše, a prisustvo peptona inhibira produkciju biofilma kod *A. baumannii*.

Pored bakteriostatskih ili baktericidnih aktivnosti koje antibiotici ispoljavaju detaljno izučanim mehanizmima dejstva, postoje i različite, do sada nerazjašnjene interakcije između antibiotika i makromolekularnih targeta, posredstvom kojih antibiotici mogu uticati na različite celularne procese bakterija. Čak štaviše, uticaj na neke od tih procesa može biti dominantan ako je antibiotik prisutan u subinhibitornim koncentracijama u okruženju bakterijskih ćelija (Davies *et al.*, 2006). Jedan od tih procesa jeste i produkcija biofilma. U tom pogledu, do sada su zabeleženi zanimljivi rezultati, u smislu da su neki antibiotici ispoljili stimulatorni efekat na produkciju biofilma kod nekih vrsta, dok su druge klase antibiotika inhibirale produkciju biofilma kod drugih vrsta (Davies *et al.*, 2006; Kaplan, 2011; Bernier i Surette, 2013). U praksi, bakterije, uključujući i patogene vrste, često dolaze u kontakt sa subinhibitornim koncentracijama, kako u spoljašnjoj sredini, posebno u bolnicama gde je prisutna masovna primena antibiotika, tako i *in vivo* zbog različitih razloga, počev od nepravilno optimiziranog doziranja antibiotika, do soj-specifičnih karakteristika samih mikroorganizama (visok nivo rezistencije na primenjeni antibiotik ili intrinzička produkcija veće količine biofilma na mestu infekcije). Imajući u vidu značaj uticaja subdozirano primenjenog antibiotika u smislu da eventualna stimulacija biofilma može samo dodatno otežati eradikaciju patogena, a s druge strane da bi eventualna inhibicija biofilma pružila mogućnost antivirulentnog efekta određenog antibiotika primenjenog u manjoj dozi, istovremeno manje toksičnoj, važno je poznavati uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika (Davies *et al.*,

2006). Kada je u pitanju produkcija biofilma kod vrste *A. baumannii*, do sada je ispitan uticaj nekoliko antibiotika, pri čemu je za određene antibiotike (tigeciklin, makrolidi) pokazan inhibitoryni efekat (Sato *et al.*, 2018; Navidifar *et al.*, 2019; Yamabe *et al.*, 2020), za druge (polimiksini) stimulacioni efekat (Sato *et al.*, 2018), dok su neki antibiotici (karbapenemi) ispoljili obe vrste efekta, u zavisnosti od testiranog soja (Nucleo *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2017b; Navidifar *et al.*, 2019). Rezultati naše studije pokazali su da kultivacija u prisustvu meropenema i ciprofloksacina dovodi do značajne inhibicije produkcije biofilma kod većine sojeva *A. baumannii*, izuzev kod jednog soja, gde je produkcija bila stimulirana. Na osnovu toga, može se zaključiti da je uticaj ova dva antibiotika soj-specifičan, što je u skladu sa nalazima Navidifar i saradnika (2019) kada je u pitanju meropenem. Uticaj ciprofloksacina na produkciju biofilma *A. baumannii* do sada nije ispitan, ali je prethodno pokazan njegov antibiofilmski efekat na različitim drugim vrstama bakterija (*Staphylococcus epidermidis*, *E. coli* i *P. aeruginosa*) (Wojnicz i Tichaczek-Goska, 2013; Gupta *et al.*, 2016; Szczuka *et al.*, 2017). S druge strane, inkubacija *A. baumannii* izolata u prisustvu amikacina dovela je do neznatne promene količine proizvedenog biofilma, iako je prethodno zabeleženo da amikacin može inhibirati produkciju biofilma kod ove bakterijske vrste (Yamabe *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2020). Ipak, treba imati u vidu da su ta ispitivanja sprovedena na standardnim sojevima ATCC 17978 i ATCC 19606, kod kojih je odnos sub-MIC:MIC (1:2 – 1:32) za amikacin bio mnogo niži u poređenju sa sub-MIC:MIC (1:32 – 1:1024) kliničkih izolata testiranih u našoj studiji.

Halkoni su jedinjenja širokog spektra bioloških aktivnosti. Obuhvataju širok varijetet jednostavnih i kompleksnih struktura koje u osnovi sadrže strukturu 1,3-diaril-2-propen-1-ona, i mnogi se mogu izolovati kao prirodni proizvodi iz različitih biljnih vrsta (Rozmer i Perjési, 2016; Zhuang *et al.*, 2017). Halkon sintaza je enzim poliketid sintaza tip III superfamilije koji je ubikvitaran kod viših biljaka, postoji i kod nekih nižih biljaka, a katalizuje biosintezu različitih halkonskih jedinjenja (Austin i Noel, 2003). Pored toga, enzimi halkon sintaza superfamilije učestvuju i u biosintezi raznih drugih metabolita, kao što su flavonoidi, stilbeni i auroi (Yamazaki *et al.*, 2001). Početni supstrati u halkon sintaza-katalizovanoj produkciji halkona su 4-kumaroil-koenzim A i 3 molekula malonil-koenzim A tioestra, od kojih se poliketidnom reakcijom proizvodi intermedijerni proizvod tioestar-vezani tetraketid, nakon čega dolazi do regiospecifične ciklizacije *Claisen* tipa i nastaju derivati naringenin halkona (2',4',6',4-tetrahidroksihalkon). Ukoliko je istovremeno eksprimirana halkon reduktaza, naringenin halkon dalje može da se konvertuje do 6'-dezoksinaringenin halkona i ova dva jedinjenja tipično predstavljaju prekurzore u biosintezi konačnih proizvoda flavonoida, izoflavonoida i auroi, koji su kao sekundarni metaboliti daleko više zastupljeni u prirodi u odnosu na halkone (Rozmer i Perjési, 2016; Zhuang *et al.*, 2017). Specifično supstituisani halkoni se pored toga mogu dobiti i procedurom hemijske sinteze. Najčešći pristup predstavlja kondenzacija derivata benzaldehida i metilketona u prisustvu katalizatora jake baze ili jake kiseline, tzv. *Claisen-Schmidt* kondenzacija (Powers *et al.*, 1998). U slučaju bazne katalize, halkon se generiše iz aldolnog proizvoda putem dehidratacije u enolatnom mehanizmu, dok se u slučaju kisele katalize stvara enolnim mehanizmom (Nielsen i Houlihan, 2004). Nedostaci ove tehnike jesu što se reakcija sporo odvija i za kompletiranje sinteze neophodno je nekoliko dana, a takođe može rezultirati kompleksnom miksturom sporednih i ciljnih proizvoda, a ponekad i polaznog materijala. Iz tog razloga, prinos može u velikoj meri da varira, u zavisnosti od upotrebljenih reaktanata i katalizatora, od jako niskog do skoro 100% (Mukaiyama, 1982; Nielsen i Houlihan, 2004). Uprkos tome, ova reakcija se najšire primenjuje zbog eksperimentalne jednostavnosti i visoko efikasne formacije C=C dvostruke veze, uz mala ograničenja u smislu kompleksnosti finalnog proizvoda. Prisustvo elektron-akceptorskih supstituenata favorizuje primenu kondenzacije u baznim uslovima, pri čemu se standardno koriste katalizatori poput kalijum terc-butoksida, natrijum hidroksida ili kalijum hidroksida, u metanolu ili etanolu, na sobnoj temperaturi. Ova reakcija se tipično koristi za sintezu hidroksi-supstituisanih halkona, najčešće uz visoke prinose (Zhuang *et al.*, 2017). Pored bazno- i kisele-katalizovane *Claisen-Schmidt* kondenzacije postoji i *Claisen-Schmidt* kondenzacija u uslovima bez rastvarača, kada se do finalnog

proizvoda dolazi primenom postupaka poput mlevenja ili mikrotalasnog ozračivanja (Zhuang *et al.*, 2017). Takođe, poslednjih godina sve više se primenjuje *Claisen-Schmidt* kondenzacija u obliku zelene hemije, principa koji se bazira na ekološkom pristupu, uz prevenciju nastanka opasnih i štetnih materija (Amde *et al.*, 2015). U tom postupku, voda se koristi kao rastvarač, a halkonska struktura se priprema u vodenom sistemu u prisustvu fazno-prenosnog katalizatora (eng. *Phase-Transfer Catalyst*, skr. PTC). PTC može biti jedinjenje kao što je cetiltrimetilamonijum bromid, koji primenjen uz kalijum karbonat kao bazni katalizator može dati halkone u visokom prinosu, ili se mogu koristiti jonske tečnosti, poput 1,3-dibutil-2-metilimidazolijum tetrafluoroborata, uz čvrsti kiseli katalizator hidrotalcit, koji pored toga što daje visok prinos, pruža prednosti u smislu male potrebne količine katalizatora, olakšane separacije proizvoda i mogućnosti recikliranja katalizatora bez istovremene redukcije aktivnosti (Duan *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). Pored toga, postoje i druge metode za sintezu halkona, koje u odnosu na *Claisen-Schmidt* kondenzaciju pružaju prednost u smislu odsustva kompleksne miksture proizvoda u finalnoj reakciji iz kojih se teško prečišćava željeni proizvod. Primeri su reakcija unakrsnog kuplovanja (npr. *Suzuki* reakcija, *Heck* reakcija, *Julia-Kocienski* reakcija, *Witting* reakcija), *Friedel-Crafts* acilacija, *Photo-Fries* preuređivanje, ili sinteza iz alkohola u pristupu tzv. „sinteza u jednom reakcionom sudu“ (Zhuang *et al.*, 2017; Dan i Dai, 2020). Sinteza u jednom reakcionom sudu je metodologija koja omogućava poboljšanje efikasnosti reakcije i izbegavanje postupka prečišćavanja intermedijera, u cilju uštede vremena i povećanja ukupnog prinosa. Postoji nekoliko opisanih procedura sinteze halkona koje se zasnivaju na ovoj proceduri, koje se baziraju na sintezi iz alkohola i ketona. Jedna mogućnost jeste da se hrom-trioksid postepeno dodaje u miksturu primarnog alkohola i ketona, pri čemu se alkohol oksidiše do odgovarajućeg aldehida *in situ* i reaguje sa ketonom, tako da se dobija finalni proizvod, u umereno-visokom prinosu (Li i Chen, 2011). Pokazana je i mogućnost sinteze halkona u jednom reakcionom sudu, uz korišćenje drugih različitih katalizatora, kao što su nanopaladijum pripremljen iz paladijum(II) hlorida, heterogeni i reciklabilni paladijumski katalizator Pd/AIO(OH), ili reciklabilne zlatne nanopartikule (Kwon *et al.*, 2005; Yamada i Uozumi, 2007; Kim *et al.*, 2009b).

Derivati 2'-hidroksihalkona, koji su obuhvaćeni u ispitivanjima sprovedenim u okviru ove disertacije, sintetisani su postupkom klasične bazno-katalizovane *Claisen-Schmidt* kondenzacije, uz primenu 60% NaOH, na sobnoj temperaturi. Tri proizvoda dobijeno je u visokom prinosu (86-94%), a jedino je sinteza p-CF₃ halkona rezultirala niskim prinosom (~26%). Strukture su potvrđene primenom FTIR i NMR spektroskopskih tehnika, kao i ESI-MS spektrometrije, a FTIR je otkrila pojavu karbonilne (C=O) trake u regionu ispod 1700 cm⁻¹, što je karakteristično za α,β-nezasićene ketonske grupe i može se smatrati potvrdom da je izvršeno uspešno vezivanje između A i B prstenova halkona (Aksöz i Ertan, 2012; Custodio *et al.*, 2017). Zatim je primenom XRD analize, kao i na osnovu makroskopskog i mikroskopskog izgleda, utvrđeno da sintetisani halkoni poseduju visoko kristalnu strukturu. Kristaliničnost materijala određuje njegove različite osobine kao što su stabilnost, rastvorljivost i bioraspoloživost, tako da je iz tog razloga važno ispitati ovaj tip fizičkog svojstva, posebno kada se radi o novim jedinjenjima. Što se tiče halkona, kristaliničnost je ispitana u mnogim radovima, ali zbog uticaja molekularnih konformacija, postoje varijacije u kristalnim strukturama ove grupe jedinjenja. Ipak, u najvećoj meri je u skladu sa našim rezultatima zabeležen visok nivo kristaliničnosti, što se ujedno smatra i karakteristikom halkona (Vinutha *et al.*, 2017). Takođe su sprovedene termalne analize kako bi se procenila stabilnost i utvrdili uslovi za čuvanje sintetisanih halkonskih materijala. TGA-DTA analizom pokazano je da su sintetisani halkoni bili stabilni do 200-270 °C, u zavisnosti od kompozicije supstituenata, pri čemu prisustvo metoksi grupa doprinosi stabilnosti, suprotno fluoro funkcionalnim grupama. Daljim povećanjem temperature došlo je do naglog gubitka mase, od 96-98% kod halkona sa fluoro grupama, odnosno 80-85% kod halkona sa metoksi grupama, do oko 500 °C kada je došlo do konačnog sagorevanja ostataka halkonskih proizvoda. Slične rezultate pokazali su i Kobelnik i saradnici (2018) ispitivanjem halkonoida i hidroksihalkona supstituisanog hidroksilnom grupom na pozicijama 2', 3', ili 4'. DSC analizom je u okviru regiona termalne stabilnosti dodatno pokazano postojanje endoternog pika u oblasti 90-120 °C, koji predstavlja temperaturu topljenja ispitivanih jedinjenja, a kod o-OCH₃ i p-F-

o-CH₃ halkona primećen je još jedan endotermni pik na oko 65 °C. DSC signal sa dva endotermna pika može nastati kao posledica modifikacija molekularne konformacije usled dejstva intramolekularnih sila, kao što je to prethodno zabeležio Al-Ansari (2016), uzorkovanjem nekoliko cikličnih halkona.

Antimikrobne aktivnosti halkona su učestali predmet istraživanja još od '90-ih godina prošlog veka. Posebno interesovanje su stekli kao prirodni proizvodi, sekundarni metaboliti koji su poput antibiotika rezultat više miliona godina evolucije. Kao takvi, potencijalno mogu visoko selektivno i efikasno interagovati sa celularnim targetima, koje mikroorganizmi ne mogu modifikovati ili izgubiti u procesu prirodne selekcije rezistentnih mutanata (Dan i Dai, 2020). Značaju ispitivanja antimikrobnih osobina halkona pridodaje činjenica da postoji nekoliko halkonskih jedinjenja koja su odobrena za kliničku upotrebu. Metohalkon 2, prirodni halkon, izolovan iz srčike drveta *Pterocarpus marsupium* registrovan je kao holeretik i diuretik (Diana *et al.*, 2020). Ilepimid, poznat i kao antiepileptin, halkon je hibridnog tipa sa piperidinil, odnosno 1,3-benzodioxolil heterocikličnim grupama vezanim za α,β -nezasićenu ketonsku osnovu, a može se primenjivati u tretmanu epilepsije kao serotonergički agens (Liu *et al.*, 1984; Rahman i Rahmatullah, 2010; Aboul-Enein *et al.*, 2012). Sintetički analog soforadina, prirodnog fenola iz vrste *Sophora tonkinensis*, sofalkon 3 je takođe registrovan kao antiulkusni agens, koji deluje inhibitorno na rast bakterije *Helicobacter pylori* (Kabir *et al.*, 2000; Isomoto *et al.*, 2005). Osim toga, sofalkon 3 je pokazao sposobnost inhibicije adhezije i produkcije vakuolizirajućeg toksina od strane *H. pylori*, i indukcije sekrecije proinflamatornog citokina IL-8 (Kamiya *et al.*, 1997).

Kada se upoređuje antimikrobna aktivnost jedinjenja sa osnovnim strukturnim jedinicama halkona, posebno se klasifikuju jedinjenja prirodnog porekla i halkoni dobijeni sintetičkim putem koji mogu biti jednostavni ili hibridni sa osnovnom α,β -nezasićenom ketonskom grupom za koju se smatra da je esencijalna za ispoljavanje antimikrobne aktivnosti (Nowakowska, 2007; Dan i Dai, 2020). U nomenklaturi halkona, aromatični prsten na poziciji 1 α,β -nezasićene ketonske grupe obeležava se kao prsten A sa supstituentima vezanim na pozicijama 2'-6', dok se aromatični prsten na poziciji 2 α,β -nezasićene ketonske grupe obeležava kao prsten B sa supstituentima vezanim na pozicijama 2-6. Među halkonima prirodnog porekla, otkriveno je nekoliko jedinjenja sa potentnim antimikrobnim dejstvom, poput 2',4',4-trihidroksihalkona izolovanog iz *Embellisia astragali* gljivom inficirane vrste *Astragalus adsurgens* i halkona koji pored tri hidroksilne grupe sadrži i polinezasićenu alkensku grupu na položaju 3', izolovanog iz *Amorpha fruticosa*, koji su ostvarili MIC vrednosti od 1,2-10 $\mu\text{g/mL}$ protiv vrsta *S. aureus* i *Enterococcus faecalis* (Chen *et al.*, 2012; Muharini *et al.*, 2017). Kao posebno aktivno jedinjenje pokazao se izobavahalkon, koji je po strukturi takođe 2',4',4-trihidroksihalkon sa dodatnom 3-metil-2-buten-1-il alkenskom grupom na poziciji 3'. Ovaj halkon, izolovan iz grančica *Dorstenia barteri*, ostvario je MIC vrednosti od svega 0,3-1,2 $\mu\text{g/mL}$ i protiv Gram-pozitivnih vrsta *S. aureus*, *E. faecalis* i *Bacillus* spp., i protiv Gram-negativnih vrsta *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. i *Shigella flexneri*, kao i protiv gljiva *C. albicans*, *Microsporium audorium* i *Trichophyton rubrum* (Mbaveng *et al.*, 2008). Ideničan halkon, ali izolovan iz plodova *Psoralea corylifolia*, pokazao je potentnu aktivnost i protiv MRSA sojeva, uz MIC vrednosti od 8 $\mu\text{g/mL}$ (Cui *et al.*, 2015). Potentne antibakterijske aktivnosti zabeležene su i među halkonima dobijenim sintetičkim putem, kao što je 4-hidroksikordoin koji je pokazao dobru aktivnost protiv periodontalnih patogena *Prevotella intermedia* i *Porphyromonas gingivalis* (MIC = 2,5-5 $\mu\text{g/mL}$) (Feldman *et al.*, 2011). Halkoni sa prenil ili geranil grupama na poziciji 3', uključujući brusohalkon B, bavahalkon i prethodno pominjani izobavahalkon, koji se mogu izolovati iz vrste *Angelica keiskei*, Sugamoto i saradnici (2011) su sintetisali i demonstrirali njihovu potentnu aktivnost protiv različitih Gram-pozitivnih bakterijskih vrsta, uz MIC u opsegu 2-16 $\mu\text{g/mL}$. Od klasičnih, tj. jednostavnih sintetičkih halkona, visoko potentnu aktivnost su pokazali i 2',4'-dihidroksihalkoni sa piperidinil heterocikličnom grupom ili dietilamino grupom na poziciji 4, kao i 4'-hidroksihalkon sa metoksi i bromo funkcionalnim grupama, koji su ostvarili MIC od 1,56-3,12 $\mu\text{g/mL}$ protiv *S. aureus* i *Bacillus anthracis* (Zhang *et al.*, 2018). Među hibridnim halkonima

zabeleženo je mnogo jedinjenja sa niskim MIC vrednostima protiv različitih patogena. Primer su ariloksi azolil halkoni koji su ispoljili visoko potentnu aktivnost protiv vrste *Mycobacterium tuberculosis* (MIC = 0,78-3,12 µg/mL), od kojih je derivat sa 2,4-difluorobenziloksi grupom pokazao umerenu aktivnost i *in vivo* na modelu tuberkuloze kod miševa indukovane H37Rv sojem (Marrapu *et al.*, 2011). Halkonski derivati sa benzoevom kiselinom vezanom za 2,4-tiazolidindionski supstituent na prstenu B, delovali su potentno protiv *S. aureus* (MIC = 0,5-4 µg/mL) (Liu *et al.*, 2011), a halkoni sa tercbutil pirazin grupom vezanom na položaju 1 α,β-nezasićene ketonske grupe, na mestu prstena A, protiv *M. tuberculosis* H37Rv (MIC = 3,13 µg/mL) (Kucerova-Chlupacova *et al.*, 2016). I dok je kod većine halkona zabeležena visoka aktivnost protiv Gram-pozitivnih vrsta, određeni hibridni halkoni, derivati β-jonona, delovali su vrlo potentno na Gram-negativne patogene poput *E. coli* i *P. aeruginosa* (MIC = 1,56-12,5 µg/mL) (Sharma *et al.*, 2012b). Takođe, halkoni 3-fenilsulfonil-1-propanon tipa bili su visoko aktivni protiv *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (MIC = 1,95 µg/mL) (Konduru *et al.*, 2013), a halkoni sa piridinil, metil-supstituisanim tiazolom na položaju prstena A protiv *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* i *S. flexneri* (0,97-7,81) (Bondock *et al.*, 2013). Feng i saradnici (2014) pokazali su da 2-viniloksi- ili 2-heksiloksi-supstituisani 2',4'-dihidroksihalkoni pokazuju visoko potentnu aktivnost protiv MRSA, i da to rade inhibicijom topoizomeraze IV. Konačno, iz literature se mogu izvesti zaključci da: prisustvo halogenih grupa na poziciji 2 može stimulisati antimikrobnu aktivnost, suprotno hidrosilnim i metoksi grupama; multimetoksi supstitucije na poziciji 4 smanjuju aktivnost, a uvođenje tercbutil, nitro, ili halogenih grupa na ovoj poziciji stimuliše aktivnost; benzil etarske i prenil supstitucije na položaju 5 stimulišu aktivnost; hidrosilne grupe vezane za C6 ili C2' smanjuju aktivnost, suprotno dugolančanim alkanskim ili alkenkim grupama na ovim pozicijama; hidrosilna grupa više doprinosi antimikrobnoj aktivnosti u odnosu na metoksi, kao i brom u odnosu na fluor na poziciji 3'; tercbutil grupa vezana za C5' stimuliše aktivnost, kao i dugolančani etri i halogeni na C6'. Takođe, uvođenje sulfonskih, triazolnih, ili ditiokarbamatnih grupa u dvostruku vezu osnovne α,β-nezasićene ketonske grupe često je rezultiralo pojačanim antimikrobnim dejstvom, a hibridni molekuli su generalno pokazali bolju aktivnost protiv rezistentnih Gram-negativnih patogena (Dan i Dai, 2020).

Podaci o antibakterijskoj aktivnosti halkona protiv vrste *A. baumannii*, iako se radi o jednom od najrezistentnijih patogena, koji se nalazi na listi WHO među patogenima od kritičnog prioriteta za razvoj novih terapijskih agenasa, nisu u velikom broju zastupljeni u dostupnoj literaturi. Osim toga, objavljeni rezultati ne ukazuju na postojanje spektakularne antibakterijske aktivnosti. Lofironi B i C, koji su halkonski dimeri, odnosno halkoni u širem smislu, izolovani iz kore stabljike *Lophira alata*, ostvarili su MIC vrednosti od tek 170-214 µg/mL protiv *A. baumannii* AB5075 hipervirulentnog soja. Autori su dodatno pokazali da ova jedinjenja baktericidnu aktivnost ispoljavaju indukcijom oksidativnog stresa posredstvom inhibicije DNK žiraze (Ajiboye *et al.*, 2019). Sintetički halkoni hibridnog tipa kao što su različiti derivati 2-piridinilmetilen-1-tetralona, ili halkoni sa ciklizovanom α,β-nezasićenom ketonskom grupom bez prstena A, sa ciklopropil, vinil, fluorofenil-supstituisanim hinolinom na mestu prstena B, pokazali su slabu aktivnost protiv *A. baumannii* ATCC 19606 u koncentraciji od 32 µg/mL, uz najveći procenat inhibicije od svega 12,5-15,4% (Patil *et al.*, 2016; Gibson *et al.*, 2018). Antimikrobna aktivnost protiv *A. baumannii* ATCC 19606 nije zabeležena ni među halkonskim derivatima sa triazolnim grupama (MIC >250 µg/mL) (dos Santos *et al.*, 2018), a Đin i saradnici (Jin *et al.*, 2020) su pokazali da ni 2-karboetoksi-3,5-difenil-supstituisani heteroaromatični derivati halkona nemaju dobru aktivnost protiv *A. baumannii* ATCC 17978, pri čemu je najbolju aktivnost uz MIC = 128 µg/mL ostvario derivat sa furanom i nitro grupom na položaju 4' aromatičnog prstena (inicijalno prsten A). Konačno, Džang i saradnici (Zhang *et al.*, 2018) su u odnosu na prethodno *in silico* identifikovano jedinjenje sa potencijalno najjačim antimikrobnim dejstvom (eng. *hit compound*), pristupom farmakofora-baziranog skrininga preko 200000 različitih jedinjenja, sintetisali niz hibridnih halkona, za koje su izmerili MIC vrednosti >100 µg/mL protiv *A. baumannii* ATCC 19606, odnosno kako su naveli, halkoni nisu pokazali aktivnost protiv ove vrste uzimajući u obzir rezultate paralelne studije citotoksičnosti. *Hit*

compound jedinjenje je inače sadržalo metoksi grupu na C4', hlor na C4 i 4-bromofeniltilio grupu na poziciji 3 α,β -nezasićene ketonske grupe, a sintetisani derivati pokazali su potentne inhibitorne aktivnosti protiv Gram-pozitivnih patogena *S. aureus*, *E. faecalis* i *B. anthracis* (najniže MIC od 0,78 do 1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Rezultati naših ispitivanja pokazali su da 2'-hidroksihalkoni inhibiraju rast kliničkih izolata *A. baumannii* u opsegu koncentracija 75-225 $\mu\text{g}/\text{mL}$, odnosno najbolju aktivnost u proseku su pokazali halkoni sa metoksi grupama na pozicijama 2, odnosno 2 i 6 (MIC = 118-120 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Može se smatrati da su naši halkoni pokazali umerenu antimikrobnu aktivnost poređenjem sa rezultatima antimikrobnog dejstva halkona generalno, odnosno jednu od boljih aktivnosti protiv *A. baumannii*. Zanimljivo, halkoni su najjače delovali protiv kolistin-rezistentnih izolata, što može navesti na zaključak da su promene u ćelijskom zidu izazvane modifikacijama ili smanjenom ekspresijom LOS, koje posreduju rezistenciju na kolistin, potencijalno doprinele povećanju propustljivosti zida prema halkonima. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno primećenim trendom povećane osetljivosti LOS-deficijentnih sojeva na različite antibiotike (Geisinger *et al.*, 2020). Takođe, halkoni su najbolju aktivnost ostvarili protiv sojeva koji produkuju velike količine biofilma, odnosno protiv sojeva izolovanih sa neživih površina koji su u proseku jači proizvođači biofilma, što je inicijalno ukazalo na moguću interferenciju halkona sa produkcijom biofilma. Kao što je navedeno u prethodnom tekstu, hipotetički, sojevi koji proizvode velike količine biofilma imaju manju potrebu za ekspresijom drugih mehanizama rezistencije (Shenkutie *et al.*, 2020), što znači da bi ovi sojevi mogli potencijalno biti osetljiviji na antimikrobne agense koji istovremeno inhibiraju produkciju biofilma. *Time-kill* studije su dalje pokazale da halkoni (na primeru o-OCH₃ i p-CF₃) u koncentracijama >2xMIC dovode do smanjenja broja kolonija *A. baumannii* sojeva ATCC 19606 i D1002 ispod 2 log₁₀ CFU/mL nakon 24 h inkubacije, što je u skladu sa prethodno pokazanim baktericidnim efektom jednostavnih sintetičkih halkona protiv različitih vrsta Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Prasad *et al.*, 2018). Sa druge strane, broj kolonija izolata D710, koji se pokazao otpornijim na inhibitornu aktivnost halkona (MIC = 200-225 $\mu\text{g}/\text{mL}$), smanjio se ispod 2 log₁₀ CFU/mL već nakon 4 h u prisustvu 4xMIC o-OCH₃, kao što je pokazano u jednom od prethodnih radova za baktericidnu aktivnost derivata 2',4'-dihidroksihalkona u 4xMIC protiv *S. aureus* (Feng *et al.*, 2014). Halkon p-CF₃ je isti efekat postigao nakon 8 h.

Jedna od potencijalnih alternativnih strategija za prevazilaženje rezistencije na antibiotike jeste pronalaženje adjuvanasa, jedinjenja koja nisu konvencionalni antimikrobni agensi, ali primenjeni u kombinaciji sa antibioticima ostvaruju sinergističku aktivnost. Interesantan izvor takvih adjuvanasa može se pronaći među bioaktivnim jedinjenjima biljnog porekla (Langeveld *et al.*, 2014). Između ostalih, primećene su brojne sinergističke aktivnosti halkonskih derivata sa različitim antibioticima protiv nekoliko multirezistentnih vrsta mikroorganizama. U nastavku su rezultati prikazani u obliku prosečnih FICI vrednosti, ili opsega prosečnih FICI vrednosti. Ksantohumol je halkonski derivat prirodnog porekla koji se može izolovati iz hmelja (*Humulus lupulus*), za koji su zabeležene sinergističke i aditivne interakcije sa antibioticima oksacilinom (FICI = 0,28-0,75), gentamicinom (FICI = 0,14-1), ciprofloksacinom (FICI = 0,49-1) i rifampicinom (FICI = 0,25-0,75) protiv sojeva *S. aureus* (Bocquet *et al.*, 2019). Takođe, izolikviricigenin i likviricigenin, halkoni prisutni u korenu sladića (*Glycyrrhiza glabra*) pokazali su sinergističku aktivnost sa penicilinom protiv 30-60% MRSA izolata (FICI = 0,575-0,675), sa oksacilinom protiv 50-80% MRSA izolata (FICI = 0,456-0,675) i sa ampicilinom protiv 30% izolata (FICI = 0,650-0,725). Osim toga, *Time-kill* analizom je pokazano da izolikviricigenin smanjuje rast MRSA izolata za 3,27-9,79 puta, a ovaj halkon je ispoljio značajnu antibakterijsku aktivnost u kombinaciji sa oksacilinom i na modelu sistemske infekcije miševa sa *S. aureus* (Gaur *et al.*, 2016). Potentne sinergističke aktivnosti zabeležene su i među halkonima dobijenim sintetičkim putem. Jednostavan 2',2'-dihidroksihalkon ostvario je sinergističke interakcije protiv 75% MRSA izolata sa cefotaksimom (FICI = 0,519), protiv 70% MRSA izolata sa ceftriaksonom (FICI = 0,455), protiv 100% MRSA izolata sa gentamicinom (FICI = 0,334), protiv 75% MRSA izolata sa ciprofloksacinom (FICI = 0,402), protiv 80% MRSA izolata sa trimetoprim-sulfametoksazolom (FICI = 0,413) i sa doksiciklinom protiv standardnih sojeva meticilin-osetljivog

S. aureus (skr. MSSA) i MRSA (FICI = 0,2) (Tran *et al.*, 2012; Božić *et al.*, 2014). I drugi klasični hidrosihalkoni, kao što su C4'-bromo supstutuisani, ili nesupstutuisani, delovali su sinergistički sa gentamicinom (FICI = 0,43), doksiciklinom (FICI = 0,23) i ciprofloksacinom (FICI = 0,28) protiv MSSA i MRSA, a za ove halkone, uz 2',2-dihidrosihalkon, predložena je inhibicija efluksnih pumpi kao potencijalni mehanizam dejstva na osnovu rezultata molekularnih doking studija (Tran *et al.*, 2012). Mogućnost inhibicije efluksnih pumpi od strane sintetičkih halkona pokazana je i u nekoliko drugih studija analizom inhibicije efluksa etidijum bromida. U pitanju su različiti jednostavni supstutuisani hidrosihalkoni, ili hibridni halkoni sa različitim heterocikličnim grupama kao što su indolna, metilindolna, benzodioksolna, ili tienilna grupa, koji su delovali sinergistički sa norfloksacinom protiv MRSA izolata (FICI = 0,487-0,662), ili sa flukonazolom protiv sojeva *C. albicans* (FICI = 0,21-0,29) (Gaur *et al.*, 2015; Nim *et al.*, 2018). Konkretno, Holer i saradnici (Holler *et al.*, 2012) su pokazali da čak 20 halkona koje su sintetisali inhibira NorA efluksnu pumpi i da na taj način ispoljava sinergističku interakciju sa ciprofloksacinom protiv *S. aureus* (FICI = 0,26-0,38). Od toga, halkoni sa dimetilamino etiloksi i feniloksi grupama na pozicijama 4', odnosno 4, pokazali su najpotentniju sposobnost inhibicije NorA. Konačno, Helevel i Bakta (Hellewell i Bhakta, 2020) pokazali su da jednostavan nesupstutuisan halkan (halkonoid) pokazuje izrazito potentnu inhibitornu aktivnost i na efluksne pumpe Gram-negativnih bakterija i mikobakterija, odnosno jaču od pozitivne kontrole verapamila. Ovaj halkan je ostvario sinergističke interakcije i sa etambutolom (FICI = 0,38), izonijazidom (FICI = 0,5) i rifampicinom (FICI = 0,38) protiv *Mycobacterium smegmatis*. S druge strane, u literaturi se ne mogu pronaći podaci o sinergističkim interakcijama halkona sa antibioticima protiv multirezistentnih vrsta Gram-negativnih bakterija, uključujući *A. baumannii*. U tom pogledu, rezultati naših studija pružaju prve dokaze o postojanju sinergističkih aktivnosti derivata 2'-hidrosihalkona protiv *A. baumannii*. Najveći broj sinergističkih interakcija zabeležen je između metoksi-supstutuisanog derivata (o-OCH₃) i meropenema. Ova kombinacija delovala je sinergistički protiv 14% izolata *A. baumannii* (FICI = 0,803), dok je kombinacija derivata sa trifluorometil grupom (p-CF₃) delovala sinergistički protiv 10% izolata *A. baumannii* (FICI = 0,936). *Time-kill* metodom je dodatno potvrđeno da je rast izolata D710, protiv koga je pokazana najjača sinergistička interakcija, smanjen 1,57 puta nakon 24 h u slučaju inkubacije u prisustvu 100 µg/mL o-OCH₃ (0,5xMIC) i 8 µg/mL meropenema (0,0078xMIC). Osim toga, inhibitor efluksnih pumpi verapamil je pokazao veoma potentnu sinergističku interakciju sa meropenemom upravo protiv ovog soja, što ukazuje na mogućnost da su i halkoni ispoljili sinergističku aktivnost posredstvom inhibicije efluksnih pumpi. Kao što je poznato, važnu ulogu u rezistenciji *A. baumannii* na karbapeneme imaju efluksne pumpe, pre svega RND pumpe AdeABC i AdeIJK (Geisinger *et al.*, 2019). Ipak, primarni mehanizam rezistencije *A. baumannii* na karbapeneme je posredovan hiperekspresijom karbapenemaza, a ulogu ima i alteracija spoljašnje membrane ćelijskog zida (Potron *et al.*, 2015; Geisinger *et al.*, 2019), tako da je moguće da je sinergistička aktivnost kod većine sojeva izostala upravo zbog predominantnosti ovih tipova rezistencije. U slučaju mnogih sojeva zabeležene su parcijalne sinergističke interakcije između halkona i meropenema, kao na primeru D1002 izolata, što je potvrđeno i *Time-kill* metodom, pošto je rast ovog soja bio redukovan 1,18 puta nakon 24 h inkubacije u prisustvu 75 µg/mL o-OCH₃ (0,5xMIC) i 8 µg/mL meropenema (0,0312xMIC). Analizom rezultata utvrđeno je da je rast bio dosta usporen, odnosno u 8 h-intervalu rast je čak 1,80 puta bio manji u odnosu na kontrolu, odnosno neznatno promenjen u poređenju sa početnim inokulumom. Sinergističke interakcije između ispitivanih halkona i amikacina nisu zabeležene, uz prosečne FICI vrednosti od 0,876, odnosno 0,896, za o-OCH₃, odnosno p-CF₃, dok je ciprofloksacin pokazao sinergističku aktivnost samo protiv jednog izolata u kombinaciji sa o-OCH₃ (FICI = 0,854). Može se zaključiti da hidrosihalkoni ostvaruju sinergističke, prevashodno parcijalne, interakcije sa terapijskim antibioticima protiv *A. baumannii*, ali manje u poređenju sa Gram-pozitivnim bakterijama kao što je *S. aureus*, a nešto bolju sinergističku aktivnost pokazao je derivat sa metoksi grupom.

Poslednjih godina se pored agenasa koji imaju sposobnost mikrobicidnog dejstva ili inhibicije rasta mikroorganizama poput konvencionalnih antibiotika, ispituju i agensi koji mogu

inhibirati virulenciju bez uticaja na rast ciljnog mikroorganizma. Inhibicijom virulencije, patogeni mikroorganizam bi nastavio da raste u svom domaćinu, ali bi izgubio sposobnost indukcije teške kliničke slike pre nego što bude uklonjen delovanjem imunskog sistema. Ovaj potencijalni vid alternativne terapije multirezistentnih patogena pružio bi nekoliko prednosti, pre svega ukoliko funkcija faktora virulencije na koji se deluje nije esencijalna za vijabilnost određenog mikroorganizma u svom domaćinu, prirodna selekcija rezistentnih mutanata ne bi bila favorizovana i samim tim daleko bi se sporije razvijala rezistencija u poređenju sa konvencionalnim antibioticima. Takođe, delovanjem u niskim koncentracijama na usko specifične faktore virulencije multirezistentnog patogena, uticaj na korisnu mikrobiotu bio bi sveden na minimum (Clatworthy *et al.*, 2007). Produkcija biofilma je prepoznata kao glavni faktor virulencije kod mnogih lokalizovanih hroničnih infekcija. Zbog heterogene populacije i prisustva metabolički neaktivnih ćelija, tretiranjem samo sa antibioticima vrlo je teško izvršiti kompletnu eradikaciju biofilma. Postojanje polimikrobnih zajednica dodatno doprinosi otpornosti, jer terapijskim spektrom jednog antibiotika retko su obuhvaćene sve vrste unutar biofilma, od kojih svaka vrsta može različitim mehanizmom doprineti rezistenciji. Osim toga, u skladu sa Kohovim postulatima, tipično se identifikuje samo jedna vrsta mikroorganizma kao uzročnik infekcije koji se zatim ciljano tretira, dok se ostale potencijalno prisutne vrste na mestu infekcije zanemaruju. Na taj način, pronalaženje antibiofilmskog agensa i njegova primena uz antibiotik bi verovatno značajno poboljšala ishod terapije. Očekivano, tokom poslednjih godina se intenzivno ispituju različita jedinjenja na antibiofilmske aktivnosti. Ispituju se njihova sposobnost inhibicije produkcije biofilma, sposobnost eradikacije proizvedenog biofilma, a takođe se ispituju materijali za modifikaciju površina koji bi prevenirali adheziju za nežive površine, inicijalnu fazu u produkciji biofilma. Antibiofilmski agensi mogu aktivnost ispoljavati na različitim nivoima formacije biofilma. Mehanizmi antibiofilmske aktivnosti uključuju inhibiciju početne adhezije, prekid međućelijske signalizacije putem c-di-GMP glasnika ili QS sistema, targetiranje perzisterskih, dormantnih ćelija koje biofilmu obezbeđuju rekurentnost i dugovečnost, inhibiciju produkcije EPS matriksa, i indukciju disperzije, odnosno eradikacije biofilma (Koo *et al.*, 2017). Flavonoidna jedinjenja, uključujući halkone, spadaju među agense za koje su pokazane brojne potentne antibiofilmske aktivnosti (Farhadi *et al.*, 2019). Jedna od prvih studija koja je iznela podatke o antibiofilmskim svojstvima halkona bavila se ispitivanjem inhibicije produkcije biofilma od strane bakterija izolovanih iz mora. Morske bakterije zahvaljujući produkciji biofilma kolonizuju trupove brodova i druge veštačke objekte, uzrokujući na taj način veću potrošnju goriva, koroziju i propadanje, i ogromnu ekološku i ekonomsku štetu (Banerjee *et al.*, 2011; de Carvalho, 2018). Tako je oblaganje polimernih površina 2',4'-dihloro-2-metoksihalkonom pokazalo bolje antibiofilmske osobine u odnosu na boje koje se standardno koriste za premazivanje trupova, protiv bakterije *Vibrio natriegens* (Sivakumar *et al.*, 2010). Kao posebno interesantan antibiofilmski agens pokazao se prirodni halkon likohalkon A koji se može izolovati iz korena sladića, a po strukturi je 4',4'-dihidroksi-2-metoksi-5-(2-metil-3-buten-2-il) halkon. Likohalkon A je pokazao sposobnost inhibicije produkcije biofilma od strane *C. albicans* za 35-60% u koncentraciji od svega 0,2 µg/mL, a autori navode inhibiciju formacije hifa kao verovatni mehanizam dejstva (Messier i Grenier, 2011). Interesantna studija koju su sproveli Feldman i Grenije (Feldman i Grenier, 2012) pokazala je da likohalkon A sinergistički interaguje sa proantocijanidinima iz ploda brusnice u inhibiciji biofilma *P. gingivalis*, uzročnika periodontitisa. Određena je FICI vrednost od 0,281, odnosno kombinacija 10 µg/mL likohalkona A i 50 µg/mL proantocijanidina rezultirala je odsustvom produkcije biofilma. Takođe, likohalkon A je pokazao potentnu aktivnost i u inhibiciji produkcije biofilma *S. aureus* i *Streptococcus suis*, zoonotičkog svinjskog patogena (Hao *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2015). Još jedna komponenta ekstrakta korena sladića, izolikiricigenin, pokazala je potentnu antibiofilmsku aktivnost, pošto je zabeleženo da u koncentracijama 10-40 µg/mL značajno inhibira produkciju biofilma od strane *Staphylococcus xylosus*. Osim toga, kombinacijom enzimskih i molekularnih testova, imunoeseja i molekularnih doking studija, autori su odredili inhibiciju imidazol glicerol fosfat dehidrataze, ključnog enzima u biosintezi histidina koji učestvuje u produkciji biofilma, kao potencijalni mehanizam dejstva (Zhou *et al.*, 2018; Qu *et al.*, 2019). *S. xylosus* inače nije prepoznat kao humani patogen, ali može

uzrokovati mastitis kod krava i kao takav je čest kontaminant hrane životinjskog porekla, gde može učestalo proizvoditi polimikrobne biofilme sa uzročnikom trovanja hranom *S. aureus* (Leroy *et al.*, 2020). Zatim, 2'-hidroksihalkoni sa višestrukim metoksi grupama izolovani iz lišća različitih vrsta bibera (*Piper spp.*) pokazali su jaku inhibitornu aktivnost na produkciju biofilma morske bakterije *Vibrio harveyi*, kao i jaku biofilm eradikacionu aktivnost protiv *C. albicans* i *S. aureus* (Martín-Rodríguez *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2016). Od prirodnih halkona treba pomenuti i aktivnost desmetilksantohumola iz hmelja, koji je u koncentraciji od ~20 µg/mL (0,5xMIC) inhibirao produkciju biofilma *S. aureus* >90% (Bocquet *et al.*, 2019). Potentna antibiofilmska aktivnost je zabeležena i među brojnim sintetičkim halkonskim derivatima. Posebno značajnu efikasnost u inhibiciji biofilma MRSA ispoljio je 2',2-dihidroksihalkon koji je u koncentraciji od 6,25 µg/mL inhibirao produkciju biofilma svih 31 ispitivanih MRSA izolata SP tipa, do nivoa WP ili NP tipa (Bozic *et al.*, 2014). Derivati hidroksihalkona su pokazali potentnu antibiofilmsku aktivnost i protiv respiratornog patogena netipiziranog *Haemophilus influenzae*, uzročnika dentalnog karijesa *Streptococcus mutans* i *C. albicans* (Kunthalert *et al.*, 2014; Nijampatnam *et al.*, 2016; Bonvicini *et al.*, 2019). Džang i saradnici (Zhang *et al.*, 2018) koji su u goreopisanoj studiji *in silico* pristupom identifikovali *hit compound* sa najpotentnijim antimikrobnim karakteristikama, takođe su odredili da 3-(4-hlorofenil)amino propanonski analog sa dodatnim hidroksi i hlora supstituentima, ispoljava najjaču biofilm eradikacionu aktivnost protiv *S. aureus*, odnosno koncentracije od 25-50 µg/mL identifikovane su kao minimalne biofilm eradikacione koncentracije protiv MSSA i MRSA sojeva. Konačno, El-Meseri i saradnici (El-Messery *et al.*, 2018) su detektovali potentnu biofilm inhibitornu aktivnost halkona sa 3-piperidin-1-il propanamidnom grupom na C4' (2,4-8,6 µg/mL) protiv *S. aureus*, *Micrococcus luteus* i *P. aeruginosa*, i dodatno su na osnovu molekularnih doking studija predložili inhibiciju enzima koji učestvuju u sintezi c-di-GMP kao potencijalni mehanizam dejstva. U literaturi do sada nema podataka o uticaju halkona na produkciju biofilma *A. baumannii*, ali su zato zabeležene antibiofilmske aktivnosti među srodnim flavonoidnim jedinjenjima. Ekstrakt kivija (*Actinidia deliciosa*) koji sadrži hidroksiflavin pokazao je antibiofilmsku aktivnost protiv *A. baumannii* standardnih sojeva posredstvom redukcije sadržaja ekstracelularnih polisaharida, proteina i eDNK u matriksu (Tiwari *et al.*, 2017). Propolin D, prenilovani flavanon, izolovan iz plodova *Macaranga tanarius* uzrokovao je značajnu inhibiciju produkcije biofilma *A. baumannii* ATCC 17978 (Lee *et al.*, 2019). Flavonoidna jedinjenja fisetin, floretin i kurkumin, takođe su pokazali sposobnost značajne inhibicije biofilma kod *A. baumannii* ATCC 17978 soja, kao i većine testiranih multirezistentnih kliničkih izolata, a primenom molekularnih doking studija inhibicija BfmR regulatora transkripcije je prepoznata kao mehanizam dejstva. Kurkumin je osim toga ispoljio značajnu antibiofilmsku aktivnost protiv mešovite zajednice *C. albicans* i *A. baumannii*, a takođe je pokazao i dobru antivirulentnu aktivnost na *in vivo* modelu infekcije *C. elegans*, bez ispoljavanja citotoksičnosti (Raorane *et al.*, 2019). Takođe, Bargava i saradnici (Bhargava *et al.*, 2015) su pokazali da flavonoidi iz ekstrakta sladića uzrokuju inhibiciju produkcije biofilma od strane *A. baumannii* sojeva, a kao mehanizam dejstva odredili su inhibiciju QS aktivnosti. Među 2'-hidroksihalkonima testiranim u okviru naše studije, najbolju aktivnost su pokazali halkoni sa metoksi, odnosno trifluorometil supstituentima koji su u koncentraciji od 70 µg/mL (~0,6xMIC) doveli do značajne inhibicije produkcije biofilma kod 61-67% ispitivanih sojeva *A. baumannii*. Procenat inhibicije prosečno se kretao od 33-36%. Poređenjem sa literaturnim podacima, može se zaključiti da su potvrđena antibiofilmska svojstva hidroksihalkona sa metoksi grupama, a takođe po prvi put je pokazana antibiofilmska aktivnost u slučaju trifluorometil-supstituisanih derivata. Ipak, antibiofilmska aktivnost halkona protiv *A. baumannii* pokazala se slabijom u odnosu na rezultate dobijene protiv drugih patogenih vrsta, pre svega *S. aureus* i *C. albicans*, kada se uzme u obzir veličina aktivne subinhibitorne koncentracije i procenat inhibicije.

Infekcije koje uzrokuje *A. baumannii* najčešće su povezane sa kolonizacijom medicinskih uređaja, ili dubokih rana i teških opekotina. U oba slučaja, produkcija biofilma ima ključnu ulogu u uspostavljanju stabilne kolonizacije. Formirani biofilmovi na medicinskim uređajima poput centralnog i perifernog venskog, aspiracionog, ili urinarnog katetera teško se uklanjaju, a prilikom

kateterizacije veštački se probija prva linija odbrane imunskog sistema i otvara se put vijabilnim bakterijama do uspostavljanja infekcija kakve su bakterijemija, pneumonija, ili infekcije urinarnog trakta. Biofilmovi u području inficiranih rana dodatno ometaju zarastanje, ili uzrokuju defektno i odloženo zarastanje, kada je koža naizgled obnovljena ali uz oštećenu barijernu funkciju i povećanu osetljivost na reinfekciju. Pored toga, infekcije rana su tipično polimikrobne prirode, pri čemu se sastoje predominantno od članova kožne mikrobiote ili kontaminanata iz okolne životne sredine (Sen, 2019). U polimikrobnim zajednicama, višestruke vrste mikroorganizama mogu da rastu zajedno u okviru iste biofilmske tvorevine, da interaguju međusobno i u određenim situacijama postižu sinergističko dejstvo u smislu uticaja na morbiditet same infekcije. Ovakva organizacija omogućava da guste ćelijske populacije različitih vrsta budu u bliskom kontaktu, zbog čega je međuvrsna razmena genetičkog materijala mnogo učestalija u biofilmskom obliku života. Između ostalih, genske determinate rezistencije mogu se razmenjivati i sve je više dokaza da su polimikrobne infekcije otpornije na tretman antibioticima (Hall i Mah, 2017; Kalan i Grice, 2018). Primer su geni koji kodiraju karbapenemaze koji se mogu lako prenositi između različitih patogenih vrsta, stoga je moguće da je upravo ko-egzistencija *A. baumannii* sa drugim karbapenemaza rezistentnim bolničkim patogenima u okviru istih biofilmova značajno doprinela naglom širenju XDR sojeva (Orazi i O'Toole, 2019). *S. aureus* je u visokom procentu prisutan kao deo kožne mikrobiote čoveka, a takođe se često može izolovati i kao patogen iz hroničnih rana i opekotina (Grice i Segre, 2011; Suleman, 2016; Guo *et al.*, 2020). U tom smislu može se pretpostaviti da će učestalo ko-egzistirati sa *A. baumannii* u okviru iste biofilmske infekcije rane, i zaista su studije potvrdile da ove dve vrste mogu nesmetano da rastu u okviru iste zajednice. Štaviše, zabeležen je i određen porast rezistencije na karbapeneme među sojevima *S. aureus* izolovanim iz ovakvih polimikrobnih zajednica, moguće kao posledica transfera karbapenemaza-kodirajućih genskih sekvenci iz *A. baumannii* (Castellanos *et al.*, 2019). Neophodno je ipak sprovesti dodatne studije kako bi se priroda interakcije između ova dva patogena detaljnije rasvetlila. Gljive, a posebno *C. albicans*, takođe su istaknuti članovi kožne mikrobiote čoveka i kao takve često mogu uzrokovati kontaminaciju rana. Kod mešovutih gljivično-bakterijskih biofilmova, gljive mogu da obezbede dodatna vezivna mesta za bakterije, a znajući da je adhezija za površine prva faza u formaciji biofilma, to može posledično rezultirati proizvodnjom znatno većih količina biofilmova (Kalan i Grice, 2018). *A. baumannii*, između ostalih, može da adherira za hife *C. albicans* koristeći OmpA kao vezivni ligand (Gaddy *et al.*, 2009). Osim toga, hife *C. albicans* mogu aktivno penetrirati kroz epitelnu barijeru i na taj način otvoriti put i olakšati invaziju epitela vezanim bakterijama (Kalan i Grice, 2018). Na ovaj način *C. albicans* može potencijalno promovisati i adhezivnost i invazivnost *A. baumannii* u slučaju mešovite biofilmske infekcije. S druge strane, u *in vitro* studijama zabeleženo je da *C. albicans* i *A. baumannii*, kada se nađu u direktnom kontaktu, ispoljavaju međusobno antagonističko delovanje. Pokazano je da *A. baumannii* ubija hife (ne i kvasnice) nakon vezivanja, a takođe inhibira tranziciju kvasnica u hife. *C. albicans* sa svoje strane takođe doprinosi antagonističkoj interakciji sekrecijom QS molekula farnezola, za koji je pokazano da može da ošteti integritet ćelijske membrane i redukuje produkciju biofilma, motilitet i virulenciju *A. baumannii* (Dhamgaye *et al.*, 2016). Ipak, kada se uzme u obzir dinamička priroda biofilmova, postoji mogućnost da u stvarnosti *A. baumannii* privremeno koristi hife *C. albicans* za promociju sopstvene virulencije, pre nego što ih ubije i na taj način prevenira *C. albicans* da dodatno sekretuje toksične molekule farnezola. Studije na *in vivo* modelu infekcije bi svakako značajno doprinele razjašnjenju prirode ove mešovite biofilmske infekcije.

U skladu sa navedenim činjenicama, očekivano je da postojeći tretman biofilmskih infekcija rana nije adekvatan. Sami antibiotici često ne mogu dovesti do kompletne eradikacije biofilmova na mestu infekcije i zato se poslednjih godina ispituje novi pristup tretmanu inficiranih rana tzv. biofilm-zasnovana nega rana (eng. *Biofilm-Based Wound Care*, skr. BBWC), koji bi uključio upotrebu antibiotika širokog spektra dejstva kako bi se obuhvatio što veći broj potencijalno prisutnih vrsta, pažljiv debridman rana, kao i primenu lokalnog antibiofilmskog agensa (Wu *et al.*, 2019). Sa tog aspekta, naša ideja je bila da testiramo halkone koji su pokazali najpotentniju

aktivnost u inhibiciji monomikrobnog biofilma *A. baumannii*, kao potencijalne antibiofilmske agense za BBWC tretman. U tu svrhu ispitali smo njihovu sposobnost inhibicije produkcije biofilмова od strane polimikrobnih zajednica sojeva *A. baumannii* izolovanih iz rana i drugih patogena koji često kolonizuju rane u bolničkoj sredini (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* i *C. albicans*). Ispitani halkoni nisu pokazali inhibitornu aktivnost protiv polimikrobnih biofilмова *A. baumannii* sa *K. pneumoniae* ili *P. aeruginosa*, ali je zato postignuta inhibicija u slučaju zajednica *A. baumannii* sa *S. aureus* ili *C. albicans*. Halkoni o-OCH₃, odnosno p-CF₃, primenjeni u koncentracijama od 70 µg/mL, uzrokovali su značajnu inhibiciju produkcije polimikrobnog biofilma u slučaju 77%, odnosno 62% kombinacija različitih sojeva *A. baumannii* i *S. aureus*. Metoksi-supstutuisani derivat je u proseku smanjio produkciju biofilma od strane ove polimikrobne zajednice za 48%. S druge strane, protiv polimikrobnog biofilma *A. baumannii* i *C. albicans*, zbirno bolju aktivnost ostvario je trifluorometil-supstutuisani halkon koji je u koncentraciji od 70 µg/mL postigao značajnu inhibiciju kod 62% kombinacija sojeva *A. baumannii* i *C. albicans*, naspram svega 41% u slučaju metoksi-supstutuisanog derivata. Prosečno, trifluorometil hidroksihalkon je redukovao produkciju za 32%. Dodatno, ispitana je i sposobnost inhibicije produkcije polimikrobnog biofilma *A. baumannii* sa vrstom *Candida krusei*, koja povremeno kolonizuje rane, ne produkuje hife, nema podataka o interakciji sa *A. baumannii*, ali su dokumentovane sinergističke interakcije sa *S. aureus* u smislu uticaja na mortalitet *in vivo* (Nash *et al.*, 2016; Lilly *et al.*, 2018). Protiv ove kombinacije, opet je bolju aktivnost pokazao metoksi-supstutuisani derivat koji je primenjen u koncentraciji od 70 µg/mL značajno inhibirao produkciju biofilma kod 75% kombinacija. Dodatno, pošto bakterijske ćelije koje su vijabilne ali slabo metabolički aktivne (eng. *Viable But Non-Culturable*, skr. VBNC), uključujući i dormantne antibiofilmske ćelije, značajno doprinose hronicitetu i rekurentnosti biofilmskih infekcija, ispitan je uticaj halkona i na vijabilnost biofilmskih ćelija *A. baumannii*. Metoksi-supstutuisani halkon je pokazao jaču aktivnost pošto je značajno inhibirao vijabilnost biofilmskih ćelija kod 54% ispitivanih sojeva u koncentraciji od 70 µg/mL, odnosno kod 31% sojeva u koncentraciji od 35 µg/mL. Ovaj halkon je takođe ispoljio vrlo potentnu inhibitornu aktivnost na vijabilnost ćelija polimikrobne zajednice *A. baumannii* + *S. aureus*, i čak i u nižoj koncentraciji smanjio broj vijabilnih ćelija za >75%. Značajna inhibicija vijabilnosti postignuta je i u slučaju *A. baumannii* + *C. albicans* kombinacije sa 70 µg/mL o-OCH₃. BBWC pristup tretmanu biofilmskih infekcija rana predviđa primenu kombinacije antibiotika i antibiofilmskog agensa, koji bi u idealnom slučaju posedovali sinergističku antimikrobnu aktivnost. Iz tog razloga, odlučili smo da testiramo da li kultivacija biofilma u prisustvu 70 µg/mL testiranih halkona povećava osetljivost biofilmskih ćelija *A. baumannii* na meropenem, koji je u *checkerboard* testovima proizveo najveći broj sinergističkih interakcija sa halkonima. Rezultati su pokazali da se MIC biofilmskih ćelija na meropenem zaista smanjuje nakon pretretmana sa o-OCH₃ kod 30% testiranih sojeva, odnosno nakon pretretmana sa p-CF₃ kod 40% tretiranih sojeva. Od toga, u slučaju oba halkona, MIC soja D710 koji se pokazao najosetljivijim na sinergističku aktivnost halkona i meropenema, smanjio se za čak 16 puta, odnosno ispod EUCAST granične vrednosti. Drugim rečima, kod biofilmskih ćelija ovog soja ponovo je detektovana osetljivost na karbapeneme, tako da bi eventualna primena kombinacije halkona i meropenema u BBWC pristupu tretmana infekcija rana izazvanih ovim sojem, mogla biti vrlo efikasna.

Poslednji deo biofilmskih studija odnosio se na ispitivanje mogućnosti metoksi-supstutuisanog derivata halkona da inhibira produkciju biofilma na poliuretanskim kateterima. Iako halkonski derivati do sada nisu ispitivani, prethodne studije pokazale su da flavonoidna jedinjenja imaju mogućnost prevencije produkcije ili eradikacije biofilma sa katetera. Primeri su nanoinkapsulirani dihidromiricetin koji je doveo do značajne inhibicije i eradikacije biofilмова *P. aeruginosa* sa urinarnih katetera (Dalcin *et al.*, 2017), i kvercetin i miricetin koji su implantirani subkutano *in vivo* miševima značajno redukovali stopu infekcije nakon primene katetera kolonizovanog sa *S. aureus*. Kao mehanizam antibiofilmske aktivnosti kvercetina i miricetina određena je specifična inhibicija stafilokoknog Bap proteina (Matilla-Cuenca *et al.*, 2020). U našoj studiji je po prvi put pokazano da i halkonski derivat kao što je o-OCH₃ može inhibirati produkciju

A. baumannii na kateterima, međutim zanimljivo, značajna inhibicija (33-64%) je postignuta jedino u slučaju sojeva iz urinokulture nakon delovanja koncentracije od 70 µg/mL. Na osnovu toga se može zaključiti da bi potencijalna primena o-OCH₃ mogla prevenirati infekcije urinarnog trakta *A. baumannii* povezane sa insercijom kolonizovanog urinarnog katetera. Naknadno je u ispitivanjima uticaja na faktore virulencije pokazano da i o-OCH₃ inhibira Bap *A. baumannii*, homologni protein stafilokoknog Bap.

Iako je pokazano da produkcija biofilma kod *A. baumannii* doprinosi rezistenciji i toleranciji na antibiotike i urođeni imunski odgovor (de Breij *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2013; Bocanegra-Ibarias *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015), pored toga što omogućava kolonizaciju bolničkih površina, instrumenata i ljudskog tkiva, i na taj način značajno doprinosi širenju infekcije, nema dovoljno dokaza koji bi potvrdili da je sam biofilm značajan faktor virulencije kod ove vrste. Naime, neki sojevi koji proizvode velike količine biofilma *in vitro*, pokazali su se manje virulentnim *in vivo* u odnosu na sojeve koji proizvode male količine biofilma, i obrnuto (Harding *et al.*, 2018; Eze *et al.*, 2018). Međutim, nivo produkcije biofilma je povezan sa različitim fenotipskim osobinama i genskim determinantama, čijom se redukcijom ili inaktivacijom može značajno inhibirati virulencija (Eze *et al.*, 2018). Stoga, pretpostavili smo da bi antibiofilmska aktivnost halkona mogla poticati od supresije nekog od potvrđenih faktora virulencije *A. baumannii*. Jedan od takvih potencijalnih faktora jeste i motilitet. *A. baumannii* ispoljava dva različita oblika motiliteta: površinski i trzajući. Nekoliko studija je ukazalo na povezanost između redukcije motiliteta i povećanog preživljavanja na *in vivo* modelima infekcije, tako da je motilitet označen kao potencijalni faktor virulencije kod *A. baumannii*. Skibe i saradnici (Skiebe *et al.*, 2012) pokazali su da ekspresija površinskog motiliteta kod sojeva ATCC 17978 i ATCC 19606 zavisi od bakterijske produkcije 1,3-diaminopropana i da mutacijom indukovana inaktivacija sinteze ove supstance rezultira redukcijom virulencije na modelu infekcije *G. mellonella*. Dalji potencijalni dokaz potiče od rezultata da hipermotilni mutanti soja ATCC 17978 sa inaktiviranim *hns* genima imaju povećanu virulenciju prilikom infekcije *C. elegans* nematoda (Eijkelkamp *et al.*, 2013). Takođe, inaktivacija CheW protein-kodirajućeg gena i *recA* gena koji su se pokazali neophodnim za ekspresiju površinskog motiliteta kod soja ATCC 17978 prouzrokovala je značajno redukovanu virulenciju na modelima infekcije *G. mellonella* i *C. elegans* (Corral *et al.*, 2020). I konačno, Roj i saradnici (Roy *et al.*, 2020) su integracijom Tn10 transpozona u okviru gena koji kodira karboksi terminalnu proteazu napravili mutante soja ATCC 17978 koji su imali redukovani i površinski i trzajući motilitet, a takođe i virulenciju na modelu infekcije zebrića, čija se stopa preživljavanja povećala za 40%. Treba pridodati i da se motilitet, prevashodno trzajući, povezuje i sa kompetencijom prirodne transformacije ćelija *A. baumannii* (Wilharm i Skiebe, 2019), tako da bi se eventualnom inhibicijom motiliteta redukovala i stopa HGT i posledično širenje rezistencije. Studije motiliteta smo organizovali tako što smo najpre testirali sojeve izolovane iz različitih bioloških uzoraka na sposobnost ekspresije motiliteta. Površinski nepokretnim pokazao se jedino ATCC 19606 soj, što je u skladu sa prethodnim nalazima (McQueary i Actis, 2011) i razlog zbog čega je drugi standardni soj ATCC 17978 korišćen u najvećem broju studija motiliteta. Manju stopu pokretljivosti ispoljili su izolati iz hemokulture K112 i K119, dok su ostali testirani sojevi, uključujući još jedan izolat iz hemokulture i izolate iz rane i donjeg respiratornog trakta bili visoko pokretljivi po površini hranljivih podloga. Ovi rezultati nisu u skladu sa objavljenim podacima da su izolati iz hemokulture pokretljiviji od izolata iz sputuma, što su autori hipotetički obrazložili kao adaptacionu karakteristiku *A. baumannii* za preživljavanje u krvotoku (Vijayakumar *et al.*, 2016). Sojevi su ispoljili različite tipove površinskog motiliteta, što je normalna pojava kada je u pitanju *A. baumannii*, a kod sojeva D988 i Z766 je primećena široka transparentna zona za koju se smatra da je stadijum koji prethodi širenju kolonija (Clemmer *et al.*, 2011; Skiebe *et al.*, 2012). Trzajući motilitet eksprimirali su svi sojevi, izuzev soja K112, a najpokretljiviji bio je soj Z766. Nakon što smo selektovali pokretljive sojeve, testirali smo kako adicija halkona u podloge za testiranje motiliteta utiče na njihovu pokretljivost. Oba testirana halkona (o-OCH₃ i p-CF₃) su vrlo potentno inhibirala motilitet, ali je značajno bolju aktivnost pokazao trifluorometil-supstisuisani derivat, koji

je u koncentraciji od 35 µg/mL smanjio površinski motilitet za čak 89% u proseku, odnosno u slučaju svakog testiranog soja površinski motilitet bio je inhibiran barem za 81%. Na osnovu kriterijuma za klasifikaciju sojeva u nepokretne (površina migracije <25 mm²), može se reći da su svi sojevi nakon tretmana bili nepokretni. Uticaj p-CF₃ na trzajući motilitet bio je nešto slabiji, ali je u koncentraciji od 70 µg/mL značajno inhibirao motilitet svih sojeva, izuzev ATCC 19606. Inhibitorna aktivnost halkonskih jedinjenja na motilitet *A. baumannii* do sada nije zabeležena, a zanimljivo je da su prethodno pominjana flavonoidna jedinjenja iz ekstrakta sladića, kao i kurkumin, koji su inhibirali produkciju biofilma i redukovali *in vivo* virulenciju, takođe značajno inhibirali i motilitet ispitivanih sojeva *A. baumannii* (Bhargava *et al.*, 2015; Raorane *et al.*, 2019).

Poslednja studija odnosila se na ispitivanje genske ekspresije faktora virulencije *A. baumannii* povezanih sa produkcijom biofilma (OmpA, Bap i AbaI) pod uticajem metoksi-supstituisanog derivata (o-OCH₃), koji je zbirno pokazao najbolju antibiofilmsku aktivnost. OmpA porin stimuliše adheziju bakterija za površine epitelnih ćelija i komponente ECM, povezan je sa indukcijom invazije i apoptoze epitelnih ćelija, može da doprinese antimikrobnoj rezistenciji, inhibira alternativni put aktivacije komplemента, indukuje biogenezu citotoksičnih OMV, formaciju biofilma i površinski motilitet, i kao takav se smatra ključnim faktorom virulencije kod *A. baumannii*. Povrh toga, njegov značaj u virulenciji, Sančez-Ensinales i saradnici (Sánchez-Encinales *et al.*, 2017) su potvrdili u kliničkim studijama. Kao što je poznato, *A. baumannii* je oportunistički patogen i mnogi sojevi su slabo virulentni, tako da je kod bolničkih pacijenata često teško utvrditi da li je izolovani soj *A. baumannii* uzročnik infekcije ili je prisutan samo kao kolonizator. Sančez-Ensinales i saradnici su sprovedi kombinovanu prospektivnu, unicentričnu i multicentričnu kohortnu studiju, u kojoj su primenom RT-qPCR merili nivo ekspresije *ompA* kod sojeva izolovanih iz bolničkih pacijenata bez kliničke slike infekcije i sojeva izolovanih iz bolničkih pacijenata sa pneumonijom (sa ili bez bakterijemije). Utvrdili su da je nivo ekspresije *ompA* kod sojeva prisutnih kao kolonizatora bio značajno niži u poređenju sa sojevima koji su uzrokovali razvoj pneumonije. Multivarijantnom statističkom analizom su dalje pokazali da je povećana ekspresija *ompA* značajan, nezavisan faktor rizika za razvoj pneumonije, bakterijemije, kao i za smrtni ishod kod inficiranih/kolonizovanih pacijenata. Dodatno su sprovedi i *in vivo* studiju na modelu mišje sepse, gde su infekcijom ATCC 17978 sojem, odnosno *ompA*-deficijentnim, ili naknadno *ompA*-komplementiranim mutantima, dokazali značajnu ulogu OmpA u mortalitetu i diseminaciji bakterija i kod miševa. Značajan uticaj nivoa ekspresije *ompA*, ili prisustva intaktnog OmpA proteina, na virulenciju *A. baumannii*, pokazan je *in vivo* u još nekoliko studija (Sato *et al.*, 2017; Shirazi *et al.*, 2019; Skerniškytė *et al.*, 2019a), tako da se OmpA može pouzdano smatrati vrlo atraktivnim targetom za razvoj antivirulentnih agenasa. Naša ispitivanja pokazala su da je o-OCH₃ halkon značajno i dozno-zavisno inhibirao ekspresiju *ompA* gena kod oba testirana soja (ATCC 19606 i Z766), pri čemu je značajna inhibicija postignuta čak i u koncentraciji od svega 10 µg/mL. Ovaj rezultat pokazuje da o-OCH₃ potencijalno poseduje značajnu antivirulentnu aktivnost u niskoj koncentraciji, a pored toga nudi i objašnjenje mehanizma prethodno pokazane inhibicije produkcije biofilma i površinskog motiliteta (takođe dozno-zavisne), pod uticajem istog halkona. Naime, produkcija biofilma i površinski motilitet su bakterijske osobine čija je ekspresija linearno povezana sa nivoom ekspresije *ompA* (Gaddy *et al.*, 2009; Clemmer *et al.*, 2011). Međutim, ove dve fenotipske osobine zavise i od brojnih drugih genetičkih faktora, i zbog toga smo odlučili da dodatno testiramo i stepen adhezije tretiranih sojeva za komponente ECM, pošto je ova osobina kod *A. baumannii* najvećim delom regulisana nivoom ekspresije *ompA* (Smani *et al.*, 2012). Pokazali smo da je soj ATCC 19606 gotovo u potpunosti izgubio sposobnost vezivanja za fibronektin i kolagen u prisustvu 70 µg/mL o-OCH₃. S druge strane, tretirani soj Z766 se značajno slabije vezivao jedino za kolagen, dok su u slučaju fibronektina dobijeni nelinearni rezultati. Ipak, ovaj soj verovatno nije bio adekvatan kandidat za pouzdanu procenu uticaja halkona na adheziju, budući da je posedovao intrinzički nisku sposobnost adhezije za ECM komponente. Pored toga što ovi rezultati pružaju dodatnu potvrdu uticaja na ekspresiju *ompA*, sama sposobnost vezivanja za ćelije domaćina takođe predstavlja faktor virulencije *A. baumannii*, a adhezija za komponente ECM

značajno doprinosi zadržavanju bakterija u okolini tih ćelija i posledično razvoju lokalizovane infekcije (Köljalg *et al.*, 1996). Stoga, naši rezultati su pokazali da o-OCH₃, primenjen u subinhibitornim koncentracijama, uzrokuje redukciju u fenotipskoj ekspresiji tri potencijalna faktora virulencije (produkcija biofilma, površinski motilitet i adhezija). Najverovatniji mehanizam ovog dejstva je nishodna regulacija *ompA* gena, što istovremeno dovodi do inhibicije ekspresije OmpA porina, koji se na osnovu dostupnih literaturnih podataka smatra najvažnijim faktorom virulencije kod *A. baumannii*. Na kraju treba dodati da i prethodno pokazana inhibicija polimikrobnog biofilma *A. baumannii* sa *C. albicans* u prisustvu o-OCH₃, potencijalno takođe potiče od uticaja na ekspresiju *ompA*, s obzirom da je pokazano da OmpA učestvuje u vezivanju *A. baumannii* za hife *C. albicans* (Gaddy *et al.*, 2009).

Vilja-Fares i saradnici (Vila-Farrés *et al.*, 2017) su sličnom metodologijom identifikovali ciklični heksapeptid (AOA-2), koji posredstvom OmpA deluje kao potentni antivirulentni agens protiv *A. baumannii*. Oni su međutim primenom molekularne doking studije selektovali peptid sa najvećim afinitetom vezivanja za aktivno mesto OmpA proteina (AOA-2) čiju su sposobnost vezivanja za OmpA (u ovom slučaju homolog iz *E. coli*), dokazali primenom NMR spektroskopije. Dalje su pokazali da AOA-2 inhibira adheziju soja ATCC 17978 za A549 humane alveolarne epitelne ćelije za 60%, a takođe i vezivanje za fibronektin za 20%, kada se primeni u subinhibitornoj koncentraciji od 250 µg/mL. Takođe, kao i u našem slučaju, AOA-2 se pokazao potentnim inhibitorom biofilma, i ono što je najvažnije, autori su antivirulentnu aktivnost dokazali *in vivo* na eksperimentalnom modelu sepse kod miševa indukovane ATCC 17978 sojem, pošto su pokazali da intraperitonealna primena 10 mg/kg AOA-2 tokom tri dana značajno smanjuje nivo bakterijskih kolonija u krvi, slezini i plućima, i smanjuje smrtnost za 70%. Sposobnost inhibicije *ompA* ekspresije kod *A. baumannii* pokazao je i mirtenol, flavonoidno jedinjenje slično po strukturi halkonima, koji je takođe inhibirao produkciju biofilma i oba tipa motiliteta, a osim toga smanjio je i toleranciju na oksidativni stres i površinsku hidrofobnost bakterijskih ćelija. Mirtenol je pored toga inhibirao ekspresiju i *bfmR*, *csuA/B*, *bap*, *pgaA*, *pgaC* i *katE* gena (Selvaraj *et al.*, 2020). Značaj dejstva na OmpA je još veći kada se sagleda činjenica da se najveći broj kandidata za vakcinu protiv *A. baumannii* sa obećavajućim rezultatima u pretkliničkim studijama bazirao upravo na OmpA proteinu. Primer su vakcine dobijene prečišćavanjem OMV vezikula proizvedenih od strane LOS-deficijentnog ATCC 19606 soja koje su zaštitile 75% imunizovanih miševa sedmog dana od indukcije peritonealne sepse, u poređenju sa kontrolnom grupom, i uzrokovale povećanje titra IgM, IgG1 i IgG2a antitela (Pulido *et al.*, 2020). Kao što je poznato, OmpA je glavna komponenta u OMV kod *A. baumannii*, pored još nekoliko daleko manje zastupljenih porina poput CarO ili OmpW (McConnell *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2020). Takođe, DNK vakcine sa kodirajućom sekvencom za OmpA, insertovanom u eukariotski ekspresioni vektor pBudCD4.1, indukovale su značajno povećanje koncentracija IL-2, IL-4, IL-12 i IFN-γ citokina, kao i titra IgM i IgG antitela, i dovele do preživljavanja 60% miševa inficiranih letalnom dozom *A. baumannii* u poređenju sa administracijom praznog vektora (Ansari *et al.*, 2019). Nažalost, u ovoj studiji nije navedeno kojim sojem je vršena infekcija, ali su zato efikasnost OmpA baziranih DNK vakcina, koje su sadržale i *pal*, lipoprotein-kodirajući gen, potvrdili i Lei i saradnici (2019), zaštitom 60% imunizovanih miševa, nakon intratrahealne infekcije hipervirulentnim LAC-4 sojem. Visok nivo imunizacije postignut je i primenom subjedinične vakcine koja se sastojala od kombinacije rekombinantnih proteina OmpA i PKF serin proteaze, koja je dovela do protekcije kod 85% imunizovanih miševa nakon indukcije sepse ATCC 19606 sojem (Bolourchi *et al.*, 2019). Konačno, Uppuluri i saradnici (Uppuluri *et al.*, 2018) pokazali su da imunizacija miševa proteinom ćelijskog zida hifa *C. albicans* Hyr1p pruža unakrsnu zaštitu i od *A. baumannii*, zahvaljujući sličnosti sa višestrukim proteinima *A. baumannii* uključujući OmpA. Vakcinacija sa Hyr1p dovela je do preživljavanja 50% miševa inficiranih letalnom dozom hipervirulentnog HUMC1 soja.

Potencijalno efikasne vakcine napravljene su i korišćenjem Bap ili BLP-1 homolognih površinskih proteina kao antigena. Subjedinične vakcine od rekombinantnog Bap ili C-terminalnog

regiona BLP-1 indukovale su robusan humoralni odgovor, uz stopu preživljavanja >60% kod imunizovanih miševa (Fattahian *et al.*, 2011; Skerniškytė *et al.*, 2019b). Ovi podaci dodatno idu u korist značaju rezultata ispitivanja antivirulentne aktivnosti o-OCH₃, pošto je zabeležena značajna inhibicija ekspresije i Bap-kodirajućeg gena pod uticajem ovog halkona, kod oba ispitana soja. Zanimljivo, pokazana je obrnuta proporcionalnost između jačine odgovora i primenjene koncentracije, i najniža koncentracija (10 µg/mL) o-OCH₃ je skoro dvostruko inhibirala ekspresiju *bap*. Eventualno objašnjenje takvog fenomena nalazi se u mogućnosti da halkon u nižim koncentracijama ne deluje na neke sisteme koji mogu povratnom spregom stimulisati ekspresiju *bap*, tako da u tom slučaju stimulacija ekspresije bude jača od inhibicije koja se postiže povećanjem koncentracije agensa, ali slabija u odnosu na kontrolu. Prema toj hipotezi, ako niže koncentracije ispitivanog jedinjenja selektivno deluju na određeni ključan faktor virulencije, postoji mogućnost da paradoksalno i sama antivirulentna aktivnost bude jača u nižoj koncentraciji. Ipak u našem slučaju, veća je verovatnoća da viša koncentracija (70 µg/mL) ima jači antivirulentni efekat, pošto je u ovoj koncentraciji postignuta jača inhibicija ekspresije *ompA*, koji kodira značajniji faktor virulencije. Uloga Bap u virulenciji *A. baumannii* međutim nije zanemarljiva, pošto je pokazano da učestvuje u vezivanju bakterija za humane ćelije i ima esencijalnu ulogu u formiranju zrelih biofilmova, i zato je apsolutno neophodno da bakterije ekspimiraju ovaj protein ili njegov homolog u cilju uspostavljanja lokalizovanih infekcija (De Gregorio *et al.*, 2015; Skerniškytė *et al.*, 2019b). Konačno, primena o-OCH₃ dovela je i do značajne inhibicije ekspresije *abaI* gena koji kodira AbaI sintazu autoinduktorskih QS AHL molekula. Uticaj je testiran samo na ATCC 19606 soju, pošto kod Z766 nije zabeležena ekspresija ovog gena, a inhibicija je i u ovom slučaju bila jača sa nižim koncentracijama. U skladu sa tim, očekivano je bilo da će se kolorimetrijskom metodom detektovati manji broj laktonskih molekula nakon tretmana nižom koncentracijom, ali je suprotno tome značajno smanjenje postignuto samo sa 70 µg/mL. Ipak, prilikom tumačenja ovih rezultata treba uzeti u obzir i moguće nedostatke primenjene metodologije, s obzirom da iako AHL čine veliki deo laktonskih molekula, postoje i druga bakterijska jedinjenja sa laktonskom strukturom koja se mogu detektovati primenjenom kolorimetrijskom metodom. To je verovatno ujedno i razlog zbog čega je i kod Z766 soja zabeleženo njihovo prisustvo (doduše u manjoj količini), iako ovaj soj nije ekspimirao *abaI* gen. Zato se ne može pouzdano potvrditi selektivno smanjenje produkcije AHL na osnovu rezultata dobijenih primenom ove metode, a budući da je značajna inhibicija produkcije laktonskih jedinjenja pokazana samo kod 20% ispitivanih *A. baumannii* sojeva primenom 70 µg/mL o-OCH₃, možemo zaključiti da nije dokazana značajna anti-QS aktivnost ovog halkona.

6. ZAKLJUČCI

1. Ukupno 43 klinička izolata *A. baumannii* identifikovana su kombinacijom VITEK 2, testa rasta na 44 °C i FTIR spektroskopije. Identifikacija kolistin-rezistentnih *A. baumannii* sojeva je dodatno potvrđena primenom WGS i sekvenciranjem 16S rRNK gena. Sojevi su u najvećoj meri izolovani iz uzoraka donjeg respiratornog trakta, rana, ili hemokulture, i identifikovani su kao XDR ili PDR, rezistentni >90% na karbapeneme, aminoglikozide, fluorohinolone i ostale β-laktame.
2. Kolistin-rezistentni izolati pripadali su ST2 ili ST492 tipovima (IC II klonska linija), i sadržali su stečene karbapenemaze OXA-23 grupe. PFGE i analize pan-rezistoma pokazale su visok nivo srodnosti između ovih izolata, a analize rezistoma pokazale su da se svi sojevi mogu klasifikovati kao PDR, izuzev soja D441 koji je bio osetljiv na aminoglikozide, verovatno zbog odsustva *armA* gena. Soj B103 je izolovan iz ambulantno lečenog pacijenta što ukazuje na mogućnost prisustva i širenja PDR fenotipa i u vanbolničkoj sredini.
3. Potencijalni mehanizmi rezistencije na kolistin uključuju smanjenu produkciju LOS usled smanjene ekspresije *lpxACD* gena, prisustvo aminokiselinskih mutacija u okviru PmrC P_{ETn} transferaze, a u slučaju soja D1010 i aminokiselinske mutacije u okviru PmrB senzor kinaze.
4. Svi sekvencirani sojevi sadržali su *qacE* gene koji pružaju značajno smanjenu osetljivost na hlorheksidin i kvaternerna amonijumova jedinjenja. Izolati *A. baumannii* su pokazali sposobnost perzistencije u fiziološkom rastvoru i antisepticima koji se primenjuju na rane, u toku 2 odnosno 24 h, u visokim stopama. Najmanja stopa preživljavanja zabeležena je nakon inkubacije u prisustvu klindamicina. Povezanost između sposobnosti perzistencije i nivoa produkcije biofilma nije pokazana.
5. Preko 97% izolata proizvodilo je biofilm, od čega je najviše pripadalo tipu izrazitog proizvođača (SP). Najveće količine biofilma su proizvodili sojevi izolovani sa mesta izloženog spoljašnjoj sredini (kateteri ili rane), a najmanje izolati iz hemokulture. Sojevi koji su proizvodili veće količine biofilma u proseku su bili manje osetljivi na amikacin, ciprofloksacin i meropenem, a takođe većina kolistin-rezistentnih izolata pripadala je SP tipu.
6. Testirani izolati pokazali su sposobnost proizvodnje biofilma na visokom nivou u širokom opsegu temperatura inkubacije (25-45 °C), pri čemu su najveće količine u proseku proizveli na sobnoj temperaturi, ali uz soj-specifične varijacije. Nutritivni sastav hranljivog medijuma značajno je uticao na nivo produkcije biofilma, pri čemu je prisustvo glukoze stimulisalo, a prisustvo peptona inhibiralo produkciju.
7. Kultivacija izolata u prisustvu subinhibitornih koncentracija meropenema i ciprofloksacina dovela je do inhibicije produkcije biofilma, dok prisustvo subinhibitornih koncentracija amikacina nije značajno uticalo na nivo produkcije biofilma.
8. Primenom bazno-katalizovane *Claisen-Schmidt* kondenzacije sintetisani su različito supstituisani 2'-hidroksihalkoni, visoko kristalne strukture, stabilni pri temperaturama do 200 °C. Strukture su potvrđene primenom FTIR i NMR spektroskopije, i ESI-MS spektrometrije.
9. Sintetisani halkoni su pokazali umerenu antimikrobnu aktivnost protiv kliničkih izolata *A. baumannii* (opseg MIC 75-225 µg/mL), pri čemu su najbolju aktivnost pokazali derivati sa metoksi funkcionalnim grupama (o-OCH₃ i 2,6-OCH₃). Najizraženija inhibicija rasta utvrđena je kod kolistin-rezistentnih izolata i sojeva koji su proizvodili najveće količine biofilma.

10. Sintetisani halkoni su pokazali sinergističku aktivnost sa meropenemom protiv određenog broja izolata *A. baumannii*. Najjača sinergistička aktivnost zabeležena je protiv soja koji je u prisustvu inhibitora efluksnih pumpi verapamila ispoljio osetljivost na meropenem, što ukazuje da je potencijalni mehanizam sinergističke aktivnosti halkona inhibicija efluksnih pumpi. Veliki broj parcijalnih sinergističkih interakcija ostvaren je između halkona i amikacina, odnosno halkona i ciprofloksacina.
11. Ispitani halkoni pokazali su umerenu antibiofilmsku aktivnost protiv izolata *A. baumannii*. Najjaču aktivnost pokazali su derivati o-OCH₃ i p-CF₃ u koncentraciji od 70 µg/mL, inhibirajući produkciju biofilma u proseku za 33-36%.
12. Halkon o-OCH₃ (70 µg/mL) pokazao je jaču aktivnost u inhibiciji polimikrobnog biofilma *A. baumannii* + *S. aureus*, prosečno 48%, i u inhibiciji vijabilnosti biofilmskih ćelija monomikrobnih i polimikrobnih zajednica. Halkon p-CF₃ (70 µg/mL) je ostvario bolje rezultate u inhibiciji polimikrobnog biofilma *A. baumannii* + *C. albicans*, prosečno 30%. Kultivacija *A. baumannii* biofilma u prisustvu navedenih koncentracija o-OCH₃ ili p-CF₃ halkona dovela je do redukcije MIC biofilmskih ćelija za meropenem kod 30-40% testiranih izolata.
13. Halkon o-OCH₃ je značajno inhibirao produkciju biofilma na kateterima *A. baumannii* izolata iz urinokulture.
14. Testirani halkoni su potentno inhibirali oba tipa motiliteta *A. baumannii*, posebno p-CF₃ koji je u koncentraciji od 35 µg/mL u potpunosti blokirao površinski motilitet svih ispitanih sojeva.
15. Halkon o-OCH₃ je značajno inhibirao ekspresiju *ompA* u niskim koncentracijama (10-70 µg/mL). Uticaj na nishodnu regulaciju *ompA* potvrđen je kroz inhibiciju adhezije za komponente ekstracelularnog matriksa (fibronektin i kolagen), i prethodno kroz inhibiciju produkcije monomikrobnog biofilma, polimikrobnog biofilma sa *C. albicans* i površinskog motiliteta. OmpA smatra se ključnim faktorom virulencije kod *A. baumannii*, stoga pokazana inhibicija genske ekspresije ovog proteina predstavlja najvažniji pokazatelj antivirulentne aktivnosti o-OCH₃ halkona.
16. Halkon o-OCH₃ je značajno inhibirao ekspresiju *bap* i *abaI* gena, ali uz obrnuto proporcionalnu doznu zavisnost. Visoko potentna aktivnost pri koncentraciji od 10 µg/mL ukazuje da halkon može potencijalno posedovati jaku antivirulentnu aktivnost i pri vrlo niskim koncentracijama. Značajna inhibicija aktivnosti kvorum-sensing sistema *A. baumannii* pod uticajem o-OCH₃ nije pokazana.

7. LITERATURA

- Abdullah, M. I., Mahmood, A., Madni, M., Masood, S. i Kashif, M. (2014). Synthesis, characterization, theoretical, anti-bacterial and molecular docking studies of quinoline based chalcones as a DNA gyrase inhibitor. *Bioorganic chemistry*, 54, 31-37.
- Abellón-Ruiz, J., Zahn, M., Baslé, A. i Van Den Berg, B. (2018). Crystal structure of the *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein Omp33. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 74, 852-860.
- Aboul-Enein, M., A El-Azzouny, A., A Saleh, O. i A Maklad, Y. (2012). On chemical structures with potent antiepileptic/anticonvulsant profile. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12, 671-700.
- Abreu, A. G. i Barbosa, A. S. (2017). How *Escherichia coli* circumvent complement-mediated killing. *Frontiers in immunology*, 8, 452.
- Adams, M. D., Nickel, G. C., Bajaksouzian, S., Lavender, H., Murthy, A. R., Jacobs, M. R. i Bonomo, R. A. (2009). Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53, 3628-3634.
- Ahmad, I., Nygren, E., Khalid, F., Myint, S. L. i Uhlin, B. E. (2020). A Cyclic-di-GMP signalling network regulates biofilm formation and surface associated motility of *Acinetobacter baumannii* 17978. *Scientific reports*, 10, 1-11.
- Ajiboye, T. O., Aliyu, N. O. i Ajala-Lawal, R. A. (2019). Lophirones B and C induce oxidative cellular death pathway in *Acinetobacter baumannii* by inhibiting DNA gyrase. *Microbial pathogenesis*, 130, 226-231.
- Aksöz, B. E. i Ertan, R. (2012). Spectral properties of chalcones II. *Fabad J. Pharm. Sci*, 37, 205-216.
- Al-Ansari, I. A. Z. (2016). Synthesis, Vibrational (IR), Thermal analysis and Quantumchemical Study of a Series of Cyclic Chalcones. *ChemistrySelect*, 1, 5618-5623.
- Alav, I., Sutton, J. M. i Rahman, K. M. (2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73, 2003-2020.
- Allen, J. L., Tomlinson, B. R., Casella, L. G. i Shaw, L. N. (2020). Regulatory networks important for survival of *Acinetobacter baumannii* within the host. *Current opinion in microbiology*, 55, 74-80.
- Alosaimy, S., Abdul-Mutakabbir, J. C., Kebriai, R., Jorgensen, S. C. i Rybak, M. J. (2020). Evaluation of eravacycline: a novel fluorocycline. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 40, 221-238.
- Álvarez-Fraga, L., Pérez, A., Rumbo-Feal, S., Merino, M., Vallejo, J. A., Ohneck, E. J., Edelmann, R. E., Beceiro, A., Vázquez-Ucha, J. C., Valle, J., Actis, L. A., Bou, G. i Poza, M. (2016). Analysis of the role of the LH92_11085 gene of a biofilm hyper-producing *Acinetobacter baumannii* strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells. *Virulence*, 7, 443-455.

- Alvarez-Fraga, L., Rumbo-Feal, S., Perez, A., Gomez, M. J., Gayoso, C., Vallejo, J. A., Ohneck, E. J., Valle, J., Actis, L. A., Beceiro, A., Bou, G. i Poza, M. (2017). Global assessment of small RNAs reveals a non-coding transcript involved in biofilm formation and attachment in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *PLoS one*, *12*, e0182084.
- Amde, M., Liu, J. F. i Pang, L. (2015). Environmental application, fate, effects, and concerns of ionic liquids: a review. *Environmental science & technology*, *49*, 12611-12627.
- Ansari, H., Tahmasebi-Birgani, M., Bijanzadeh, M., Doosti, A. i Kargar, M. (2019). Study of the immunogenicity of outer membrane protein A (ompA) gene from *Acinetobacter baumannii* as DNA vaccine candidate in vivo. *Iranian journal of basic medical sciences*, *22*, 669.
- Anstey, N. M., Currie, B. J. i Withnall, K. M. (1992). Community-acquired *Acinetobacter pneumonia* in the Northern Territory of Australia. *Clinical Infectious Diseases*, *14*, 83-91.
- Anstey, N. M., Currie, B. J., Hassell, M., Palmer, D., Dwyer, B. i Seifert, H. (2002). Community-acquired bacteremic *Acinetobacter pneumonia* in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. *Journal of clinical microbiology*, *40*, 685-686.
- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. C. i Peixe, L. (2005). Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *49*, 836-839.
- Antunes, L. C., Imperi, F., Towner, K. J. i Visca, P. (2011). Genome-assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates. *Research in microbiology*, *162*, 279-284.
- Antunes, L., Visca, P. i Towner, K. J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and disease*, *71*, 292-301.
- Aranda, J., Bardina, C., Beceiro, A., Rumbo, S., Cabral, M. P., Barbé, J. i Bou, G. (2011). *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. *Journal of bacteriology*, *193*, 3740-3747.
- Arroyo, L. A., Herrera, C. M., Fernandez, L., Hankins, J. V., Trent, M. S. i Hancock, R. E. (2011). The pmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *55*, 3743-3751.
- Atiyeh, B. S., Dibo, S. A. i Hayek, S. N. (2009). Wound cleansing, topical antiseptics and wound healing. *International wound journal*, *6*, 420-430.
- Austin, M. B. i Noel, J. P. (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural product reports*, *20*, 79-110.
- Ayman, M., El-Messery, S. M., Habib, E. E., Al-Rashood, S. T., Almhizia, A. A., Alkahtani, H. M. i Hassan, G. S. (2019). Targeting microbial resistance: Synthesis, antibacterial evaluation, DNA binding and modeling study of new chalcone-based dithiocarbamate derivatives. *Bioorganic chemistry*, *85*, 282-292.

- Babaei, M. R., Sulong, A., Hamat, R. A., Nordin, S. A. i Neela, V. K. (2015). Extremely high prevalence of antiseptic resistant Quaternary Ammonium Compound E gene among clinical isolates of multiple drug resistant *Acinetobacter baumannii* in Malaysia. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, *14*, 1-5.
- Babapour, E., Haddadi, A., Mirnejad, R., Angaji, S. A. i Amirmozafari, N. (2016). Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial *Acinetobacter baumannii* and its relationship with multidrug resistance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *6*, 528-533.
- Badmasti, F., Ajdary, S., Bouzari, S., Fooladi, A. A. I., Shahcheraghi, F. i 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. *Molecular immunology*, *67*, 552-558.
- Bagge, N., Hentzer, M., Andersen, J. B., Ciofu, O., Givskov, M. i Høiby, N. (2004). Dynamics and spatial distribution of β -lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *48*, 1168-1174.
- Balázs, B., Tóth, Z., Nagy, F., Kovács, R., Tóth, H., Nagy, J. B., Tóth, Á., Szarka, K., Majoros, L. i Kardos, G. (2021). The Role of Uniform Meropenem Usage in *Acinetobacter baumannii* Clone Replacement. *Antibiotics*, *10*, 127.
- Banerjee, I., Pangule, R. C. i Kane, R. S. (2011). Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms. *Advanced materials*, *23*, 690-718.
- Barnaud, G., Zihoune, N., Ricard, J. D., Hippeaux, M. C., Eveillard, M., Dreyfuss, D. i Branger, C. (2010). Two sequential outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 or OXA-72 oxacillinase in an intensive care unit in France. *Journal of Hospital Infection*, *76*, 358-360.
- Barreca, D., Bellocco, E., Laganà, G., Ginestra, G. i Bisignano, C. (2014). Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat. *Food chemistry*, *160*, 292-297.
- Bassetti, M., Peghin, M., Vena, A. i Giacobbe, D. R. (2019). Treatment of infections due to MDR Gram-negative bacteria. *Frontiers in medicine*, *6*, 74.
- Bassetti, M., Labate, L., Russo, C., Vena, A. i Giacobbe, D. R. (2021a). Therapeutic options for difficult-to-treat *Acinetobacter baumannii* infections: a 2020 perspective. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *22*, 167-177.
- Bassetti, M., Echols, R., Matsunaga, Y., Ariyasu, M., Doi, Y., Ferrer, R., Lodise, T. P., Naas, T., Niki, Y., Paterson, D. L., Portsmouth, S., Torre-Cisneros, J., Toyozumi, K., Wunderink, R. G. i Nagata, T. D. (2021b). Efficacy and safety of cefiderocol or best available therapy for the treatment of serious infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria (CREDIBLE-CR): a randomised, open-label, multicentre, pathogen-focused, descriptive, phase 3 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, *21*, 226-240.

- Batovska, D. I. i Todorova, I. T. (2010). Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Current clinical pharmacology*, 5, 1-29.
- Baumann, P., Doudoroff, M. i Stanier, R. Y. (1968). A study of the Moraxella group II. Oxidative-negative species (genus Acinetobacter). *Journal of bacteriology*, 95, 1520-1541.
- Beceiro, A., Llobet, E., Aranda, J., Bengoechea, J.A., Doumith, M., Hornsey, M., Dhanji, H., Chart, H., Bou, G., Livermore, D. M. i Woodford, N. (2011). Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of Acinetobacter baumannii mediated by the pmrAB two-component regulatory system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55, 3370-3379.
- Beceiro, A., Moreno, A., Fernández, N., Vallejo, J. A., Aranda, J., Adler, B., Harper, M., Boyce, J. D. i Bou, G. (2014). Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in Acinetobacter baumannii. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58, 518-526.
- Beijerinck, M. W. (1911). Pigments as products of oxidation by bacterial action. In *KNAW proceedings*, 13.
- Benamrouche, N., Lafer, O., Benmahdi, L., Benslimani, A., Amhis, W., Ammari, H., Assaous, F., Azzam, A., Rahal, K. i Maamar, H. T. (2020). Phenotypic and genotypic characterization of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolated in Algerian hospitals. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 14, 1395-1401.
- Bentancor, L. V., Camacho-Peiro, A., Bozkurt-Guzel, C., Pier, G. B. i Maira-Litrán, T. (2012a). Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of Acinetobacter baumannii. *Journal of bacteriology*, 194, 3950-3960.
- Bentancor, L. V., Routray, A., Bozkurt-Guzel, C., Camacho-Peiro, A., Pier, G. B. i Maira-Litrán, T. (2012b). Evaluation of the trimeric autotransporter Ata as a vaccine candidate against Acinetobacter baumannii infections. *Infection and immunity*, 80, 3381-3388.
- Bergen, L. K., Meyer, M., Høg, M., Rubenhagen, B. i Andersen, L. P. (2009). Spread of bacteria on surfaces when cleaning with microfibre cloths. *Journal of hospital infection*, 71, 132-137.
- Berlau, J., Aucken, H., Malnick, H. i Pitt, T. (1999). Distribution of Acinetobacter species on skin of healthy humans. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18, 179-183.
- Bernier, S. P. i Surette, M. G. (2013). Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. *Frontiers in microbiology*, 4, 20.
- Bhargava, N., Singh, S. P., Sharma, A., Sharma, P. i Capalash, N. (2015). Attenuation of quorum sensing-mediated virulence of Acinetobacter baumannii by Glycyrrhiza glabra flavonoids. *Future microbiology*, 10, 1953-1968.
- Bhuiyan, M. S., Ellett, F., Murray, G. L., Kostoulias, X., Cerqueira, G. M., Schulze, K. E., Maifiah, M. H. M., Li, J., Creek, D. J., Lieschke, G. J. i Peleg, A. Y. (2016). Acinetobacter baumannii phenylacetic acid metabolism influences infection outcome through a direct effect on neutrophil chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 9599-9604.

- Bishburg, E. i Bishburg, K. (2009). Minocycline—an old drug for a new century: emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents*, *34*, 395-401.
- Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sørensen, S. R., Moser, C., Kühl, M., Jensen, P. Ø. i Høiby, N. (2013). The in vivo biofilm. *Trends in microbiology*, *21*, 466-474.
- Bocanegra-Ibarias, P., Pena-López, C., Camacho-Ortiz, A., Llaca-Díaz, J., Silva-Sánchez, J., Barrios, H., Garza-Ramos, U., Rodríguez-Flores, A. M. i Garza-González, E. (2015). Genetic characterisation of drug resistance and clonal dynamics of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting in Mexico. *International journal of antimicrobial agents*, *45*, 309-313.
- Bocquet, L., Sahpaz, S., Bonneau, N., Beaufay, C., Mahieux, S., Samaillie, J., Roumy, V., Jacquin, J., Bordage, S., Hennebelle, T., Chai, F., Quetin-Leclercq, J., Neut, C. i Rivière, C. (2019). Phenolic compounds from *Humulus lupulus* as natural antimicrobial products: new weapons in the fight against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* strains. *Molecules*, *24*, 1024.
- Boll, J. M., Tucker, A. T., Klein, D. R., Beltran, A. M., Brodbelt, J. S., Davies, B. W. i Trent, M. S. (2015). Reinforcing lipid A acylation on the cell surface of *Acinetobacter baumannii* promotes cationic antimicrobial peptide resistance and desiccation survival. *MBio*, *6*.
- Boll, J. M., Crofts, A. A., Peters, K., Cattoir, V., Vollmer, W., Davies, B. W. i Trent, M. S. (2016). A penicillin-binding protein inhibits selection of colistin-resistant, lipooligosaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*, E6228-E6237.
- Bolourchi, N., Shahcheraghi, F., Shirazi, A. S., Janani, A., Bahrami, F. i Badmasti, F. (2019). Immunogenic reactivity of recombinant PKF and AbOmpA proteins as serum resistance factors against sepsis of *Acinetobacter baumannii*. *Microbial pathogenesis*, *131*, 9-14.
- Bondock, S., Naser, T. i Ammar, Y. A. (2013). Synthesis of some new 2-(3-pyridyl)-4, 5-disubstituted thiazoles as potent antimicrobial agents. *European journal of medicinal chemistry*, *62*, 270-279.
- Bonnin, R. A., Nordmann, P., Potron, A., Lecuyer, H., Zahar, J. R. i Poirel, L. (2011). Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *55*, 349-354.
- Bonnin, R. A., Nordmann, P. i Poirel, L. (2013). Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*: a state of the art. *Expert review of anti-infective therapy*, *11*, 571-583.
- Bonnin, R. A., Poirel, L. i Nordmann, P. (2014). New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*: a novel paradigm for spreading antibiotic resistance genes. *Future microbiology*, *9*, 33-41.
- Bonvicini, F., Gentilomi, G. A., Bressan, F., Gobbi, S., Rampa, A., Bisi, A. i Belluti, F. (2019). Functionalization of the Chalcone Scaffold for the discovery of novel lead compounds targeting fungal infections. *Molecules*, *24*, 372.

- Borriello, G., Werner, E., Roe, F., Kim, A. M., Ehrlich, G. D. i Stewart, P. S. (2004). Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *48*, 2659-2664.
- Bou, G. i Martínez-Beltrán, J. (2000). Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *44*, 428-432.
- Bouvet, P. J. i Grimont, P. A. (1986). Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *36*, 228-240.
- Bouvet, P. J. M. i Grimont, P. A. D. (1987). Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. In *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie* *138*, 569-578.
- Bozic, D. D., Milenkovic, M., Ivkovic, B. i Cirkovic, I. (2014). Newly-synthesized chalcones-inhibition of adherence and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, *45*, 263-270.
- Božić, D. D., Milenković, M., Ivković, B. i Cirković, I. (2014). Antibacterial activity of three newly-synthesized chalcones & synergism with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Indian journal of medical research*, *140*, 130.
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. i Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, *14*, 320-330.
- Breslow, J. M., Monroy, M. A., Daly, J. M., Meissler, J. J., Gaughan, J., Adler, M. W. i Eisenstein, T. K. (2011). Morphine, but not trauma, sensitizes to systemic *Acinetobacter baumannii* infection. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *6*, 551-565.
- Brisou, J. i Prévôt, A. R. (1954). Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. In *Annales de L'institut Pasteur* *86*, 722-728.
- Brossard, K. A. i Campagnari, A. A. (2012). The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infection and immunity*, *80*, 228-233.
- Bruhn, K. W., Pantapalangkoor, P., Nielsen, T., Tan, B., Junus, J., Hujer, K. M., Wright, M. S., Bonomo, R. A., Adams, M. D., Chen, W. i Spellberg, B. (2015). Host fate is rapidly determined by innate effector-microbial interactions during *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *The Journal of infectious diseases*, *211*, 1296-1305.
- Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Maillard, J. Y., Bonnaure-Mallet, M. i Jolivet-Gougeon, A. (2016). Efflux pump induction by quaternary ammonium compounds and fluoroquinolone resistance in bacteria. *Future microbiology*, *11*, 81-92.
- Cafiso, V., Stracquadiano, S., Lo Verde, F., Gabriele, G., Mezzatesta, M. L., Caio, C., Pigola, G., Ferro, A. i Stefani, S. (2019). Colistin resistant *A. baumannii*: genomic and transcriptomic traits acquired under colistin therapy. *Frontiers in microbiology*, *9*, 3195.

- Cai, Y., Chai, D., Wang, R., Liang, B. i Bai, N. (2012). Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *67*, 1607-1615.
- Camarena, L., Bruno, V., Euskirchen, G., Poggio, S. i Snyder, M. (2010). Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathog*, *6*, e1000834.
- Caneiras, C., Calisto, F., Jorge da Silva, G., Lito, L., Melo-Cristino, J. i Duarte, A. (2018). First description of colistin and tigecycline-resistant *Acinetobacter baumannii* producing KPC-3 carbapenemase in Portugal. *Antibiotics*, *7*, 96.
- Carson, L. A., Favero, M. S., Bond, W. W. i Petersen, N. J. (1972). Factors affecting comparative resistance of naturally occurring and subcultured *Pseudomonas aeruginosa* to disinfectants. *Applied microbiology*, *23*, 863-869.
- Caruso, R., Warner, N., Inohara, N. i Núñez, G. (2014). NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity*, *41*, 898-908.
- Casella, L. G., Weiss, A., Pérez-Rueda, E., Ibarra, J. A. i Shaw, L. N. (2017). Towards the complete proteinaceous regulome of *Acinetobacter baumannii*. *Microbial genomics*, *3*.
- Castellanos, N., Nakanouchi, J., Yüzen, D. I., Fung, S., Fernandez, J. S., Barberis, C., Tuchscher, L. i Ramirez, M. S. (2019). A study on *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* strains recovered from the same infection site of a diabetic patient. *Current microbiology*, *76*, 842-847.
- Cayô, R., Rodríguez, M. C., Espinal, P., Fernández-Cuenca, F., Ocampo-Sosa, A. A., Pascual, Á., Ayala, J. A., Vila, J. i Martínez-Martínez, L. (2011). Analysis of genes encoding penicillin-binding proteins in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *55*, 5907-5913.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. *US Department of Health and Human Services, Centres for Disease Control and Prevention*.
- Cerqueira, G. M., Kostoulas, X., Khoo, C., Aibinu, I., Qu, Y., Traven, A. i Peleg, A. Y. (2014). A global virulence regulator in *Acinetobacter baumannii* and its control of the phenylacetic acid catabolic pathway. *The Journal of infectious diseases*, *210*, 46-55.
- Chapartegui-González, I., Lázaro-Díez, M., Bravo, Z., Navas, J., Icardo, J. M. i Ramos-Vivas, J. (2018). *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation. *PLoS One*, *13*, e0201961.
- Chatterjee, S., Mondal, A., Mitra, S. i Basu, S. (2017). *Acinetobacter baumannii* transfers the bla_{NDM-1} gene via outer membrane vesicles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*, 2201-2207.
- Chen, M. Z., Hsueh, P. R., Lee, L. N., Yu, C. J., Yang, P. C. i Luh, K. T. (2001). Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. *Chest*, *120*, 1072-1077.

- Chen, J., Li, Y., Yang, L. Q., Li, Y. Z., Nan, Z. B. i Gao, K. (2012). Biological activities of flavonoids from pathogenic-infected *Astragalus adsurgens*. *Food chemistry*, *131*, 546-551.
- Chen, Q., Li, X., Zhou, H., Jiang, Y., Chen, Y., Hua, X. i Yu, Y. (2014). Decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii* mediated by a mutation in *trm* encoding SAM-dependent methyltransferase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*, 72-76.
- Chen, R., Lv, R., Xiao, L., Wang, M., Du, Z., Tan, Y., Cui, Y., Yan, Y., Luo, Y., Yang, R. i Song, Y. (2017a). A1S_2811, a CheA/Y-like hybrid two-component regulator from *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, is involved in surface motility and biofilm formation in this bacterium. *Microbiologyopen*, *6*, e00510.
- Chen, H., Cao, J., Zhou, C., Liu, H., Zhang, X. i Zhou, T. (2017b). Biofilm formation restrained by subinhibitory concentrations of tigecyclin in *Acinetobacter baumannii* is associated with downregulation of efflux pumps. *Chemotherapy*, *62*, 128-133.
- Chen, B., Han, J., Dai, H. i Jia, P. (2021). Biocide-tolerance and antibiotic-resistance in community environments and risk of direct transfers to humans: Unintended consequences of community-wide surface disinfecting during COVID-19?. *Environmental Pollution*, 117074.
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M. G., Orange, N., Dufour, A. i Cornelis, P. (2017). Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS microbiology reviews*, *41*(5), 698-722.
- Chiaradia, L. D., Martins, P. G. A., Cordeiro, M. N. S., Guido, R. V. C., Ecco, G., Andricopulo, A. D., Yunes, R. A., Vernal, J., Nunes, R. J. i Terenzi, H. (2012). Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB). *Journal of medicinal chemistry*, *55*, 390-402.
- Chin, C. Y., Gregg, K. A., Napier, B. A., Ernst, R. K. i Weiss, D. S. (2015). A PmrB-regulated deacetylase required for lipid A modification and polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *59*, 7911-7914.
- Chin, C. Y., Tipton, K. A., Farokhyfar, M., Burd, E. M., Weiss, D. S. i Rather, P. N. (2018). A high-frequency phenotypic switch links bacterial virulence and environmental survival in *Acinetobacter baumannii*. *Nature microbiology*, *3*, 563-569.
- Choi, C. H., Lee, E. Y., Lee, Y. C., Park, T. I., Kim, H. J., Hyun, S. H., Kim, S. A., Lee, S. K. i Lee, J. C. (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cellular microbiology*, *7*, 1127-1138.
- Choi, C. H., Lee, J. S., Lee, Y. C., Park, T. I. i Lee, J. C. (2008a). *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC microbiology*, *8*, 1-11.
- Choi, C. H., Hyun, S. H., Lee, J. Y., Lee, J. S., Lee, Y. S., Kim, S. A., Chae, J. P., Yoo, S. M. i Lee, J. C. (2008b). *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cellular microbiology*, *10*, 309-319.

- Choi, A. H., Slamti, L., Avci, F. Y., Pier, G. B. i Maira-Litrán, T. (2009). The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly- β -1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *Journal of bacteriology*, *191*, 5953-5963.
- Chu, Y. W., Leung, C. M., Houang, E. T. S., Ng, K. C., Leung, C. B., Leung, H. Y. i Cheng, A. F. B. (1999). Skin carriage of acinetobacters in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*, 2962-2967.
- Chu, W. C., Bai, P. Y., Yang, Z. Q., Cui, D. Y., Hua, Y. G., Yang, Y., Yang, Q. Q., Zhang, E. i Qin, S. (2018). Synthesis and antibacterial evaluation of novel cationic chalcone derivatives possessing broad spectrum antibacterial activity. *European journal of medicinal chemistry*, *143*, 905-921.
- Chung, D. R., Song, J. H., Kim, S. H., Thamlikitkul, V., Huang, S. G., Wang, H., So, T. M. K., Yasin, R. M., Hsueh, P. R., Carlos, C. C., Hsu, L. Y., Buntaran, L., Lalitha, M. K., Kim, M. J., Choi, J. Y., Kim, S. I., Ko, K. S., Kang, C. I. i Peck, K. R. (2011). High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *184*, 1409-1417.
- Cisneros, J. M., Reyes, M. J., Pachon, J., Becerril, B., Caballero, F. J., García Garmendia, J. L., Ortiz, C. i Cobacho, A. R. (1996). Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. *Clinical infectious diseases*, *22*, 1026-1032.
- Clatworthy, A. E., Pierson, E. i Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature chemical biology*, *3*, 541-548.
- Clemente, W. T., Sanches, M. D., Coutinho, R. L., Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior, J., Lauria, M. W., Lima, C. X. i de Castro Romanelli, R. M. (2012). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing necrotizing fasciitis in a pancreas-kidney transplant recipient: a case report. *Transplantation*, *94*, e37-e38.
- Clemmer, K. M., Bonomo, R. A. i Rather, P. N. (2011). Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology*, *157*, 2534.
- CLSI (1999). *M026-A. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Approved Guideline*. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA, USA.
- CLSI (2015). *M07-A10. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - tenth edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA, USA.
- CLSI (2017). *M100-S27. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-seventh informational supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA, USA.
- Collins, R. F., Beis, K., Dong, C., Botting, C. H., McDonnell, C., Ford, R. C., Clarke, B. R., Whitfield, C. i Naismith, J. H. (2007). The 3D structure of a periplasm-spanning platform required for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*, 2390-2395.

- Colquhoun, J. M. i Rather, P. N. (2020). Insights into mechanisms of biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* and implications for uropathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *10*, 253.
- Corradino, B., Toia, F., di Lorenzo, S., Cordova, A. i Moschella, F. (2010). A difficult case of necrotizing fasciitis caused by *Acinetobacter baumannii*. *The international journal of lower extremity wounds*, *9*, 152-154.
- Corral, J., Pérez-Varela, M., Barbé, J. i Aranda, J. (2020). Direct interaction between RecA and a CheW-like protein is required for surface-associated motility, chemotaxis and the full virulence of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 17978. *Virulence*, *11*, 315-326.
- Corvec, S., Poirel, L., Naas, T., Drugeon, H. i Nordmann, P. (2007). Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-23 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *51*, 1530-1533.
- Costa, G. M., Endo, E. H., Cortez, D. A. G., Nakamura, T. U., Nakamura, C. V. i Dias Filho, B. P. (2016). Antimicrobial effects of *Piper hispidum* extract, fractions and chalcones against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Journal de mycologie medicale*, *26*, 217-226.
- Coyne, S., Rosenfeld, N., Lambert, T., Courvalin, P. i Périchon, B. (2010a). Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *54*, 4389.
- Coyne, S., Guigon, G., Courvalin, P. i Périchon, B. (2010b). Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *54*, 333-340.
- Coyne, S., Courvalin, P. i Périchon, B. (2011). Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *55*, 947-953.
- Cress, B. F., Englaender, J. A., He, W., Kasper, D., Linhardt, R. J. i Koffas, M. A. (2014). Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *FEMS microbiology reviews*, *38*, 660-697.
- Cui, Y., Taniguchi, S., Kuroda, T. i Hatano, T. (2015). Constituents of *Psoralea corylifolia* fruits and their effects on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, *20*, 12500-12511.
- Custodio, J. M., Vaz, W. F., de Andrade, F. M., Camargo, A. J., Oliveira, G. R. i Napolitano, H. B. (2017). Substitution effect on a hydroxylated chalcone: conformational, topological and theoretical studies. *Journal of Molecular Structure*, *1136*, 69-79.
- D'Onofrio, V., Conzemius, R., Varda-Brkić, D., Bogdan, M., Grisold, A., Gyssens, I. C., Bedenić, B. i Barišić, I. (2020). Epidemiology of colistin-resistant, carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Croatia. *Infection, Genetics and Evolution*, *81*, 104263.
- Da Silva, G. J., Van Der Reijden, T., Domingues, S., Mendonça, N., Petersen, K. i Dijkshoorn, L. (2014). Characterization of a novel international clonal complex (CC32) of *Acinetobacter baumannii* with epidemic potential. *Epidemiology & Infection*, *142*, 1554-1558.

- Dagher, T. N., Al-Bayssari, C., Chabou, S., Antar, N., Diene, S. M., Azar, E. i Rolain, J. M. (2019). Investigation of multidrug-resistant ST2 *Acinetobacter baumannii* isolated from Saint George hospital in Lebanon. *BMC microbiology*, *19*, 1-7.
- Dalcin, A. J. F., Santos, C. G., Gündel, S. S., Roggia, I., Raffin, R. P., Ourique, A. F., Santos, R. C. V. i Gomes, P. (2017). Anti biofilm effect of dihydromyricetin-loaded nanocapsules on urinary catheter infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *156*, 282-291.
- Damier-Piolle, L., Magnet, S., Brémont, S., Lambert, T. i Courvalin, P. (2008). AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *52*, 557-562.
- Dan, W. i Dai, J. (2020). Recent developments of chalcones as potential antibacterial agents in medicinal chemistry. *European journal of medicinal chemistry*, *187*, 111980.
- Davies, J., Spiegelman, G. B. i Yim, G. (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current opinion in microbiology*, *9*, 445-453.
- Davis, K. A., Moran, K. A., McAllister, C. K. i Gray, P. J. (2005). Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. *Emerging infectious diseases*, *11*, 1218.
- D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W. i Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science*, *311*, 374-377.
- de Breij, A., Gaddy, J., van der Meer, J., Koning, R., Koster, A., van den Broek, P., Actis, L., Nibbering, P. i Dijkshoorn, L. (2009). CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606T to human airway epithelial cells and their inflammatory response. *Research in microbiology*, *160*, 213-218.
- de Breij, A., Dijkshoorn, L., Lagendijk, E., van der Meer, J., Koster, A., Bloemberg, G., Wolterbeek, R., van den Broek, P. i Nibbering, P. (2010). Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*?. *PloS one*, *5*, e10732.
- de Carvalho, C. C. C. R. (2018). Marine biofilms: a successful microbial strategy with economic implications. *Frontiers in marine science*, *5*, 126.
- De Gregorio, E., Del Franco, M., Martinucci, M., Roschetto, E., Zarrilli, R. i Di Nocera, P. P. (2015). Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter*. *BMC genomics*, *16*, 1-14.
- De Silva, P. M., Chong, P., Fernando, D. M., Westmacott, G. i Kumar, A. (2018). Effect of incubation temperature on antibiotic resistance and virulence factors of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *62*, e01514-17.
- Derecho, I., McCoy, K. B., Vaishampayan, P., Venkateswaran, K. i Mogul, R. (2014). Characterization of hydrogen peroxide-resistant *Acinetobacter* species isolated during the Mars phoenix spacecraft assembly. *Astrobiology*, *14*, 837-847.
- Deveson Lucas, D., Crane, B., Wright, A., Han, M. L., Moffatt, J., Bulach, D., Gladman, S. L., Powell, D., Aranda, J., Seemann, T., Machado, D., Pacheco, T., Marques, T., Viveiros, M., Nation,

- R., Li, J., Harper, M. i Boyce, J. D. (2018). Emergence of high-level colistin resistance in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate mediated by inactivation of the global regulator H-NS. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *62*.
- Dexter, C., Murray, G. L., Paulsen, I. T. i Peleg, A. Y. (2015). Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. *Expert review of anti-infective therapy*, *13*, 567-573.
- Dhamgaye, S., Qu, Y. i Peleg, A. Y. (2016). Polymicrobial infections involving clinically relevant Gram-negative bacteria and fungi. *Cellular microbiology*, *18*, 1716-1722.
- Di Venanzio, G., Flores-Mireles, A. L., Calix, J. J., Haurat, M. F., Scott, N. E., Palmer, L. D., Potter, R. F., Hibbing, M. E., Friedman, L., Wang, B., Dantas, G., Skaar, E. P., Hultgren, S. J. i Feldman, M. F. (2019). Urinary tract colonization is enhanced by a plasmid that regulates uropathogenic *Acinetobacter baumannii* chromosomal genes. *Nature communications*, *10*, 1-13.
- Diana, E. J., Kanchana, U. S., Mathew, T. V. i Anilkumar, G. (2020). Recent developments in the metal catalysed cross-coupling reactions for the synthesis of the enone system of chalcones. *Applied Organometallic Chemistry*, *34*, e5987.
- Dijkshoorn, L., Van Aken, E., Shunburne, L., Van Der Reijden, T. J. K., Bernards, A. T., Nemec, A. i Towner, K. J. (2005). Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clinical microbiology and infection*, *11*, 329-332.
- Dijkshoorn, L., Nemec, A. i Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature reviews microbiology*, *5*, 939-951.
- Dimmock, J. R., Elias, D. W., Beazely, M. A. i Kandepu, N. M. (1999). Bioactivities of chalcones. *Current medicinal chemistry*, *6*, 1125.
- Disz, T., Akhter, S., Cuevas, D., Olson, R., Overbeek, R., Vonstein, V., Stevens, R. i Edwards, R. A. (2010). Accessing the SEED genome databases via Web services API: tools for programmers. *BMC bioinformatics*, *11*, 1-11.
- Djahmi, N., Dunyach-Remy, C., Pantel, A., Dekhil, M., Sotto, A. i Lavigne, J. P. (2014). Epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *BioMed research international*, *2014*.
- Doi, Y., Adams, J. M., Yamane, K. i Paterson, D. L. (2007). Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *51*, 4209-4210.
- Doi, Y., Wachino, J. I. i Arakawa, Y. (2008). Nomenclature of plasmid-mediated 16S rRNA methylases responsible for panaminoglycoside resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *52*, 2287-2288.
- Dortet, L., Bonnin, R. A., Bernabeu, S., Escaut, L., Vittecoq, D., Girlich, D., Imanci, D., Fortineau, N. i Naas, T. (2016). First occurrence of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Serbia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *60*, 5724-5730.

- dos Santos, M., Santos, F. R. D. S., Ferraz, A. C., Andrade, J. T., Herrera, K. M. S., Lima, W. G., Pereira, L. H. S., da Silva, M. G., Villar, J. A. F. P., de Magalhães, J. C. and Taranto, A. G., dos Santos, L. L., Soares-Martins, J. A. P. i Ferreira, J. M. S. (2018). Triazole-chalcones: Lack of antibacterial, anti-candida, and anti-dengue virus activities. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 9, 39-43.
- Driffield, K., Miller, K., Bostock, J. M., O'Neill, A. J. i Chopra, I. (2008). Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 1053-1056.
- Drosou, A., Falabella, A. i Kirsner, R. S. (2003). Antiseptics on wounds: an area of controversy. *Wounds*, 15, 149-166.
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J. i Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 523-539.
- Duan, H. C., Jiang, H. i Gong, H. (2006). Green Synthesis of Chalcone Derivative. *China Pharm*, 15, 30-31.
- Eijkelkamp, B. A., Hassan, K. A., Paulsen, I. T. i Brown, M. H. (2011). Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC genomics*, 12, 1-14.
- Eijkelkamp, B. A., Stroehler, U. H., Hassan, K. A., Elbourne, L. D., Paulsen, I. T. i Brown, M. H. (2013). H-NS plays a role in expression of *Acinetobacter baumannii* virulence features. *Infection and immunity*, 81, 2574-2583.
- Eijkelkamp, B. A., Stroehler, U. H., Hassan, K. A., Paulsen, I. T. i Brown, M. H. (2014). Comparative analysis of surface-exposed virulence factors of *Acinetobacter baumannii*. *BMC genomics*, 15, 1-12.
- Elhosseiny, N. M. i Attia, A. S. (2018). *Acinetobacter*: an emerging pathogen with a versatile secretome. *Emerging microbes & infections*, 7, 1-15.
- El-Messery, S. M., Habib, E. S. E., Al-Rashood, S. T. i Hassan, G. S. (2018). Synthesis, antimicrobial, anti-biofilm evaluation, and molecular modelling study of new chalcone linked amines derivatives. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 33, 818-832.
- Escudero, D., Cofiño, L., Forcelledo, L., Quindós, B., Calleja, C. i Martín, L. (2017). Control of an *Acinetobacter baumannii* multidrug resistance endemic in the ICU. Recalling the obvious. *Medicina intensiva*, 41(8), 497-499.
- Espinal, P., Marti, S. i Vila, J. (2012). Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *Journal of Hospital Infection*, 80, 56-60.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2020). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net): Annual Epidemiological Report 2019.
- Ewers, C., Klotz, P., Leidner, U., Stamm, I., Prenger-Berninghoff, E., Göttig, S., Semmler, T. i Scheufen, S. (2017). OXA-23 and ISAbal-OXA-66 class D β -lactamases in *Acinetobacter*

baumannii isolates from companion animals. *International journal of antimicrobial agents*, 49, 37-44.

Eze, E. C., Chenia, H. Y. i El Zowalaty, M. E. (2018). Acinetobacter baumannii biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infection and drug resistance*, 11, 2277.

Eze, E. C. i El Zowalaty, M. E. (2019). Combined effects of low incubation temperature, minimal growth medium, and low hydrodynamics optimize Acinetobacter baumannii biofilm formation. *Infection and drug resistance*, 12, 3523.

Falagas, M. E., Bliziotis, I. A. i Siempos, I. I. (2006). Attributable mortality of Acinetobacter baumannii infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Critical care*, 10, 1-8.

Falagas, M. E. i Rafailidis, P. I. (2007). Attributable mortality of Acinetobacter baumannii: no longer a controversial issue. *Critical care*, 11, 1-3.

Falagas, M. E., Vardakas, K. Z., Kapaskelis, A., Triarides, N. A. i Roussos, N. S. (2015). Tetracyclines for multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections. *International journal of antimicrobial agents*, 45, 455-460.

Fan, E., Chauhan, N., Udatha, D. G., Leo, J. C. i Linke, D. (2016). Type V secretion systems in bacteria. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, 305-335.

Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M. i Iranshahy, M. (2019). Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytotherapy Research*, 33, 13-40.

Farrow III, J. M., Wells, G. i Pesci, E. C. (2018). Desiccation tolerance in Acinetobacter baumannii is mediated by the two-component response regulator BfmR. *PLoS One*, 13, e0205638.

Favero, M. S., Carson, L. A., Bond, W. W. i Petersen, N. J. (1971). Pseudomonas aeruginosa: growth in distilled water from hospitals. *Science*, 173, 836-838.

Feldman, M., Tanabe, S., Epifano, F., Genovese, S., Curini, M. i Grenier, D. (2011). Antibacterial and anti-inflammatory activities of 4-hydroxycordoin: potential therapeutic benefits. *Journal of natural products*, 74, 26-31.

Feldman, M. i Grenier, D. (2012). Cranberry proanthocyanidins act in synergy with licochalcone A to reduce Porphyromonas gingivalis growth and virulence properties, and to suppress cytokine secretion by macrophages. *Journal of applied microbiology*, 113, 438-447.

Feng, L., Maddox, M. M., Alam, M. Z., Tsutsumi, L. S., Narula, G., Bruhn, D. F., Wu, X., Sandhaus, S., Lee, R. B., Simmons, C. J., Tse-Dinh, Y. C., Hurdle, J. G., Lee, R. E. i Sun, D. (2014). Synthesis, structure–activity relationship studies, and antibacterial evaluation of 4-chromanones and chalcones, as well as olympicin A and derivatives. *Journal of medicinal chemistry*, 57, 8398-8420.

- Fernández-Cuenca, F., Tomás, M., Caballero-Moyano, F. J., Bou, G., Martínez-Martínez, L., Vila, J., Pachón, J., Cisneros, J. M., Rodríguez-Baño, J. i Pascual, Á. (2015). Reduced susceptibility to biocides in *Acinetobacter baumannii*: association with resistance to antimicrobials, epidemiological behaviour, biological cost and effect on the expression of genes encoding porins and efflux pumps. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*, 3222-3229.
- Fiester, S. E., Arivett, B. A., Schmidt, R. E., Beckett, A. C., Ticak, T., Carrier, M. V., Ghosh, R., Ohneck, E. J., Metz, M. L., Sellin Jeffries, M. K. i Actis, L. A. (2016). Iron-regulated phospholipase C activity contributes to the cytolytic activity and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS one*, *11*, e0167068.
- Fishbain, J. i Peleg, A. Y. (2010). Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clinical infectious diseases*, *51*, 79-84.
- Fitzsimons, T. C., Lewis, J. M., Wright, A., Kleifeld, O., Schittenhelm, R. B., Powell, D., Harper, M. i Boyce, J. D. (2018). Identification of novel *Acinetobacter baumannii* type VI secretion system antibacterial effector and immunity pairs. *Infection and immunity*, *86*.
- Flemming, H. C. i Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, *8*, 623-633.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. i Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, *14*, 563.
- Flemming, H. C. i Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, *17*, 247-260.
- Fournier, P. E., Richet, H. i Weinstein, R. A. (2006a). The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical infectious diseases*, *42*, 692-699.
- Fournier, P. E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C. i Nordmann, P. (2006b). Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS genet*, *2*, e7.
- Fragkou, P. C., Poulakou, G., Blizou, A., Blizou, M., Rapti, V., Karageorgopoulos, D. E., Koulenti, D., Papadopoulos, A., Matthaiou, D. K. i Tsiodras, S. (2019). The role of minocycline in the treatment of nosocomial infections caused by multidrug, extensively drug and pandrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a systematic review of clinical evidence. *Microorganisms*, *7*, 159.
- França, M. B., Panek, A. D. i Eleutherio, E. C. A. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *146*, 621-631.
- Franolić-Kukina, I., Bedenić, B., Budimir, A., Herljević, Z., Vraneš, J. i Higgins, P. G. (2011). Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-72-positive *Acinetobacter baumannii* in a Croatian university hospital. *International Journal of Infectious Diseases*, *15*, e706-e709.
- Gaddy, J. A., Tomaras, A. P. i Actis, L. A. (2009). The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infection and immunity*, *77*, 3150-3160.

- Gajic, I., Ranin, L., Kekic, D., Opavski, N., Smitran, A., Mijac, V., Jovanovic, S., Hadnadjev, M., Travar, M. i Mijovic, G. (2020). Tigecycline susceptibility of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from intensive care units in the western Balkans. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 1-6.
- Garnacho-Montero, J., Amaya-Villar, R., Gutiérrez-Pizarra, A., de Tena, E. E. G., Artero-González, M. L., Corcia-Palomo, Y. i Bautista-Paloma, J. (2013). Clinical efficacy and safety of the combination of colistin plus vancomycin for the treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy*, 59, 225-231.
- Garnacho-Montero, J., Amaya-Villar, R., Ferrándiz-Millón, C., Díaz-Martín, A., López-Sánchez, J. M. i Gutiérrez-Pizarra, A. (2015). Optimum treatment strategies for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Expert review of anti-infective therapy*, 13, 769-777.
- Garnacho-Montero, J., Gutiérrez-Pizarra, A., Díaz-Martín, A., Cisneros-Herreros, J. M., Cano, M. E., Gato, E., de Alegría, C. R., Fernández-Cuenca, F., Vila, J., Martínez-Martínez, L. and del Mar Tomás-Carmona, M., Pascual, A., Bou, G., Pachón -Diaz, J. i Rodríguez-Bano, J. (2016). *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: Molecular epidemiology, clinical features and predictors of mortality. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 34, 551-558.
- Garnacho-Montero, J. i Timsit, J. F. (2019). Managing *Acinetobacter baumannii* infections. *Current opinion in infectious diseases*, 32, 69-76.
- Garza-González, E., Camacho-Ortíz, A., Rodríguez-Noriega, E., Esparza-Ahumada, S., Flores-Treviño, S., Bocanegra-Ibarias, P., Tijerina-Rodríguez, L. i Morfín-Otero, R. (2020). Comparison of Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and the Vitek 2 System for Routine Identification of Clinically Relevant Bacteria and Yeast. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 50, 119-127.
- Garzoni, C., Emonet, S., Legout, L., Benedict, R., Hoffmeyer, P., Bernard, L. i Garbino, J. (2005). Atypical infections in tsunami survivors. *Emerging infectious diseases*, 11, 1591.
- Gaur, R., Gupta, V. K., Pal, A., Darokar, M. P., Bhakuni, R. S. i Kumar, B. (2015). In vitro and in vivo synergistic interaction of substituted chalcone derivatives with norfloxacin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Rsc Advances*, 5, 5830-5845.
- Gaur, R., Gupta, V. K., Singh, P., Pal, A., Darokar, M. P. i Bhakuni, R. S. (2016). Drug Resistance Reversal Potential of Isoliquiritigenin and Liquiritigenin Isolated from *Glycyrrhiza glabra* Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytotherapy research*, 30, 1708-1715.
- Gayoso, C. M., Mateos, J., Méndez, J. A., Fernández-Puente, P., Rumbo, C., Tomás, M., Martínez de Ilarduya, O. i Bou, G. (2014). Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of proteome research*, 13, 460-476.
- Gebhardt, M. J., Gallagher, L. A., Jacobson, R. K., Usacheva, E. A., Peterson, L. R., Zurawski, D. V. i Shuman, H. A. (2015). Joint transcriptional control of virulence and resistance to antibiotic and environmental stress in *Acinetobacter baumannii*. *MBio*, 6.

Geisinger, E. i Isberg, R. R. (2015). Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog*, *11*, e1004691.

Geisinger, E., Mortman, N. J., Vargas-Cuebas, G., Tai, A. K. i Isberg, R. R. (2018). A global regulatory system links virulence and antibiotic resistance to envelope homeostasis in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS pathogens*, *14*, e1007030.

Geisinger, E., Huo, W., Hernandez-Bird, J. i Isberg, R. R. (2019). *Acinetobacter baumannii*: envelope determinants that control drug resistance, virulence, and surface variability. *Annual review of microbiology*, *73*, 481-506.

Geisinger, E., Mortman, N. J., Dai, Y., Cokol, M., Syal, S., Farinha, A., Fisher, D. G., Tang, A. Y., Lazinski, D. W., Wood, S., Anthony, J., van Opijnen, T. i Isberg, R. R. (2020). Antibiotic susceptibility signatures identify potential antimicrobial targets in the *Acinetobacter baumannii* cell envelope. *Nature communications*, *11*, 1-16.

Gellings, P. S., Wilkins, A. A. i Morici, L. A. (2020). Recent Advances in the Pursuit of an Effective *Acinetobacter baumannii* Vaccine. *Pathogens*, *9*, 1066.

Gentile, V., Frangipani, E., Bonchi, C., Minandri, F., Runci, F. i Visca, P. (2014). Iron and *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Pathogens*, *3*, 704-719.

Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I. i Ursing, J. (1991). Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *Journal of clinical microbiology*, *29*, 277-282.

Giacobbe, D. R., Ciacco, E., Girmenia, C., Pea, F., Rossolini, G. M., Sotgiu, G., Tascini, C., Tumbarello, M., Viale, P. i Bassetti, M. (2020). Evaluating Cefiderocol in the Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli: A Review of the Emerging Data. *Infection and Drug Resistance*, *13*, 4697.

Giammanco, A., Calà, C., Fasciana, T. i 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. *Mosphere*, *2*.

Giannella, M., Bussini, L., Pascale, R., Bartoletti, M., Malagrino, M., Pancaldi, L., Toschi, A., Ferraro, G., Marconi, L., Ambretti, S., Lewis, R. i Viale, P. (2019). Prognostic utility of the new definition of difficult-to-treat resistance among patients with gram-negative bloodstream infections. In *Open forum infectious diseases*, *6*, US: Oxford University Press.

Giannouli, M., Di Popolo, A., Durante-Mangoni, E., Bernardo, M., Cuccurullo, S., Amato, G., Tripodi, M.F., Triassi, M., Utili, R. i Zarrilli, R. (2012). Molecular epidemiology and mechanisms of rifampicin resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates from Italy. *International journal of antimicrobial agents*, *39*, 58-63.

Giannouli, M., Antunes, L. C., Marchetti, V., Triassi, M., Visca, P. i Zarrilli, R. (2013). 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 infectious diseases*, *13*, 282.

- Giardina, B. J., Shahzad, S., Huang, W. i Wilks, A. (2019). Heme uptake and utilization by hypervirulent *Acinetobacter baumannii* LAC-4 is dependent on a canonical heme oxygenase (abHemO). *Archives of biochemistry and biophysics*, 672, 108066.
- Gibson, M. Z., Nguyen, M. A. i Zingales, S. K. (2018). Design, synthesis, and evaluation of (2-(pyridinyl) methylene)-1-tetralone chalcones for anticancer and antimicrobial activity. *Medicinal Chemistry*, 14, 333-343.
- Gil-Perotin, S., Ramirez, P., Marti, V., Sahuquillo, J. M., Gonzalez, E., Calleja, I., Menendez, R. i Bonastre, J. (2012). Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. *Critical Care*, 16, 1-9.
- Go, E. S., Urban, C., Burns, J., Mariano, N., Mosinka-Snipas, K., Rahal, J. J., Kreiswirth B. i Eisner, W. (1994). Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *The Lancet*, 344, 1329-1332.
- Gold, M., Farber, H., Gilboa, R. i Tschen, E. (2005). Use of benzoyl peroxide/clindamycin gel in the once-daily treatment of moderate rosacea. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52, 161.
- Graveline, R., Segura, M., Radzioch, D. i Gottschalk, M. (2007). TLR2-dependent recognition of *Streptococcus suis* is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness. *International immunology*, 19, 375-389.
- Green, E. R., Juttukonda, L. J. i Skaar, E. P. (2020). The manganese-responsive transcriptional regulator MumR protects *Acinetobacter baumannii* from oxidative stress. *Infection and immunity*, 88.
- Greene, C., Wu, J., Rickard, A. H. i Xi, C. (2016). Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. *Letters in applied microbiology*, 63(4), 233-239.
- Greig, S. L. i Scott, L. J. (2016). Intravenous minocycline: a review in *Acinetobacter* infections. *Drugs*, 76, 1467-1476.
- Grice, E. A. i Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature reviews microbiology*, 9, 244-253.
- Griffiths, R. D., Fernandez, R. S. i Ussia, C. A. (2001). Is tap water a safe alternative to normal saline for wound irrigation in the community setting?. *Journal of wound care*, 10, 407-411.
- Gu, D. X., Hu, Y. J., Zhou, H. W., Zhang, R. i Chen, G. X. (2015). Substitutions of Ser83Leu in GyrA and Ser80Leu in ParC associated with quinolone resistance in *Acinetobacter pittii*. *Microbial Drug Resistance*, 21, 345-351.
- Guo, B., Abdelraouf, K., Ledesma, K. R., Chang, K. T., Nikolaou, M. i Tam, V. H. (2011). Quantitative impact of neutrophils on bacterial clearance in a murine pneumonia model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55, 4601-4605.

- Guo, J. i Li, C. (2019). Molecular epidemiology and decreased susceptibility to disinfectants in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients in central China. *Journal of infection and public health*, *12*, 890-896.
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J. i Wang, Y. (2020). Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *10*, 107.
- Gupta, P., Chhibber, S. i Harjai, K. (2016). Subinhibitory concentration of ciprofloxacin targets quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa* causing inhibition of biofilm formation & reduction of virulence. *The Indian journal of medical research*, *143*, 643.
- Gupta, V. K., Gaur, R., Sharma, A., Akther, J., Saini, M., Bhakuni, R. S. i Pathania, R. (2019). A novel bi-functional chalcone inhibits multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* and potentiates the activity of fluoroquinolones. *Bioorganic chemistry*, *83*, 214-225.
- Hadfield, J., Croucher, N. J., Goater, R. J., Abudahab, K., Aanensen, D. M. i Harris, S. R. (2018). Phandango: an interactive viewer for bacterial population genomics. *Bioinformatics*, *34*, 292-293.
- Hall, C. W. i Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, *41*, 276-301.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. i Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, *2*, 95-108.
- Halvorsen, J. F. (1963). Gliding Motility in the Organisms *Bacterium anitratum* (B5w), *Moraxella lwoffii* and *Alkaligenes haemolysans*, as compared to *Moraxella nonliquefaciens*. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, *59*, 200-204.
- Hameed, F., Khan, M. A., Muhammad, H., Sarwar, T., Bilal, H. i Rehman, T. U. (2019). Plasmid-mediated *mcr-1* gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Pakistan. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *52*.
- Hancock, R. E. (1997). Peptide antibiotics. *The lancet*, *349*, 418-422.
- Hao, H., Hui, W., Liu, P., Lv, Q., Zeng, X., Jiang, H., Wang, Y., Zheng, X., Zheng, Y., Li, J., Zhou, X. i Jiang, Y. (2013). Effect of licochalcone A on growth and properties of *Streptococcus suis*. *PLoS One*, *8*, e67728.
- Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K. i Kinoshita, T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, *48*, 125-129.
- Harbarth, S., Soh, S. T., Horner, C. i Wilcox, M. H. (2014). Is reduced susceptibility to disinfectants and antiseptics a risk in healthcare settings? A point/counterpoint review. *Journal of Hospital Infection*, *87*, 194-202.
- Harding, C. M., Tracy, E. N., Carruthers, M. D., Rather, P. N., Actis, L. A. i Munson, R. S. (2013). *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *MBio*, *4*.

- Harding, C. M., Kinsella, R. L., Palmer, L. D., Skaar, E. P. i Feldman, M. F. (2016). Medically relevant *Acinetobacter* species require a type II secretion system and specific membrane-associated chaperones for the export of multiple substrates and full virulence. *PLoS pathogens*, *12*, e1005391.
- Harding, C. M., Pulido, M. R., Di Venanzio, G., Kinsella, R. L., Webb, A. I., Scott, N. E., Pachón, J. i Feldman, M. F. (2017). Pathogenic *Acinetobacter* species have a functional type I secretion system and contact-dependent inhibition systems. *Journal of biological chemistry*, *292*, 9075-9087.
- Harding, C. M., Hennon, S. W. i Feldman, M. F. (2018). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nature Reviews Microbiology*, *16*, 91.
- Harris, G., Lee, R. K., Lam, C. K., Kanzaki, G., Patel, G. B., Xu, H. H. i Chen, W. (2013). A mouse model of *Acinetobacter baumannii*-associated pneumonia using a clinically isolated hypervirulent strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *57*, 3601-3613.
- Hassan, K. A., Jackson, S. M., Penesyan, A., Patching, S. G., Tetu, S. G., Eijkelkamp, B. A., Brown, M. H., Henderson, P. J. i Paulsen, I. T. (2013). Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(50), 20254-20259.
- Hassan, K. A., Cain, A. K., Huang, T., Liu, Q., Elbourne, L. D., Boinett, C. J., Brzoska, A. J., Li, L., Ostrowski, M., Nhu, N. T. K., Nhu, T. D. H., Baker, S., Parkhill, J., i Paulsen, I. T. (2016). Fluorescence-based flow sorting in parallel with transposon insertion site sequencing identifies multidrug efflux systems in *Acinetobacter baumannii*. *MBio*, *7*.
- Hawley, J. S., Murray, C. K. i Jorgensen, J. H. (2008). Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *52*, 351-352.
- Hayashi, M., Kawamura, K., Matsui, M., Suzuki, M., Suzuki, S., Shibayama, K. i Arakawa, Y. (2017). Reduction in chlorhexidine efficacy against multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* international clone II. *Journal of Hospital Infection*, *95*, 318-323.
- He, T., Wang, R., Liu, D., Walsh, T. R., Zhang, R., Lv, Y., Ke, Y., Ji, Q., Wei, R., Liu, Z., Shen, Y., Wang, G., Sun, L., Lei, L., Lv, Z., Li, Y., Pang, M., Wang, L., Sun, Q., Fu, Y., Song, H., Hao, Y., Shen, Z., Wang, S., Chen, G., Wu, C., Shen, J. i Wang, Y. (2019). Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans. *Nature microbiology*, *4*, 1450-1456.
- Heinzel, M. (1998). Phenomena of biocide resistance in microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *3*, 225-234.
- Hellewell, L. i Bhakta, S. (2020). Chalcones, stilbenes and ketones have anti-infective properties via inhibition of bacterial drug-efflux and consequential synergism with antimicrobial agents. *Access Microbiology*, *2*.
- Henrichsen, J. (1975). The occurrence of twitching motility among gram-negative bacteria. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology*, *83*, 171-178.

Henriksen, S. D. (1973). Moraxella, Acinetobacter, and the Mimeae. *Bacteriological reviews*, *37*, 522.

Héritier, C., Poirel, L., Fournier, P. E., Claverie, J. M., Raoult, D. i Nordmann, P. (2005). Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *49*, 4174-4179.

Heritier, C., Poirel, L. i Nordmann, P. (2006). Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. *Clinical microbiology and infection*, *12*, 123-130.

Hérivaux, A., Pailhoriès, H., Quinqueneau, C., Lemarié, C., Joly-Guillou, M. L., Ruvoen, N., Eveillard, M. i Kempf, M. (2016). First report of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* carriage in pets from the community in France. *International journal of antimicrobial agents*, *48*, 220-221.

Higgins, P. G., Poirel, L., Lehmann, M., Nordmann, P. i Seifert, H. (2009). OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *53*, 5035-5038.

Higgins, P. G., Pérez-Llarena, F. J., Zander, E., Fernández, A., Bou, G. i Seifert, H. (2013). OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *57*, 2121-2126.

Higgins, P. G., Hagen, R. M., Podbielski, A., Frickmann, H. i Warnke, P. (2020). Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated from War-Injured Patients from the Eastern Ukraine. *Antibiotics*, *9*, 579.

Holler, J. G., Slotved, H. C., Mølgaard, P., Olsen, C. E. i Christensen, S. B. (2012). Chalcone inhibitors of the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus* whole cells and enriched everted membrane vesicles. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *20*, 4514-4521.

Hood, M. I., Mortensen, B. L., Moore, J. L., Zhang, Y., Kehl-Fie, T. E., Sugitani, N., Chazin, W. J., Caprioli, R. M. i Skaar, E. P. (2012). Identification of an *Acinetobacter baumannii* zinc acquisition system that facilitates resistance to calprotectin-mediated zinc sequestration. *PLoS pathog*, *8*, e1003068.

Hood, M. I. i Skaar, E. P. (2012). Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nature Reviews Microbiology*, *10*, 525-537.

Horcajada, J. P., Sorlí, L., Luque, S., Benito, N., Segura, C., Campillo, N., Montero, M., Esteve, E., Mirelis, B., Pomar, V., Cuquet, J., Martí, C., Garro, P. i Grau, S. (2016). Validation of a colistin plasma concentration breakpoint as a predictor of nephrotoxicity in patients treated with colistin methanesulfonate. *International journal of antimicrobial agents*, *48*, 725-727.

Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A. i Sleator, R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, *3*, 243-250.

Hu, F., Guo, Y., Yang, Y., Zheng, Y., Wu, S., Jiang, X., Zhu, D. i Wang, F. (2019). Resistance reported from China antimicrobial surveillance network (CHINET) in 2018. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *38*, 2275-2281.

- Iacono, M., Villa, L., Fortini, D., Bordoni, R., Imperi, F., Bonnal, R.J., Sicheritz-Ponten, T., De Bellis, G., Visca, P., Cassone, A. i Carattoli, A. (2008). Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *52*, 2616-2625.
- Imperi, F., Antunes, L. C., Blom, J., Villa, L., Iacono, M., Visca, P. i Carattoli, A. (2011). The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *IUBMB life*, *63*, 1068-1074.
- Infante, V. V., Cano, A. M., Valdovinos, H. M., Macías, A. E. i Álvarez, J. A. (2012). Solución salina como medio de cultivo desde el punto de vista de las bacteriemias nosocomiales. *Revista de Investigación Clínica*, *64*, 120-125.
- Inoue, A. i Horikoshi, K. (1989). A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature*, *338*, 264-266.
- Isler, B., Doi, Y., Bonomo, R. A. i Paterson, D. L. (2019). New treatment options against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *63*.
- Isomoto, H., Furusu, H., Ohnita, K., Wen, C. Y., Inoue, K. i Kohno, S. (2005). Sofalcone, a mucoprotective agent, increases the cure rate of *Helicobacter pylori* infection when combined with rabeprazole, amoxicillin and clarithromycin. *World journal of gastroenterology: WJG*, *11*, 1629.
- Ivanković, T., Goić-Barišić, I. i Hrenović, J. (2017). Reduced susceptibility to disinfectants of *Acinetobacter baumannii* biofilms on glass and ceramic. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, *68*, 99-107.
- Iwashkiw, J. A., Seper, A., Weber, B. S., Scott, N. E., Vinogradov, E., Stratilo, C., Reiz, B., Cordwell, S. J., Whittal, R., Schild, S. i Feldman, M. F. (2012). Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. *PLoS Pathog*, *8*, e1002758.
- Iyer, R., Moussa, S. H., Durand-Reville, T. F., Tommasi, R. i Miller, A. (2017). *Acinetobacter baumannii* OmpA is a selective antibiotic permeant porin. *ACS infectious diseases*, *4*, 373-381.
- Jacobs, A. C., Hood, I., Boyd, K. L., Olson, P. D., Morrison, J. M., Carson, S., Sayood, K., Iwen, P. C., Skaar, E. P. i Dunman, P. M. (2010). Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infection and immunity*, *78*, 1952-1962.
- Jacobs, A. C., Sayood, K., Olmsted, S. B., Blanchard, C. E., Hinrichs, S., Russell, D. i Dunman, P. M. (2012). Characterization of the *Acinetobacter baumannii* growth phase-dependent and serum responsive transcriptomes. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *64*, 403-412.
- Jacobs, A. C., Thompson, M. G., Black, C. C., Kessler, J. L., Clark, L. P., McQueary, C. N., Gancz, H. Y., Corey, B. W., Moon, J. K., Si, Y., Owen, M. T., Hallock, J. D., Kwak, Y. I., Summers, A., Li, C. Z., Rasko, D. A., Penwell, W. F., Honnold, C. L., Wise, M. C., Waterman, P. E., Lesho, E. P., Stewart, R. L., Actis, L. A., Palys, T. J., Craft, D. W. i Zurawski, D. V. (2014). AB5075, a

highly virulent isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a model strain for the evaluation of pathogenesis and antimicrobial treatments. *MBio*, 5.

Jahangiri, A., Rasooli, I., Owlia, P., Fooladi, A. A. I. i Salimian, J. (2018). Highly conserved exposed immunogenic peptides of Omp34 against *Acinetobacter baumannii*: an innovative approach. *Journal of microbiological methods*, 144, 79-85.

Jaruratanasirikul, S., Wongpoowarak, W., Aeinlang, N. i Jullangkoon, M. (2013). Pharmacodynamics modeling to optimize dosage regimens of sulbactam. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57, 3441-3444.

Jawad, A., Heritage, J., Snelling, A. M., Gascoyne-Binzi, D. M. i Hawkey, P. M. (1996). Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *Journal of clinical microbiology*, 34, 2881-2887.

Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A. M., Heritage, J. i Hawkey, P. M. (1998). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *Journal of clinical microbiology*, 36, 1938-1941.

Jenal, U., Reinders, A. i Lori, C. (2017). Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 271-284.

Jin, J. S., Kwon, S. O., Moon, D. C., Gurung, M., Lee, J. H., Kim, S. I. i Lee, J. C. (2011). *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PloS one*, 6, e17027.

Jin, H., Jiang, X., Yoo, H., Wang, T., Sung, C. G., Choi, U., Lee, C. R., Yu, H. i Koo, S. (2020). Synthesis of Chalcone-Derived Heteroaromatics with Antibacterial Activities. *ChemistrySelect*, 5, 12421-12424.

Johnson, T. L., Waack, U., Smith, S., Mobley, H. i Sandkvist, M. (2016). *Acinetobacter baumannii* is dependent on the type II secretion system and its substrate LipA for lipid utilization and in vivo fitness. *Journal of bacteriology*, 198, 711-719.

Joly-Guillou, M. L., Bergogne-Berezin, E. i Vieu, J. (1990). Epidémiologie et résistance aux antibiotiques des *Acinetobacter* en milieu hospitalier (bilan de 5 années). *La Presse médicale* (1983), 19, 357-361.

Joly-Guillou, M. L., Wolff, M., Pocidalo, J. J., Walker, F. i Carbon, C. (1997). Use of a new mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia to evaluate the postantibiotic effect of imipenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41, 345-351.

Jovcic, B., Novovic, K., Dekic, S. i Hrenovic, J. (2021). Colistin Resistance in Environmental Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Drug Resistance*, 27, 328-336.

Jung, S. Y., Lee, S. H., Lee, S. Y., Yang, S., Noh, H., Chung, E. K. i Lee, J. I. (2017). Antimicrobials for the treatment of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia in critically ill patients: a systemic review and Bayesian network meta-analysis. *Critical Care*, 21, 1-15.

Juni, E. (2005). Genus *acinetobacter*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2, 425-437.

- Juttukonda, L. J., Chazin, W. J. i Skaar, E. P. (2016). *Acinetobacter baumannii* coordinates urea metabolism with metal import to resist host-mediated metal limitation. *MBio*, 7.
- Kabir, A. M. A., Shimizu, K., Aiba, Y., Igarashi, M., Takagi, A. i Koga, Y. (2000). The effect of sofalcone on indomethacin-induced gastric ulcers in a *Helicobacter pylori*-infected gnotobiotic murine model. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 14, 223-229.
- Kadri, S. S., Adjemian, J., Lai, Y. L., Spaulding, A. B., Ricotta, E., Prevots, D. R., Palmore, T. N., Rhee, C., Klompas, M., Dekker, J. P. and Powers III, J. H., Suffredini, A. F., Hooper, D. C., Fridkin, S., Danner, R. L. i National Institutes of Health Antimicrobial Resistance Outcomes Research Initiative (NIH-ARORI). (2018). Difficult-to-treat resistance in gram-negative bacteremia at 173 US hospitals: retrospective cohort analysis of prevalence, predictors, and outcome of resistance to all first-line agents. *Clinical Infectious Diseases*, 67, 1803-1814.
- Kalan, L. i Grice, E. A. (2018). Fungi in the wound microbiome. *Advances in wound care*, 7, 247-255.
- Kale, S. D., Dikshit, N., Kumar, P., Balamuralidhar, V., Khameneh, H. J., Malik, N. B. A., Koh, T. H., Tan, G. G. Y., Tan, T. T., Mortellaro, A. i Sukumaran, B. (2017). Nod2 is required for the early innate immune clearance of *Acinetobacter baumannii* from the lungs. *Scientific reports*, 7, 1-9.
- Kalil, A. C., Metersky, M. L., Klompas, M., Muscedere, J., Sweeney, D. A., Palmer, L. B., Napolitano, L. M., O'Grady, N. P., Bartlett, J. G., Carratalà, J., El Solh, A. A., Ewig, S., Fey, P. D., File Jr, T. M., Restrepo, M. I., Roberts, J. A., Waterer, G. W., Cruse, P., Knight, S. L. i Brozek, J. L. (2016). Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clinical Infectious Diseases*, 63, e61-e111.
- Kamiya, S., Osaki, T., Kumada, J., Yamaguchi, H. i Taguchi, H. (1997). Effect of sofalcone on adherence, production of vacuolating toxin, and induction of interleukin-8 secretion by *Helicobacter pylori*. *Journal of clinical gastroenterology*, 25, S172-S178.
- Kaparakis-Liaskos, M. i Ferrero, R. L. (2015). Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews Immunology*, 15, 375-387.
- Kaplan, J. B. (2011). Antibiotic-induced biofilm formation. *The International journal of artificial organs*, 34, 737-751.
- Karalewitz, A. P. A. i Miller, S. I. (2018). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* chloramphenicol resistance requires an inner membrane permease. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62.
- Karthikeyan, K., Thirunarayan, M. A. i Krishnan, P. (2010). Coexistence of bla OXA-23 with bla NDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65, 2253-2254.
- Kastbjerg, V. G., Larsen, M. H., Gram, L. i Ingmer, H. (2010). Influence of sublethal concentrations of common disinfectants on expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 76, 303-309.

- Kasten, M. J. (1999). Clindamycin, metronidazole, and chloramphenicol. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 74, No. 8, pp. 825-833). Elsevier.
- Kawamura-Sato, K., Wachino, J. I., Kondo, T., Ito, H. i Arakawa, Y. (2008). Reduction of disinfectant bactericidal activities in clinically isolated *Acinetobacter* species in the presence of organic material. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *61*, 568-576.
- Kawamura-Sato, K., Wachino, J. I., Kondo, T., Ito, H. i Arakawa, Y. (2010). Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* species. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *65*, 1975-1983.
- Kazmierczak, K. M., Tsuji, M., Wise, M. G., Hackel, M., Yamano, Y., Echols, R. i Sahm, D. F. (2019). In vitro activity of cefiderocol, a siderophore cephalosporin, against a recent collection of clinically relevant carbapenem-non-susceptible Gram-negative bacilli, including serine carbapenemase-and metallo- β -lactamase-producing isolates (SIDERO-WT-2014 Study). *International journal of antimicrobial agents*, *53*, 177-184.
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, *8*, 634-644.
- Kengkla, K., Kongpakwattana, K., Saokaew, S., Apisarnthanarak, A. i Chaiyakunapruk, N. (2018). Comparative efficacy and safety of treatment options for MDR and XDR *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and network meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*, 22-32.
- Kenyon, J. J. i Hall, R. M. (2013). Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes. *PloS one*, *8*, e62160.
- Kiffer, C. R., Sampaio, J. L., Sinto, S., Oplustil, C. P., Koga, P. C., Arruda, A. C., Turner, P. J. i Mendes, C. (2005). In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *52*, 317-322.
- Kim, S. W., Choi, C. H., Moon, D. C., Jin, J. S., Lee, J. H., Shin, J. H., Kim, J. M., Lee, Y. C., Seol, S. Y., Cho, D. T. i Lee, J. C. (2009a). Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS microbiology letters*, *301*, 224-231.
- Kim, S., Bae, S. W., Lee, J. S. i Park, J. (2009b). Recyclable gold nanoparticle catalyst for the aerobic alcohol oxidation and C–C bond forming reaction between primary alcohols and ketones under ambient conditions. *Tetrahedron*, *65*, 1461-1466.
- Kim, H. A., Ryu, S. Y., Seo, I., Suh, S. I., Suh, M. H. i Baek, W. K. (2015). Biofilm formation and colistin susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolated from Korean nosocomial samples. *Microbial Drug Resistance*, *21*, 452-457.
- Kim, J., Lee, J. Y., Lee, H., Choi, J. Y., Kim, D. H., Wi, Y. M., Peck, K. R. i Ko, K. S. (2017). Microbiological features and clinical impact of the type VI secretion system (T6SS) in *Acinetobacter baumannii* isolates causing bacteremia. *Virulence*, *8*, 1378-1389.
- Kinsella, R. L., Lopez, J., Palmer, L. D., Salinas, N. D., Skaar, E. P., Tolia, N. H. i Feldman, M. F. (2017). Defining the interaction of the protease CpaA with its type II secretion chaperone CpaB and

its contribution to virulence in *Acinetobacter* species. *Journal of Biological Chemistry*, 292, 19628-19638.

Klotz, P., Jacobmeyer, L., Stamm, I., Leidner, U., Pfeifer, Y., Semmler, T., Prenger-Berninghoff, E. i Ewers, C. (2018). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST294 harbouring the OXA-72 carbapenemase from a captive grey parrot. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73, 1098-1100.

Knapp, S., de Vos, A. F., van der Windt, G. J., Florquin, S., Randle, J. i van der Poll, T. (2006). Caspase-1 is an important mediator of lung inflammation during *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *Inflammatory Response to Severe Bacterial Infections*, 81.

Kobelnik, M., Ferreira, L. M. B., Regasini, L. O., Dutra, L. A., da Silva Bolzani, V. i Ribeiro, C. A. (2018). Thermal study of chalcones. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 132, 425-431.

Koenigs, A., Stahl, J., Averhoff, B., Göttig, S., Wichelhaus, T. A., Wallich, R., Zipfel, P. F. i Kraiczy, P. (2016). CipA of *Acinetobacter baumannii* is a novel plasminogen binding and complement inhibitory protein. *The Journal of infectious diseases*, 213, 1388-1399.

Kojic, M., Strahinic, I. i Topisirovic, L. (2005). Proteinase PI and lactococcin A genes are located on the largest plasmid in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* S50. *Canadian journal of microbiology*, 51, 305-314.

Kõljalg, S., Vuopio-Varkila, J., Lyytikäinen, O., Mikelsaar, M. i Wadström, T. (1996). Cell surface properties of *Acinetobacter baumannii*. *Apmis*, 104, 659-665.

Konduru, N. K., Dey, S., Sajid, M., Owais, M. i Ahmed, N. (2013). Synthesis and antibacterial and antifungal evaluation of some chalcone based sulfones and bisulfones. *European journal of medicinal chemistry*, 59, 23-30.

Kongsamran, S. i Dhiraputra, C. (1972). The growth of *Pseudomonas aeruginosa*, in normal saline solution and tap water. *Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmai het Thangphaet*, 55, 736-737.

Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P. i Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 740.

Korneev, K. V., Arbatsky, N. P., Molinaro, A., Palmigiano, A., Shaikhutdinova, R. Z., Shneider, M. M., Pier, G. B., Kondakova, A. N., Sviriyaeva, E. N., Sturiale, L., Garozzo, D., Kruglov, A. A., Nedospasov, S. A., Drutskaya, M. S., Knirel, Y. A. i Kuprash, D. V. (2015). Structural relationship of the lipid A acyl groups to activation of murine toll-like receptor 4 by lipopolysaccharides from pathogenic strains of *Burkholderia mallei*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in immunology*, 6, 595.

Kostyanov, T., Xavier, B. B., García-Castillo, M., Lammens, C., Acosta, J. B. F., Rodríguez-Baño, J., Cantón, R., Glupczynski, Y. i Goossens, H. (2021). Phenotypic and molecular characterizations of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected within the EURECA study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 106345.

Kröger, C., Kary, S. C., Schauer, K. i Cameron, A. D. (2017). Genetic regulation of virulence and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Genes*, 8, 12.

- Kröger, C., MacKenzie, K. D., Alshabib, E. Y., Kirzinger, M. W. B., Suchan, D. M., Chao, T. C., Akulova, V., Miranda-CasoLuengo, A. A., Monzon, V. A., Conway, T., Sivasankaran, S. K. i Cameron, A. D. S. (2018). The primary transcriptome, small RNAs and regulation of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *Nucleic acids research*, *46*, 9684-9698.
- Król, J. E., Wojtowicz, A. J., Rogers, L. M., Heuer, H., Smalla, K., Krone, S. M. i Top, E. M. (2013). Invasion of *E. coli* biofilms by antibiotic resistance plasmids. *Plasmid*, *70*, 110-119.
- Kucerova-Chlupacova, M., Vyskovska-Tyllova, V., Richterova-Finkova, L., Kunes, J., Buchta, V., Vejsova, M., Paterova, P., Semelkova, L., Jandourek, O. i Opletalova, V. (2016). Novel halogenated pyrazine-based chalcones as potential antimicrobial drugs. *Molecules*, *21*, 1421.
- Kücken, D., Feucht, H. H. i Kaulfers, P. M. (2000). Association of *qacE* and *qacE* $\Delta 1$ with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, *183*, 95-98.
- Kumari, A. M. S., Routray, A., Yadav, D. i Madhavan, R. (2013). Imipenem resistance and biofilm production in *Acinetobacter*. *Drug invention today*, *5*, 256-258.
- Kunthalert, D., Baothong, S., Khetkam, P., Chokchaisiri, S. i Suksamrarn, A. (2014). A chalcone with potent inhibiting activity against biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Microbiology and immunology*, *58*, 581-589.
- Kuo, H. Y., Chao, H. H., Liao, P. C., Hsu, L., Chang, K. C., Tung, C. H., Chen, C. H. i Liou, M. L. (2017). Functional characterization of *Acinetobacter baumannii* lacking the RNA chaperone Hfq. *Frontiers in microbiology*, *8*, 2068.
- Kwon, M. S., Kim, N., Seo, S. H., Park, I. S., Cheedra, R. K. i Park, J. (2005). Recyclable palladium catalyst for highly selective α alkylation of ketones with alcohols. *Angewandte Chemie International Edition*, *44*, 6913-6915.
- Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D. i Tragiannidis, A. (2021). *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens*, *10*, 373.
- Landman, D., Georgescu, C., Martin, D. A. i Quale, J. (2008). Polymyxins revisited. *Clinical microbiology reviews*, *21*, 449-465.
- Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J. i Burt, S. A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical reviews in microbiology*, *40*, 76-94.
- Langsrud, S., Møretro, T. i Sundheim, G. (2003). Characterization of *Serratia marcescens* surviving in disinfecting footbaths. *Journal of Applied Microbiology*, *95*, 186-195.
- Lashinsky, J. N., Henig, O., Pogue, J. M. i Kaye, K. S. (2017). Minocycline for the treatment of multidrug and extensively drug-resistant *A. baumannii*: a review. *Infectious diseases and therapy*, *6*, 199-211.
- Lechner, D., Gibbons, S., & Bucar, F. (2008). Plant phenolic compounds as ethidium bromide efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *62*, 345-348.

- Lee, K., Yum, J. H., Yong, D., Lee, H. M., Kim, H. D., Docquier, J. D., Rossolini, G. M. i Chong, Y. (2005). Novel acquired metallo- β -lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *49*, 4485-4491.
- Lee, J. C., Koerten, H., Van den Broek, P., Beekhuizen, H., Wolterbeek, R., Van den Barselaar, M., Van der Reijden, T., Van der Meer, J., Van de Gevel, J. i Dijkshoorn, L. (2006). Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Research in microbiology*, *157*, 360-366.
- Lee, H. W., Koh, Y. M., Kim, J., Lee, J. C., Lee, Y. C., Seol, S. Y. i Cho, D. T. (2008). Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clinical microbiology and infection*, *14*, 49-54.
- Lee, J. H., Kim, Y. G., Khadke, S. K., Yamano, A., Woo, J. T. i Lee, J. (2019). Antimicrobial and antibiofilm activities of prenylated flavanones from *Macaranga tanarius*. *Phytomedicine*, *63*, 153033.
- Lees-Miller, R. G., Iwashkiw, J. A., Scott, N. E., Seper, A., Vinogradov, E., Schild, S. i Feldman, M. F. (2013). A common pathway for O-linked protein-glycosylation and synthesis of capsule in *Acinetobacter baumannii*. *Molecular microbiology*, *89*, 816-830.
- Lei, L., Yang, F., Zou, J., Jing, H., Zhang, J., Xu, W., Zou, Q., Zhang, J. i Wang, X. (2019). DNA vaccine encoding OmpA and Pal from *Acinetobacter baumannii* efficiently protects mice against pulmonary infection. *Molecular biology reports*, *46*, 5397-5408.
- Leroy, S., Even, S., Micheau, P., de La Foye, A., Laroute, V., Le Loir, Y. i Talon, R. (2020). Transcriptomic Analysis of *Staphylococcus xylosum* in Solid Dairy Matrix Reveals an Aerobic Lifestyle Adapted to Rind. *Microorganisms*, *8*, 1807.
- Lesho, E., Yoon, E. J., McGann, P., Snesrud, E., Kwak, Y., Milillo, M., Onmus-Leone, F., Preston, L., St. Clair, K., Nikolich, M., Viscount, H., Wortmann, G., Zapor, M., Grillot-Courvalin, C., Courvalin, P., Clifford, R. i Waterman, P. E. (2013). Emergence of colistin-resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* containing a novel pmrCAB operon during colistin therapy of wound infections. *The Journal of infectious diseases*, *208*, 1142-1151.
- Leung, W. S., Chu, C. M., Tsang, K. Y., Lo, F. H., Lo, K. F. i Ho, P. L. (2006). Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. *Chest*, *129*, 102-109.
- Leus, I. V., Weeks, J. W., Bonifay, V., Smith, L., Richardson, S. i Zgurskaya, H. I. (2018). Substrate specificities and efflux efficiencies of RND efflux pumps of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology*, *200*.
- Levy-Blitchtein, S., Roca, I., Plasencia-Rebata, S., Vicente-Taboada, W., Velásquez-Pomar, J., Muñoz, L., Moreno-Morales, J., Pons, M. J., del Valle-Mendoza, J. i Vila, J. (2018). Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Peru. *Emerging microbes & infections*, *7*, 1-9.

- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annual review of microbiology*, 64, 357-372.
- Li, J., Rayner, C. R., Nation, R. L., Owen, R. J., Spelman, D., Tan, K. E. i Liolios, L. (2006). Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50, 2946-2950.
- Li, H. i Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *bioinformatics*, 25, 1754-1760.
- Li, Y. i Chen, D. (2011). Novel and Efficient One Pot Condensation Reactions between Ketones and Aromatic Alcohols in the Presence of CrO₃ Producing α , β -Unsaturated Carbonyl Compounds. *Chinese Journal of Chemistry*, 29, 2086-2090.
- Li, X., Sheng, J., Huang, G., Ma, R., Yin, F., Song, D., Zhao, C. i Ma, S. (2015). Design, synthesis and antibacterial activity of cinnamaldehyde derivatives as inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 32-41.
- Li, H., Wang, Q., Wang, R., Zhang, Y., Wang, X. i Wang, H. (2017). Global regulator SoxR is a negative regulator of efflux pump gene expression and affects antibiotic resistance and fitness in *Acinetobacter baumannii*. *Medicine*, 96.
- Li, S., Chen, D. Q., Ji, L., Sun, S., Jin, Z., Jin, Z. L., Sun, H. W., Zeng, H., Zhang, W. J., Lu, D. S., Luo, P., Zhao, A. N., Luo, J., Zou, Q. M. i Li, H. B. (2020). Development of different methods for preparing *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles vaccine: impact of preparation method on protective efficacy. *Frontiers in immunology*, 11, 1069.
- Liao, Y. T., Kuo, S. C., Chiang, M. H., Lee, Y. T., Sung, W. C., Chen, Y. H., Chen, T. L. i Fung, C. P. (2015). *Acinetobacter baumannii* extracellular OXA-58 is primarily and selectively released via outer membrane vesicles after Sec-dependent periplasmic translocation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59, 7346-7354.
- Lilly, E. A., Ikeh, M., Nash, E. E., Fidel Jr, P. L. i Noverr, M. C. (2018). Immune protection against lethal fungal-bacterial intra-abdominal infections. *MBio*, 9, e01472-17.
- Lima, W. G., Brito, J. C. M., Cardoso, B. G., Cardoso, V. N., de Paiva, M. C., de Lima, M. E. i Fernandes, S. O. A. (2020). Rate of polymyxin resistance among *Acinetobacter baumannii* recovered from hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39, 1427-1438.
- Lin, L., Tan, B., Pantapalangkoor, P., Ho, T., Baquir, B., Tomaras, A., Montgomery, J. I., Barbacci, E. G., Hujer, K., Bonomo, R. A., Fernandez, L., Hancock, R. E. W., Adams, M. D., French, S. W., Buslon, V. S. i Spellberg, B. (2012). Inhibition of LpxC protects mice from resistant *Acinetobacter baumannii* by modulating inflammation and enhancing phagocytosis. *MBio*, 3.
- Lin, M. F. i Lan, C. Y. (2014). Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases: WJCC*, 2, 787.
- Lin, M. F., Lin, Y. Y., Yeh, H. W. i Lan, C. Y. (2014). Role of the BaeSR two-component system in the regulation of *Acinetobacter baumannii* adeAB genes and its correlation with tigecycline susceptibility. *BMC microbiology*, 14, 1-12.

- Lin, M. F., Lin, Y. Y. i Lan, C. Y. (2015). The role of the two-component system BaeSR in disposing chemicals through regulating transporter systems in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*, *10*, e0132843.
- Lin, M. F., Lin, Y. Y. i Lan, C. Y. (2020). Characterization of biofilm production in different strains of *Acinetobacter baumannii* and the effects of chemical compounds on biofilm formation. *PeerJ*, *8*, e9020.
- Liu, G. Q., Algeri, S., Ceci, A., Garattini, S., Gobbi, M. i Murai, S. (1984). Stimulation of serotonin synthesis in rat brain after antiepilepsirine, an antiepileptic piperine derivative. *Biochemical pharmacology*, *33*, 3883-3886.
- Liu, X. F., Zheng, C. J., Sun, L. P., Liu, X. K. i Piao, H. R. (2011). Synthesis of new chalcone derivatives bearing 2, 4-thiazolidinedione and benzoic acid moieties as potential anti-bacterial agents. *European journal of medicinal chemistry*, *46*, 3469-3473.
- Liu, C. C., Kuo, H. Y., Tang, C. Y., Chang, K. C. i Liou, M. L. (2014). Prevalence and mapping of a plasmid encoding a type IV secretion system in *Acinetobacter baumannii*. *Genomics*, *104*, 215-223.
- Livak, K. J. i Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, *25*, 402-408.
- Livermore, D. M. i Woodford, N. (2006). The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Trends in microbiology*, *14*, 413-420.
- Lob, S. H., Hoban, D. J., Sahm, D. F. i Badal, R. E. (2016). Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents*, *47*, 317-323.
- Loehfelm, T. W., Luke, N. R. i Campagnari, A. A. (2008). Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *Journal of bacteriology*, *190*, 1036-1044.
- Lolans, K., Rice, T. W., Munoz-Price, L. S. i Quinn, J. P. (2006). Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *50*, 2941-2945.
- Lopez, J., Ly, P. M. i Feldman, M. F. (2020). The tip of the VgrG spike is essential to functional type VI secretion system assembly in *Acinetobacter baumannii*. *MBio*, *11*.
- López-Rojas, R., Domínguez-Herrera, J., McConnell, M. J., Docobo-Peréz, F., Smani, Y., Fernández-Reyes, M., Rivas, L. i Pachón, J. (2011). Impaired virulence and in vivo fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Infectious Diseases*, *203*, 545-548.
- López-Rojas, R., Smani, Y. i Pachón, J. (2013). Treating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection by blocking its virulence factors. *Expert review of anti-infective therapy*, *11*, 231-233.
- Low, K. E. i Howell, P. L. (2018). Gram-negative synthase-dependent exopolysaccharide biosynthetic machines. *Current opinion in structural biology*, *53*, 32-44.

- Lukić-Grlić, A., Kos, M., Žižek, M., Luxner, J., Grisold, A., Zarfel, G. i Bedenić, B. (2019). Emergence of Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinases in *Acinetobacter baumannii* in Children from Croatia. *Chemotherapy*, *64*, 167-172.
- Lukovic, B., Gajic, I., Dimkic, I., Kekic, D., Zornic, S., Pozder, T., Radisavljevic, S., Opavski, N., Kojic, M. i Ranin, L. (2020). The first nationwide multicenter study of *Acinetobacter baumannii* recovered in Serbia: emergence of OXA-72, OXA-23 and NDM-1-producing isolates. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *9*, 1-12.
- Ma, F., Shen, C., Zheng, X., Liu, Y., Chen, H., Zhong, L., Liang, Y., Liao, K., Xia, Y., Tian, G. B. i Yang, Y. (2019). Identification of a novel plasmid carrying mcr-4.3 in an *Acinetobacter baumannii* strain in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *63*, e00133-19.
- Madsen, J. S., Burmølle, M., Hansen, L. H. i Sørensen, S. J. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *65*, 183-195.
- Magill, S. S., Edwards, J. R., Beldavs, Z. G., Dumyati, G., Janelle, S. J., Kainer, M. A., Lynfield, R., Nadle, J., Neuhauser, M. M., Ray, S. M., Richards, K., Rodriguez, R., Thompson, D. L. i Fridkin, S. K. (2014). Prevalence of antimicrobial use in US acute care hospitals, May-September 2011. *Jama*, *312*, 1438-1446.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. T., Carmeli, Y., Falagas, M. T., Giske, C. T., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T. i Monnet, D. T. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, *18*, 268-281.
- Mahapatra, D. K., Bharti, S. K. i Asati, V. (2015). Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. *European journal of medicinal chemistry*, *98*, 69-114.
- Maillard, J. Y. (2013). Mechanisms of bacterial resistance to microbicides. *Russell, Hugo & Ayliffe's: Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, 108-120.
- Maillard, J. Y. (2018). Resistance of bacteria to biocides. *Microbiology spectrum*, *6*, 6-2.
- Malešević, M., Vasiljević, Z., Sovtić, A., Filipić, B., Novović, K., Kojić, M. i Jovčić, B. (2017). Virulence traits associated with *Burkholderia cenocepacia* ST856 epidemic strain isolated from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *6*, 1-9.
- Malik, S., Kaminski, M., Landman, D. i Quale, J. (2020). Cefiderocol Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Roles of β -Lactamases, Siderophore Receptors, and Penicillin Binding Protein 3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *64*.
- Mangas, E. L., Rubio, A., Álvarez-Marín, R., Labrador-Herrera, G., Pachón, J., Pachón-Ibáñez, M. E., Divina, F., i Pérez-Pulido, A. J. (2019). Pangenome of *Acinetobacter baumannii* uncovers two groups of genomes, one of them with genes involved in CRISPR/Cas defence systems associated with the absence of plasmids and exclusive genes for biofilm formation. *Microbial genomics*, *5*.

- Manikal, V. M., Landman, D., Saurina, G., Oydna, E., Lal, H. i Quale, J. (2000). Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clinical infectious diseases*, *31*, 101-106.
- Maragakis, L. L., Cosgrove, S. E., Song, X., Kim, D., Rosenbaum, P., Ciesla, N., Srinivasan, A., Ross, T., Carroll, K. i Perl, T. M. (2004). An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with pulsatile lavage wound treatment. *Jama*, *292*, 3006-3011.
- Marchand, I., Damier-Piolle, L., Courvalin, P. i Lambert, T. (2004). Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *48*, 3298-3304.
- 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 research*, *16*, 1829-1836.
- Marion, C. R., Lee, J., Sharma, L., Park, K. S., Lee, C., Liu, W., Liu, P., Feng, J., Gho, Y. S. i Cruz, C. S. D. (2019). Toll-like receptors 2 and 4 modulate pulmonary inflammation and host factors mediated by outer membrane vesicles derived from *Acinetobacter baumannii*. *Infection and immunity*, *87*.
- Marrapu, V. K., Chaturvedi, V., Singh, S., Singh, S., Sinha, S. i Bhandari, K. (2011). Novel aryloxy azolyl chalcones with potent activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *European journal of medicinal chemistry*, *46*, 4302-4310.
- Marti, S., Sánchez-Céspedes, J., Alba, V. i Vila, J. (2009). In vitro activity of doripenem against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *International journal of antimicrobial agents*, *33*, 181-182.
- Marti, S., Chabane, Y. N., Alexandre, S., Coquet, L., Vila, J., Jouenne, T. i Dé, E. (2011). Growth of *Acinetobacter baumannii* in pellicle enhanced the expression of potential virulence factors. *PLoS one*, *6*, e26030.
- Martín-Rodríguez, A. J., Ticona, J. C., Jiménez, I. A., Flores, N., Fernández, J. J. i Bazzocchi, I. L. (2015). Flavonoids from *Piper delinatum* modulate quorum-sensing-regulated phenotypes in *Vibrio harveyi*. *Phytochemistry*, *117*, 98-106.
- Martinez, J., Fernandez, J. S., Liu, C., Hoard, A., Mendoza, A., Nakanouchi, J., Rodman, N., Courville, R., Tuttobene, M. R., Lopez, C., Gonzalez, L. J., Shahrestani, P., Papp-Wallace, K. M., Vila, A. J., Tolmasky, M. E., Bonomo, R. A., Sieira, R. i Ramirez, M. S. (2019). Human pleural fluid triggers global changes in the transcriptional landscape of *Acinetobacter baumannii* as an adaptive response to stress. *Scientific reports*, *9*, 1-12.
- Martins-Sorenson, N., Snesrud, E., Xavier, D. E., Cacci, L. C., Iavarone, A. T., McGann, P., Riley, L. W. i Moreira, B. M. (2020). A novel plasmid-encoded mcr-4.3 gene in a colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *75*, 60-64.
- Martro, E., Hernandez, A., Ariza, J., Domínguez, M. A., Matas, L., Argerich, M. J., Martin, R. i Ausina, V. (2003). Assessment of *Acinetobacter baumannii* susceptibility to antiseptics and disinfectants. *Journal of Hospital Infection*, *55*, 39-46.

- Matilla-Cuenca, L., Gil, C., Cuesta, S., Rapún-Araiz, B., Žiemytė, M., Mira, A., Lasa, I. i Valle, J. (2020). Antibiofilm activity of flavonoids on staphylococcal biofilms through targeting BAP amyloids. *Scientific reports*, *10*, 1-12.
- Matos, M. J., Vazquez-Rodriguez, S., Uriarte, E. i Santana, L. (2015). Potential pharmacological uses of chalcones: a patent review (from June 2011–2014). *Expert opinion on therapeutic patents*, *25*, 351-366.
- Mbaveng, A. T., Ngameni, B., Kuete, V., Simo, I. K., Ambassa, P., Roy, R., Bezabih, M., Etoa, F. X., Ngadjui, B. T., Abegaz, B. M., Meyer, J. M., Lall, N. i Beng, V. P. (2008). Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). *Journal of ethnopharmacology*, *116*, 483-489.
- McBain, A. J. i Gilbert, P. (2001). Biocide tolerance and the harbingers of doom. *International biodeterioration & biodegradation*, *47*, 55-61.
- McConnell, M. J., Rumbo, C., Bou, G. i Pachón, J. (2011). Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Acinetobacter baumannii*. *Vaccine*, *29*, 5705-5710.
- McConnell, M. J., Pérez-Ordóñez, A., Pérez-Romero, P., Valencia, R., Lepe, J. A., Vázquez-Barba, I. i Pachón, J. (2012). Quantitative real-time PCR for detection of *Acinetobacter baumannii* colonization in the hospital environment. *Journal of clinical microbiology*, *50*, 1412.
- McConnell, M. J., Actis, L. i Pachón, J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS microbiology reviews*, *37*, 130-155.
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D. i Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, *10*, 39-50.
- McQueary, C. N. i Actis, L. A. (2011). *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties. *The Journal of Microbiology*, *49*, 243-250.
- McQueary, C. N., Kirkup, B. C., Si, Y., Barlow, M., Actis, L. A., Craft, D. W. i Zurawski, D. V. (2012). Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. *Journal of microbiology*, *50*, 434-443.
- Meagher, A. K., Ambrose, P. G., Grasela, T. H. i Ellis-Grosse, E. J. (2005). Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile for tigecycline—a new glycylcycline antimicrobial agent. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *52*, 165-171.
- Mendez, J. A., Soares, N. C., Mateos, J., Gayoso, C., Rumbo, C., Aranda, J., Tomas, M. i Bou, G. (2012). Extracellular proteome of a highly invasive multidrug-resistant clinical strain of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of proteome research*, *11*, 5678-5694.
- Merino, M., Poza, M., Roca Subirà, I., Barba, M. J., Sousa, M. D., Vila, J. i Bou, G. (2014). Nosocomial outbreak of a multiresistant *Acinetobacter baumannii* expressing OXA-23 carbapenemase in Spain. *Microbial Drug Resistance*, *20*, 259-263.

Messier, C., Epifano, F., Genovese, S. i Grenier, D. (2011). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation and yeast-hyphal transition by 4-hydroxycordoin. *Phytomedicine*, *18*, 380-383.

Metan, G., Alp, E., Aygen, B. i Sumerkan, B. (2007). *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *60*, 197-199.

Meyer, B. i Cookson, B. (2010). Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control?. *Journal of Hospital Infection*, *76*, 200-205.

Misic, D., Asanin, J., Spersger, J., Szostak, M. i Loncaric, I. (2018). OXA-72-mediated carbapenem resistance in sequence type 1 multidrug (colistin)-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with urinary tract infection in a dog from Serbia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *62*, e00219-18.

Mizar, P., Arya, R., Kim, T., Cha, S., Ryu, K. S., Yeo, W. S., Bae, T., Kim, D. W., Park, K. H., Kim, K. K. i Lee, S. S. (2018). Total Synthesis of Xanthoangelol B and Its Various Fragments: Toward Inhibition of Virulence Factor Production of *Staphylococcus aureus*. *Journal of medicinal chemistry*, *61*, 10473-10487.

Modarresi, F., Azizi, O., Shakibaie, M. R., Motamedifar, M., Mosadegh, E. i Mansouri, S. (2015). Iron limitation enhances acyl homoserine lactone (AHL) production and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*, *6*, 152-161.

Moffatt, J. H., Harper, M., Harrison, P., Hale, J. D., Vinogradov, E., Seemann, T., Henry, R., Crane, B., Michael, F. S., Cox, A. D., Adler, B., Nation R. L., Li, J. i Boyce, J. D. (2010). Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *54*, 4971-4977.

Moffatt, J. H., Harper, M., Mansell, A., Crane, B., Fitzsimons, T. C., Nation, R. L., Li, J., Adler, B. i Boyce, J. D. (2013). Lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* shows altered signaling through host Toll-like receptors and increased susceptibility to the host antimicrobial peptide LL-37. *Infection and immunity*, *81*, 684-689.

Moffatt, J. H., Harper, M. i Boyce, J. D. (2019). Mechanisms of polymyxin resistance. *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*, 55-71.

Mohammadi, M., Khayat, H., Sayehmiri, K., Soroush, S., Sayehmiri, F., Delfani, S., Bogdanovic, L. i Taherikalani, M. (2017). Synergistic effect of colistin and rifampin against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. *The open microbiology journal*, *11*, 63.

Moon, D. C., Choi, C. H., Lee, J. H., Choi, C. W., Kim, H. Y., Park, J. S., Kim, S. I. i Lee, J. C. (2012). *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. *The Journal of Microbiology*, *50*, 155-160.

Morax, V. (1896). *Note sur un diplobacille pathogène pour la conjonctivite humaine*. Charaire.

Morão, L. G., Lorenzoni, A. S., Chakraborty, P., Ayusso, G. M., Cavalca, L. B., Santos, M. B., Marques, B. C., Dilarri, G., Zamuner, C., Regasini, L. O., Ferreira, H. i Scheffers, D. J. (2020).

- Investigating the Modes of Action of the Antimicrobial Chalcones BC1 and T9A. *Molecules*, *25*, 4596.
- Mousa, M., Schwartz, D., Carmeli, Y. i Nutman, A. (2019). Droplet aerosol dissemination of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* surrounding ventilated patients. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *40*, 365-367.
- Muharini, R., Diaz, A., Ebrahim, W., Mandi, A., Kurtan, T., Rehberg, N., Kalscheuer, R., Hartmann, R., Orfali, R. S., Lin, W., Liu, Z. i Proksch, P. (2017). Antibacterial and cytotoxic phenolic metabolites from the fruits of *Amorpha fruticosa*. *Journal of natural products*, *80*, 169-180.
- Mukaiyama, T. (1982). The directed aldol reaction. *Organic reactions*.
- Munoz-Price, L. S., Namias, N., Cleary, T., Fajardo-Aquino, Y., DePascale, D., Arheart, K. L., Rivera, J. I. i Doi, Y. (2013). *Acinetobacter baumannii*: association between environmental contamination of patient rooms and occupant status. *Infect Control Hosp Epidemiol*, *34*, 517-520.
- Mussi, M. A., Limansky, A. S. i 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *49*, 1432-1440.
- Mussi, M. A., Gaddy, J. A., Cabruja, M., Arivett, B. A., Viale, A. M., Rasia, R. i Actis, L. A. (2010). The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *Journal of bacteriology*, *192*, 6336-6345.
- Mustapha, M. M., Li, B., Pacey, M. P., Mettus, R. T., McElheny, C. L., Marshall, C. W., Ernst, R. K., Cooper, V. S. i Doi, Y. (2018). Phylogenomics of colistin-susceptible and resistant XDR *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*, 2952-2959.
- Naas, T., Bogaerts, P., Bauraing, C., Degheldre, Y., Glupczynski, Y. i Nordmann, P. (2006). Emergence of PER and VEB extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*, 178-182.
- Nafplioti, K., Galani, I., Angelidis, E., Adamou, P., Moraitou, E., Giannopoulou, P., Chra, P., Damala, M., Vogiatzakis, E., Triikka-Graphakos, E., Baka, V., Prifti, E., Antoniadou, A. i Souli, M. (2020). Dissemination of international clone II *Acinetobacter baumannii* strains coproducing OXA-23 carbapenemase and 16S rRNA methylase ArmA in Athens, Greece. *Microbial Drug Resistance*, *26*, 9-13.
- Nairn, B. L., Lonergan, Z. R., Wang, J., Braymer, J. J., Zhang, Y., Calcutt, M. W., Lisher, J. P., Gilston, B. A., Chazin, W. J., de Crécy-Lagard, V., Giedroc, D. P. i Skaar, E. P. (2016). The response of *Acinetobacter baumannii* to zinc starvation. *Cell host & microbe*, *19*, 826-836.
- Narayanan, A., Nair, M. S., Karumathil, D. P., Baskaran, S. A., Venkitanarayanan, K. i Amalaradjou, M. A. R. (2016). Inactivation of *Acinetobacter baumannii* biofilms on polystyrene, stainless steel, and urinary catheters by octenidine dihydrochloride. *Frontiers in microbiology*, *7*, 847.

- Nash, E. E., Peters, B. M., Fidel, P. L. i Noverr, M. C. (2016). Morphology-independent virulence of *Candida* species during polymicrobial intra-abdominal infections with *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*, *84*, 90-98.
- Nation, R. L., Li, J., Cars, O., Couet, W., Dudley, M. N., Kaye, K. S., Mouton, J. W., Paterson, D. L., Tam, V. H., Theuretzbacher, U., Tsuji, B. T. i Turnidge, J. D. (2014). Consistent global approach on reporting of colistin doses to promote safe and effective use. *Clinical infectious diseases*, *58*, 139-141.
- Navidifar, T., Amin, M. i Rashno, M. (2019). Effects of sub-inhibitory concentrations of meropenem and tigecycline on the expression of genes regulating pili, efflux pumps and virulence factors involved in biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Infection and drug resistance*, *12*, 1099.
- Nemec, A. i Dijkshoorn, L. (2010). Variations in colistin susceptibility among different species of the genus *Acinetobacter*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *65*, 367-369.
- Nemec, A., Radolfova-Krizova, L., Maixnerova, M. i Sedo, O. (2017). *Acinetobacter colistiniresistens* sp. nov. (formerly genomic species 13 sensu Bouvet and Jeanjean and genomic species 14 sensu Tjernberg and Ursing), isolated from human infections and characterized by intrinsic resistance to polymyxins. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *67*, 2134-2141.
- Nhu, N. T. K., Riordan, D. W., Nhu, T. D. H., Thanh, D. P., Thwaites, G., Lan, N. P. H., Wren, B. W., Baker, S. i Stabler, R. A. (2016). The induction and identification of novel Colistin resistance mutations in *Acinetobacter baumannii* and their implications. *Scientific reports*, *6*, 1-8.
- Ni, L., Meng, C. Q. i Sikorski, J. A. (2004). Recent advances in therapeutic chalcones. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *14*, 1669-1691.
- Ni, W., Han, Y., Zhao, J., Wei, C., Cui, J., Wang, R. i Liu, Y. (2016). Tigecycline treatment experience against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and meta-analysis. *International journal of antimicrobial agents*, *47*, 107-116.
- Nie, D., Hu, Y., Chen, Z., Li, M., Hou, Z., Luo, X., Mao, X. i Xue, X. (2020). Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. *Journal of biomedical science*, *27*, 1-8.
- Nielsen, A. T. i Houlihan, W. J. (2004). The aldol condensation. *Organic reactions*, *16*, 1-438.
- Nijampatnam, B., Casals, L., Zheng, R., Wu, H. i Velu, S. E. (2016). Hydroxychalcone inhibitors of *Streptococcus mutans* glucosyl transferases and biofilms as potential anticaries agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *26*, 3508-3513.
- Nim, S., Baghel, P., Tran-Nguyen, V. K., Peres, B., Nguyen, K. A., Pietro, A. D., Falson, P., Prasad, R. i Boumendjel, A. (2018). Make azoles active again: chalcones as potent reversal agents of transporters-mediated resistance in *Candida albicans*. *Future medicinal chemistry*, *10*, 2177-2186.

- Niu, C., Clemmer, K. M., Bonomo, R. A. i Rather, P. N. (2008). Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology*, *190*, 3386-3392.
- Nordmann, P., Dortet, L. i Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!. *Trends in molecular medicine*, *18*, 263-272.
- Norton, M. D., Spilki, A. J. i Godoy, V. G. (2013). Antibiotic resistance acquired through a DNA damage-inducible response in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology*, *195*, 1335-1345.
- Noto, M. J., Boyd, K. L., Burns, W. J., Varga, M. G., Peek, R. M. i Skaar, E. P. (2015). Toll-like receptor 9 contributes to defense against *Acinetobacter baumannii* infection. *Infection and immunity*, *83*, 4134-4141.
- Novović, K., Mihajlović, S., Dinić, M., Malešević, M., Miljković, M., Kojić, M. i Jovčić, B. (2018). *Acinetobacter* spp. porin Omp33-36: Classification and transcriptional response to carbapenems and host cells. *PloS one*, *13*, e0201608.
- Nowakowska, Z. (2007). A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European journal of medicinal chemistry*, *42*, 125-137.
- Nucleo, E., Steffanoni, L., Fugazza, G., Migliavacca, R., Giacobone, E., Navarra, A., Pagani, L. i 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 microbiology*, *9*, 1-14.
- Nurtop, E., Bayındır Bilman, F., Menekse, S., Kurt Azap, O., Gönen, M., Ergonul, O. i Can, F. (2019). Promoters of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* infections. *Microbial Drug Resistance*, *25*, 997-1002.
- Oie, S. i Kamiya, A. (1996). Microbial contamination of antiseptics and disinfectants. *American journal of infection control*, *24*, 389-395.
- Oikonomou, O., Sarrou, S., Papagiannitsis, C. C., Georgiadou, S., Mantzaris, K., Zakyntinos, E., Dalekos, G. N. i Petinaki, E. (2015). Rapid dissemination of colistin and carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Central Greece: mechanisms of resistance, molecular identification and epidemiological data. *BMC infectious diseases*, *15*, 1-6.
- Olaitan, A. O., Berrazeg, M., Fagade, O. E., Adelowo, O. O., Alli, J. A. i Rolain, J. M. (2013). Emergence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase, Nigeria. *International Journal of Infectious Diseases*, *17*, e469-e470.
- Oliveira, M. S., Prado, G. V. B., Costa, S. F., Grinbaum, R. S. i Levin, A. S. (2008). Ampicillin/sulbactam compared with polymyxins for the treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *61*, 1369-1375.
- Omosa, L. K., Midiwo, J. O., Mbaveng, A. T., Tankeo, S. B., Seukep, J. A., Voukeng, I. K., Dzotam, J. K., Isemeki, J., Derese, S., Omolle, R. A., Efferth, T. i Kuete, V. (2016). Antibacterial activities and structure–activity relationships of a panel of 48 compounds from Kenyan plants against multidrug resistant phenotypes. *SpringerPlus*, *5*, 1-15.

- Öncül, O., Keskin, Ö., Acar, H. V., Küçükardalı, Y., Evrenkaya, R., Atasoyu, E. M., Top, C., Nalbant, S., Özkan, S., Emekdaş, G. and Çavuşlu, Ş., Us, M. H., Pahsa, A. i Gökben, M. (2002). Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *Journal of Hospital Infection*, *51*, 47-51.
- Ong, C. W., Lye, D. C., Khoo, K. L., Chua, G. S. W., Yeoh, S. F., Leo, Y. S., Tambyah, P. A. i Chua, A. C. (2009). Severe community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia: An emerging highly lethal infectious disease in the Asia–Pacific. *Respirology*, *14*, 1200-1205.
- Ophir, T. i Gutnick, D. L. (1994). A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*, 740-745.
- Orazi, G. i O’Toole, G. A. (2019). “It takes a village”: mechanisms underlying antimicrobial recalcitrance of polymicrobial biofilms. *Journal of bacteriology*, *202*, e00530-19.
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A. i Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, *31*, 3691-3693.
- Pakharukova, N., Tuittila, M., Paavilainen, S., Malmi, H., Parilova, O., Teneberg, S., Knight, S. D. i Zavialov, A. V. (2018). Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*, 5558-5563.
- Palmieri, M., D’Andrea, M. M., Pelegrin, A. C., Perrot, N., Mirande, C., Blanc, B., Legakis, N., Goossens, H., Rossolini, G. M. i Van Belkum, A. (2020). Abundance of colistin-resistant, OXA-23- and ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* belonging to international Clone 2 in Greece. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 668.
- Papenfort, K. i Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *14*, 576.
- Park, J. S., Lee, W. C., Yeo, K. J., Ryu, K. S., Kumarasiri, M., Heseck, D., Lee, M., Mobashery, S., Song, J. H., Kim, S. I., Lee, J. C., Cheong, C., Jeon, Y. H. i Kim, H. Y. (2012). Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the gram-negative bacterial outer membrane. *The FASEB Journal*, *26*, 219-228.
- Patamatamkul, S., Klungboonkrong, V., Praisarnti, P. i Jirakiat, K. (2017). A case-control study of community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia and melioidosis pneumonia in northeast Thailand: an emerging fatal disease with unique clinical features. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *87*, 79-86.
- Patil, V., Barragan, E., Patil, S. A., Patil, S. A. i Bugarin, A. (2016). Direct synthesis and antimicrobial evaluation of structurally complex chalcones. *ChemistrySelect*, *1*, 3647-3650.
- Paton, R., Miles, R. S., Hood, J. i Amyes, S. G. B. (1993). ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents*, *2*, 81-87.
- Paul, M., Daikos, G. L., Durante-Mangoni, E., Yahav, D., Carmeli, Y., Benattar, Y. D., Skiada, A., Andini, R., Eliakim-Raz, N., Nutman, A., Zusman, O., Antoniadou, A., Pafundi, P. C., Adler, A., Dickstein, Y., Pavleas, I., Zampino, R., Daitch, M. A., Bitterman, R., Zayyad, H., Koppel, F., Levi,

- I., Babich, T., Friberg, L. E., Mouton, J. W., Theuretzbacher, U. i Leibovici, L. (2018). Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*, *18*, 391-400.
- Peleg, A. Y., Seifert, H. i Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*, *21*, 538-582.
- Pelletier, M. R., Casella, L. G., Jones, J. W., Adams, M. D., Zurawski, D. V., Hazlett, K. R., Doi, Y., Ernst, R. K. (2013). Unique structural modifications are present in the lipopolysaccharide from colistin-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *57*, 4831-4840.
- Peng, Y., Leung, H. C., Yiu, S. M. i Chin, F. Y. (2012). IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*, *28*, 1420-1428.
- Penwell, W. F., DeGrace, N., Tentarelli, S., Gauthier, L., Gilbert, C. M., Arivett, B. A., Miller, A. A., Durand-Reville, T. F., Joubran, C. i Actis, L. A. (2015a). Discovery and characterization of new hydroxamate siderophores, baumannoferrin A and B, produced by *Acinetobacter baumannii*. *ChemBioChem*, *16*, 1896-1904.
- Penwell, W. F., Shapiro, A. B., Giacobbe, R. A., Gu, R. F., Gao, N., Thresher, J., McLaughlin, R. E., Huband, M. D., DeJonge, B. L., Ehmann, D. E. i Miller, A. A. (2015b). Molecular mechanisms of sulbactam antibacterial activity and resistance determinants in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *59*, 1680-1689.
- Pérez, A., Merino, M., Rumbo-Feal, S., Álvarez-Fraga, L., Vallejo, J. A., Beceiro, A., Ohneck, E. J., Mateos, J., Fernández-Puente, P., Actis, L. A., Poza, M. i Bou, G. (2017). The FhaB/FhaC two-partner secretion system is involved in adhesion of *Acinetobacter baumannii* AbH12O-A2 strain. *Virulence*, *8*, 959-974.
- Peterson, B. W., He, Y., Ren, Y., Zerdoum, A., Libera, M. R., Sharma, P. K., Van Winkelhoff, A. J., Neut, D., Stoodley, P., Van Der Mei, H. C. i Busscher, H. J. (2015). Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS microbiology reviews*, *39*, 234-245.
- Piepenbrink, K. H., Lillehoj, E., Harding, C. M., Labonte, J. W., Zuo, X., Rapp, C. A., Munson Jr, R. S., Goldblum, S. E., Feldman, M. F., Gray, J. J. i Sundberg, E. J. (2016). Structural diversity in the type IV pili of multidrug-resistant *Acinetobacter*. *Journal of Biological Chemistry*, *291*, 22924-22935.
- Piperaki, E. T., Tzouveleki, L. S., Miriagou, V. i Daikos, G. L. (2019). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: in pursuit of an effective treatment. *Clinical Microbiology and Infection*, *25*, 951-957.
- Poirel, L., Karim, A., Mercat, A., Thomas, I. L., Vahaboglu, H., Richard, C. i Nordmann, P. (1999). Extended-spectrum β -lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *43*, 157-158.

- Poirel, L., Menuteau, O., Agoli, N., Cattoen, C. i Nordmann, P. (2003). Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*, 3542-3547.
- Poirel, L., Cabanne, L., Vahaboglu, H. i Nordmann, P. (2005). Genetic environment and expression of the extended-spectrum β -lactamase blaPER-1 gene in gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *49*, 1708-1713.
- Poirel, L. i Nordmann, P. (2006a). Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *50*, 1442-1448.
- Poirel, L. i Nordmann, P. (2006b). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, *12*, 826-836.
- Poirel, L., Pitout, J. D. i Nordmann, P. (2007). Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences.
- Poirel, L., Mugnier, P. D., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Rapoport, M. J., Petroni, A. i Nordmann, P. (2009). ISCR2, another vehicle for blaVEB gene acquisition. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *53*, 4940-4943.
- Poirel, L., Naas, T. i Nordmann, P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *54*, 24-38.
- Poirel, L., Bonnin, R. A. i Nordmann, P. (2011). Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. *IUBMB life*, *63*, 1061-1067.
- Poirel, L., Jayol, A. i Nordmann, P. (2017). Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clinical microbiology reviews*, *30*, 557-596.
- Pomba, C., Endimiani, A., Rossano, A., Saial, D., Couto, N. i Perreten, V. (2014). First report of OXA-23-mediated carbapenem resistance in sequence type 2 multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with urinary tract infection in a cat. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *58*, 1267-1268.
- Pormohammad, A., Mehdinejadi, K., Gholizadeh, P., Nasiri, M. J., Mohtavinejad, N., Dadashi, M., Karimaei, S., Safari, H. i Azimi, T. (2020). Global prevalence of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: A systematic review and meta-analysis. *Microbial pathogenesis*, *139*, 103887.
- Portsmouth, S., van Veenhuyzen, D., Echols, R., Machida, M., Ferreira, J. C. A., Ariyasu, M., Tenke, P. i Den Nagata, T. (2018). Cefiderocol versus imipenem-cilastatin for the treatment of complicated urinary tract infections caused by Gram-negative uropathogens: a phase 2, randomised, double-blind, non-inferiority trial. *The Lancet Infectious Diseases*, *18*, 1319-1328.
- Potron, A., Poirel, L. i Nordmann, P. (2015). Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *International journal of antimicrobial agents*, *45*, 568-585.

- Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological reviews*, *58*, 755-805.
- Pour, N. K., Dusane, D. H., Dhakephalkar, P. K., Zamin, F. R., Zinjarde, S. S. i Chopade, B. A. (2011). Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *62*, 328-338.
- Povilonis, J., Šeputienė, V., Krasauskas, R., Juškaitė, R., Miškinytė, M., Sužiedėlis, K. i Sužiedėlienė, E. (2013). Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuanian hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *68*, 1000-1006.
- Powers, D. G., Casebier, D. S., Fokas, D., Ryan, W. J., Troth, J. R. i Coffen, D. L. (1998). Automated parallel synthesis of chalcone-based screening libraries. *Tetrahedron*, *54*, 4085-4096.
- Prasad, S., Saleshier, M. F., Krishnan, S. i Bharathi, P. (2018). Synthesis, spectroscopic studies, antibacterial activity, and colorimetric evaluation of the time-killing assay for newly synthesized chalcones using Resazurin. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, *52*, 518-525.
- Procop, G., Church, D., Hall, G., Janda, W., Koneman, E., Schreckenberger, P., & Woods, G. (2017). Aerobic and facultative gram positive bacilli. *Koneman's Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins Company, Philadelphia, USA*, pp. 385-387.
- Proctor, R. A., Von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M. i Peters, G. (2006). Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiology*, *4*, 295-305.
- Proschak, A., Lubuta, P., Grün, P., Löhr, F., Wilharm, G., De Berardinis, V. i Bode, H. B. (2013). Structure and Biosynthesis of Fimsbactins A–F, Siderophores from *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter baylyi*. *ChemBioChem*, *14*, 633-638.
- Pulido, M. R., García-Quintanilla, M., Pachón, J. i McConnell, M. J. (2020). A lipopolysaccharide-free outer membrane vesicle vaccine protects against *Acinetobacter baumannii* infection. *Vaccine*, *38*, 719-724.
- Qiu, H., KuoLee, R., Harris, G. i Chen, W. (2009). High susceptibility to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection in A/J mice is associated with a delay in early pulmonary recruitment of neutrophils. *Microbes and infection*, *11*, 946-955.
- Qu, Q., Wang, J., Cui, W., Zhou, Y., Xing, X., Che, R., Liu, X., Chen, X., Bello-Onaghise, G. S., Dong, C., Li, Z., Li, X. i Li, Y. (2019). In vitro activity and In vivo efficacy of Isoliquiritigenin against *Staphylococcus xylosum* ATCC 700404 by IGPD target. *PloS one*, *14*, e0226260.
- Rahman, T. i Rahmatullah, M. (2010). Proposed structural basis of interaction of piperine and related compounds with monoamine oxidases. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *20*, 537-540.
- Rajamohan, G., Srinivasan, V. B. i Gebreyes, W. A. (2010). Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *65*, 1919-1925.

- Ramirez, M. S., Bonomo, R. A. i Tolmasky, M. E. (2020). Carbapenemases: transforming *Acinetobacter baumannii* into a yet more dangerous menace. *Biomolecules*, *10*, 720.
- Rani, A., Anand, A., Kumar, K. i Kumar, V. (2019). Recent developments in biological aspects of chalcones: the odyssey continues. *Expert opinion on drug discovery*, *14*, 249-288.
- Raorane, C. J., Lee, J. H., Kim, Y. G., Rajasekharan, S. K., García-Contreras, R. i Lee, J. (2019). Antibiofilm and antivirulence efficacies of flavonoids and curcumin against *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in microbiology*, *10*, 990.
- Reinhardt, C. S., Geske, T. i Schmolz, M. (2005). A topical wound disinfectant (ethacridine lactate) differentially affects the production of immunoregulatory cytokines in human whole-blood cultures. *Wounds*, *17*, 213.
- Rello, J., Solé-Lleonart, C., Rouby, J. J., Chastre, J., Blot, S., Poulakou, G., Luyt, C. E., Riera, J., Palmer, L. B., Pereira, J. M., Felton, T., Dhanani, J., Bassetti, M., Welte, T. i Roberts, J. A. (2017). Use of nebulized antimicrobials for the treatment of respiratory infections in invasively mechanically ventilated adults: a position paper from the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology and Infection*, *23*, 629-639.
- Renckens, R., Roelofs, J. J., Knapp, S., de Vos, A. F., Florquin, S. i van der Poll, T. (2006). The acute-phase response and serum amyloid A inhibit the inflammatory response to *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*, *193*, 187-195.
- Repizo, G. D., Gagné, S., Foucault-Grunenwald, M. L., Borges, V., Charpentier, X., Limansky, A. S., Gomes, J. P., Viale, A. M. i Salcedo, S. P. (2015). Differential role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* virulence. *PloS one*, *10*, e0138265.
- Richie, D. L., Takeoka, K. T., Bojkovic, J., Metzger IV, L. E., Rath, C. M., Sawyer, W. S., Wei, J. R. i Dean, C. R. (2016). Toxic accumulation of LPS pathway intermediates underlies the requirement of LpxH for growth of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. *PloS one*, *11*, e0160918.
- Roca Subirà, I., Marti, S., Espinal, P., Martinez, P., Gibert, I. i Vila, J. (2009). CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *53*, 4013-4014.
- Roca Subirà, I., Espinal, P., Vila-Farrés, X. i Vila Estapé, J. (2012). The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Frontiers in microbiology*, *3*, 148.
- Rodríguez-Baño, J., Martí, S., Soto, S., Fernández-Cuenca, F., Cisneros, J. M., Pachón, J., Pascual, A., Martínez-Martínez, L., McQueary, C., Actis, L. A., Vila, J.; Spanish Group for the Study of Nosocomial Infections (GEIH). (2008). Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clinical microbiology and infection*, *14*, 276-278.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Nordmann, P., Ronco, E. i Poirel, L. (2010). Extended-spectrum cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *54*, 3484-3488.

- Roier, S., Zingl, F. G., Cakar, F., Durakovic, S., Kohl, P., Eichmann, T. O., Klug, L., Gadermaier, B., Weinzerl, K., Prassl, R., Lass, A., Daum, G., Reidl, J., Feldman, M. F. i Schild, S. (2016). A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nature communications*, 7, 1-13.
- Rollauer, S. E., Soorshjani, M. A., Noinaj, N. i Buchanan, S. K. (2015). Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370, 20150023.
- Ronish, L. A., Lillehoj, E., Fields, J. K., Sundberg, E. J. i Piepenbrink, K. H. (2019). The structure of PilA from *Acinetobacter baumannii* AB5075 suggests a mechanism for functional specialization in *Acinetobacter* type IV pili. *Journal of Biological Chemistry*, 294, 218-230.
- Rosales-Reyes, R., Gayosso-Vázquez, C., Fernández-Vázquez, J. L., Jarillo-Quijada, M. D., Rivera-Benítez, C., Santos-Preciado, J. I. i Alcántar-Curiel, M. D. (2017). Virulence profiles and innate immune responses against highly lethal, multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* from a tertiary care hospital in Mexico. *PloS one*, 12, e0182899.
- Rose, W. E. i Rybak, M. J. (2006). Tigecycline: first of a new class of antimicrobial agents. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 26, 1099-1110.
- Rosenfeld, N., Bouchier, C., Courvalin, P. i Périchon, B. (2012). Expression of the resistance-nodulation-cell division pump AdeIJK in *Acinetobacter baumannii* is regulated by AdeN, a TetR-type regulator. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56, 2504-2510.
- Rossau, R., Van Landschoot, A., Gillis, M. i De Ley, J. (1991). Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41, 310-319.
- Roy, R., You, R. I., Lin, M. D. i Lin, N. T. (2020). Mutation of the Carboxy-Terminal processing protease in *Acinetobacter baumannii* affects motility, leads to loss of membrane integrity, and reduces virulence. *Pathogens*, 9, 322.
- Rozmer, Z. i Perjési, P. (2016). Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochemistry reviews*, 15, 87-120.
- Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J. A., Soares, N. C., Mosquera, A., Chaves, F. i Bou, G. (2011). Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55, 3084-3090.
- Rumbo, C., Gato, E., López, M., De Alegria, C. R., Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., Vila, J., Pachón, J., Cisneros, J. M., Rodríguez-Baño, J., Pascual, A., Bou, G. i Tomás, M. (2013). Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57, 5247-5257.

Rumbo, C., Tomás, M., Moreira, E. F., Soares, N. C., Carvajal, M., Santillana, E., Beceiro, A., Romero, A. i Bou, G. (2014). The Acinetobacter baumannii Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infection and immunity*, 82, 4666-4680.

Runci, F., Gentile, V., Frangipani, E., Rampioni, G., Leoni, L., Lucidi, M., Visaggio, D., Harris, G., Chen, W., Stahl, J., Averhoff, B. i Visca, P. (2019). Contribution of active iron uptake to Acinetobacter baumannii pathogenicity. *Infection and immunity*, 87.

Russell, A. D. (1999). Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *Journal of Hospital infection*, 43, S57-S68.

Russell, A. D. (2004). Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *Journal of Hospital Infection*, 57, 97-104.

Russo, T. A., MacDonald, U., Beanan, J. M., Olson, R., MacDonald, I. J., Sauberan, S. L., Luke, L. W. i Umland, T. C. (2009). Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of Acinetobacter baumannii in vitro and in vivo. *The Journal of infectious diseases*, 199, 513-521.

Russo, T. A., Luke, N. R., Beanan, J. M., Olson, R., Sauberan, S. L., MacDonald, U., Schultz, L. W., Umland, T. C. i Campagnari, A. A. (2010). The K1 capsular polysaccharide of Acinetobacter baumannii strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infection and immunity*, 78, 3993-4000.

Russo, T. A., Page, M. G., Beanan, J. M., Olson, R., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Jacobs, M., Bajaksouzian, S., Endimiani, A. i Bonomo, R. A. (2011). In vivo and in vitro activity of the siderophore monosulfactam BAL30072 against Acinetobacter baumannii. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66, 867-873.

Russo, T. A., Manohar, A., Beanan, J. M., Olson, R., MacDonald, U., Graham, J. i Umland, T. C. (2016). The response regulator BfmR is a potential drug target for Acinetobacter baumannii. *MSphere*, 1.

Ruzin, A., Keeney, D. i Bradford, P. A. (2007). AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in Acinetobacter calcoaceticus–Acinetobacter baumannii complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 1001-1004.

Sabaeifard, P., Abdi-Ali, A., Souidi, M. R. i Dinarvand, R. (2014). Optimization of tetrazolium salt assay for Pseudomonas aeruginosa biofilm using microtiter plate method. *Journal of microbiological methods*, 105, 134-140.

Sachdeva, S., Palur, R. V., Sudhakar, K. U. i Rathinavelan, T. (2017). E. coli group 1 capsular polysaccharide exportation nanomachinery as a plausible antivirulence target in the perspective of emerging antimicrobial resistance. *Frontiers in microbiology*, 8, 70.

Saipriya, K., Swathi, C. H., Ratnakar, K. S. i Sritharan, V. (2020). Quorum-sensing system in Acinetobacter baumannii: a potential target for new drug development. *Journal of applied microbiology*, 128, 15-27.

Sánchez-Encinales, V., Álvarez-Marín, R., Pachón-Ibáñez, M. E., Fernández-Cuenca, F., Pascual, A., Garnacho-Montero, J., Martínez-Martínez, L., Vila, J., Tomás, M. M., Cisneros, J. M., Bou, G.,

- Rodríguez-Baño, J., Pachón, J. i Smani, Y. (2017). Overproduction of outer membrane protein A by *Acinetobacter baumannii* as a risk factor for nosocomial pneumonia, bacteremia, and mortality rate increase. *The Journal of infectious diseases*, 215, 966-974.
- Sanchez-Larrayoz, A. F., Elhosseiny, N. M., Chevrette, M. G., Fu, Y., Giunta, P., Spallanzani, R. G., Ravi, K., Pier, G. B., Lory, S. i Maira-Litrán, T. (2017). Complexity of complement resistance factors expressed by *Acinetobacter baumannii* needed for survival in human serum. *The Journal of Immunology*, 199, 2803-2814.
- Sarbu, L. G., Bahrin, L. G., Babii, C., Stefan, M. i Birsa, M. L. (2019). Synthetic flavonoids with antimicrobial activity: a review. *Journal of applied microbiology*, 127, 1282-1290.
- Satchell, K. J. (2011). Structure and function of MARTX toxins and other large repetitive RTX proteins. *Annual review of microbiology*, 65, 71-90.
- Sato, M., Tsuchiya, H., Akagiri, M., Takagi, N. i Iinuma, M. (1997). Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. *Australian Dental Journal*, 42, 343-346.
- Sato, Y., Unno, Y., Kawakami, S., Ubagai, T. i Ono, Y. (2017). Virulence characteristics of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates vary with the expression levels of omps. *Journal of medical microbiology*, 66, 203-212.
- Sato, Y., Unno, Y., Ubagai, T. i Ono, Y. (2018). Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *PLoS One*, 13, e0194556.
- Scaffaro, R., Lopresti, F., D'Arrigo, M., Marino, A. i Nostro, A. (2018). Efficacy of poly (lactic acid)/carvacrol electrospun membranes against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* in single and mixed cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 4171-4181.
- Schmiel, D. H. i Miller, V. L. (1999). Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes and infection*, 1, 1103-1112.
- Scott, N. E., Kinsella, R. L., Edwards, A. V., Larsen, M. R., Dutta, S., Saba, J., Foster, L. J. i Feldman, M. F. (2014). Diversity within the O-linked protein glycosylation systems of *Acinetobacter* species. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13, 2354-2370.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069.
- Seifert, H., Baginski, R., Schulze, A. i Pulverer, G. (1993). Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37, 750-753.
- Seifert, H., Strate, A. i Pulverer, G. (1995). Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. *Medicine*, 74, 340-349.
- Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I. i Vaneechoutte, M. (1997). Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *Journal of clinical microbiology*, 35, 2819-2825.

- Seifert, H., Stefanik, D., Sutcliffe, J. A. i Higgins, P. G. (2018). In-vitro activity of the novel fluorocycline eravacycline against carbapenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents*, *51*, 62-64.
- Selasi, G. N., Nicholas, A., Jeon, H., Na, S. H., Kwon, H. I., Kim, Y. J., Heo, S. T., Oh, M. H. i Lee, J. C. (2016). Differences in biofilm mass, expression of biofilm-associated genes, and resistance to desiccation between epidemic and sporadic clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* sequence type 191. *PLoS One*, *11*, e0162576.
- Selvaraj, A., Valliammai, A., Sivasankar, C., Suba, M., Sakthivel, G. i Pandian, S. K. (2020). Antibiofilm and antivirulence efficacy of myrtenol enhances the antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Scientific reports*, *10*, 1-14.
- Sen, C. K. (2019). Human wounds and its burden: an updated compendium of estimates. *Advances in wound care*, *8*, 39–48.
- Senchenkova, S. N., Shashkov, A. S., Popova, A. V., Shneider, M. M., Arbatsky, N. P., Miroshnikov, K. A., Volozhantsev, N. V. i Knirel, Y. A. (2015). Structure elucidation of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* AB5075 having the KL25 capsule biosynthesis locus. *Carbohydrate research*, *408*, 8-11.
- Shapiro, J. A. i Wenczewicz, T. A. (2016). Acinetobactin isomerization enables adaptive iron acquisition in *Acinetobacter baumannii* through pH-triggered siderophore swapping. *ACS infectious diseases*, *2*, 157-168.
- Sharma, N., Mohanakrishnan, D., Shard, A., Sharma, A., Sinha, A. K. i Sahal, D. (2012a). Stilbene–chalcone hybrids: design, synthesis, and evaluation as a new class of antimalarial scaffolds that trigger cell death through stage specific apoptosis. *Journal of medicinal chemistry*, *55*, 297-311.
- Sharma, V., Singh, G., Kaur, H., Saxena, A. K. i Ishar, M. P. S. (2012b). Synthesis of β -ionone derived chalcones as potent antimicrobial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *22*, 6343-6346.
- Sharma, A., Sharma, R., Bhattacharyya, T., Bhandu, T. i Pathania, R. (2016). Fosfomycin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS) transporter—AbaF. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*, 68-74.
- Sheldon, J. R., Laakso, H. A. i Heinrichs, D. E. (2016). Iron acquisition strategies of bacterial pathogens. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 43-85.
- Sheldon, J. R. i Skaar, E. P. (2020). *Acinetobacter baumannii* can use multiple siderophores for iron acquisition, but only acinetobactin is required for virulence. *PLoS pathogens*, *16*, e1008995.
- Shen, F., Tang, X., Wang, Y., Yang, Z., Shi, X., Wang, C., Zhang, Q., An, Y., Cheng, W., Jin, K., Liu, M., Guo, N. i Yu, L. (2015). Phenotype and expression profile analysis of *Staphylococcus aureus* biofilms and planktonic cells in response to licochalcone A. *Applied microbiology and biotechnology*, *99*, 359-373.
- Shenkutie, A. M., Yao, M. Z., Siu, G. K. H., Wong, B. K. C. i Leung, P. H. M. (2020). Biofilm-induced antibiotic resistance in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *Antibiotics*, *9*, 817.

- Shirazi, A. S., Shafiei, M., Solgi, H., Aslani, M. M., Azizi, O. i Badmasti, F. (2019). Different virulence capabilities and ompA expressions in ST2 and ST513 of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Current microbiology*, *76*, 723-731.
- Shlaes, D. M., Sahm, D., Opiela, C. i Spellberg, B. (2013). The FDA reboot of antibiotic development. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *57*, 4605-4607.
- Siegman-Igra, Y., Bar-Yosef, S., Gorea, A. i Avram, J. (1993). Nosocomial *Acinetobacter* meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. *Clinical Infectious Diseases*, *17*, 843-849.
- Simner, P. J. i Patel, R. (2020). Cefiderocol Antimicrobial Susceptibility Testing Considerations: the Achilles' Heel of the Trojan Horse?. *Journal of Clinical Microbiology*, *59*.
- Singh, P., Anand, A. i Kumar, V. (2014). Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review. *European journal of medicinal chemistry*, *85*, 758-777.
- Sinha, N., Niazi, M. i Lvovsky, D. (2014). A fatal case of multidrug resistant acinetobacter necrotizing fasciitis: the changing scary face of nosocomial infection. *Case reports in infectious diseases*, *2014*.
- Sirijatuphat, R. i Thamlikitkul, V. (2014). Preliminary study of colistin versus colistin plus fosfomycin for treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *58*, 5598-5601.
- Sivakumar, P. M., Prabhawathi, V. i Doble, M. (2010). 2-Methoxy-2', 4'-dichloro chalcone as an antimicrofoulant against marine bacterial biofilm. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *81*, 439-446.
- Skerniškytė, J., Krasauskas, R., Péchoux, C., Kulakauskas, S., Armalytė, J. i Sužiedėlienė, E. (2019a). Surface-related features and virulence among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates belonging to international clones I and II. *Frontiers in microbiology*, *9*, 3116.
- Skerniškytė, J., Karazijaitė, E., Deschamps, J., Krasauskas, R., Armalytė, J., Briandet, R. i Sužiedėlienė, E. (2019b). Blp1 protein shows virulence-associated features and elicits protective immunity to *Acinetobacter baumannii* infection. *BMC microbiology*, *19*, 1-12.
- Skiebe, E., de Berardinis, V., Morczinek, P., Kerrinnes, T., Faber, F., Lepka, D., Hammer, B., Zimmermann, O., Ziesing, S., Wichelhaus, T. A., Hunfeld, K. P., Borgmann, S., Grobner, S., Higgins, P. G., Seifert, H., Busse, H.-J., Witte, W., Pfeifer, Y. i Wilharm, G. (2012). Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1, 3-diaminopropane. *International Journal of Medical Microbiology*, *302*, 117-128.
- Słoczyńska, A., Wand, M. E., Tyski, S. i Laudy, A. E. (2021). Analysis of blaCHDL Genes and Insertion Sequences Related to Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains Isolated in Warsaw, Poland. *International journal of molecular sciences*, *22*, 2486.
- Smani, Y., McConnell, M. J. i Pachón, J. (2012). Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *PloS one*, *7*, e33073.

- Smith, M. G., Gianoulis, T. A., Pukatzki, S., Mekalanos, J. J., Ornston, L. N., Gerstein, M. i Snyder, M. (2007). New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes & development*, *21*, 601-614.
- Snitkin, E. S., Zelazny, A. M., Montero, C. I., Stock, F., Mijares, L., Murray, P. R. i Segre, J. A. (2011). Genome-wide recombination drives diversification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*, 13758-13763.
- Soliman, A. M., Nariya, H., Tanaka, D., Yu, L., Hisatsune, J., Kayama, S., Kondo, K., Sugai, M., Shimamoto, T. i Shimamoto, T. (2021). Vegetable-Derived Carbapenemase-Producing High-Risk *Klebsiella pneumoniae* ST15 and *Acinetobacter baumannii* ST2 Clones in Japan: Coexistence of bla NDM-1, bla OXA-66, bla OXA-72, and an AbaR4-Like Resistance Island in the Same Sample. *Applied and Environmental Microbiology*, *87*, e02166-20.
- Solomkin, J. S., Gardovskis, J., Lawrence, K., Montravers, P., Sway, A., Evans, D. i Tsai, L. (2019). IGNITE4: results of a phase 3, randomized, multicenter, prospective trial of eravacycline vs meropenem in the treatment of complicated intraabdominal infections. *Clinical Infectious Diseases*, *69*, 921-929.
- Soo, P. C., Tseng, C. C., Ling, S. R., Liou, M. L., Liu, C. C., Chao, H. J., Lin, T. Y. i Chang, K. C. (2013). Rapid and sensitive detection of *Acinetobacter baumannii* using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of microbiological methods*, *92*, 197-200.
- Sousa, C., Silva, L., Grosso, F., Lopes, J. i Peixe, L. (2014). Development of a FTIR-ATR based model for typing clinically relevant *Acinetobacter baumannii* clones belonging to ST98, ST103, ST208 and ST218. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *133*, 108-114.
- Srinivas, P., Hunt, L. N., Pouch, S. M., Thomas, K., Goff, D. A., Pancholi, P., Balada-Llasat, J. M. i Bauer, K. A. (2018). Detection of colistin heteroresistance in *Acinetobacter baumannii* from blood and respiratory isolates. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *91*, 194-198.
- Srinivasan, V. B., Rajamohan, G. i Gebreyes, W. A. (2009). Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *53*, 5312-5316.
- Stacy, A., McNally, L., Darch, S. E., Brown, S. P. i Whiteley, M. (2016). The biogeography of polymicrobial infection. *Nature Reviews Microbiology*, *14*, 93-105.
- Stahl, J., Bergmann, H., Göttig, S., Ebersberger, I. i Averhoff, B. (2015). *Acinetobacter baumannii* virulence is mediated by the concerted action of three phospholipases D. *PloS one*, *10*, e0138360.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B. i Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, *40*, 175-179.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I. i Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, *115*, 891-899.

- Stewart, P. S. i Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 199-210.
- Strateva, T., Sirakov, I., Stoeva, T., Stratev, A., Dimov, S., Savov, E. i Mitov, I. (2019). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: current status of the problem in four Bulgarian university hospitals (2014–2016). *Journal of global antimicrobial resistance*, 16, 266-273.
- Su, X. Z., Chen, J., Mizushima, T., Kuroda, T. i Tsuchiya, T. (2005). AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49, 4362-4364.
- Subashchandrabose, S., Smith, S., DeOrnellas, V., Crepin, S., Kole, M., Zahdeh, C. i Mobley, H. L. (2016). *Acinetobacter baumannii* genes required for bacterial survival during bloodstream infection. *Msphere*, 1.
- Sugamoto, K., Matsusita, Y. I., Matsui, K., Kurogi, C. i Matsui, T. (2011). Synthesis and antibacterial activity of chalcones bearing prenyl or geranyl groups from *Angelica keiskei*. *Tetrahedron*, 67, 5346-5359.
- Sugawara, E., Nagano, K. i Nikaido, H. (2010). Factors affecting the folding of *Pseudomonas aeruginosa* OprF porin into the one-domain open conformer. *MBio*, 1.
- Sugawara, E. i Nikaido, H. (2012). OmpA is the principal nonspecific slow porin of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology*, 194, 4089-4096.
- Sugawara, E., Nagano, K. i Nikaido, H. (2012). Alternative folding pathways of the major porin OprF of *Pseudomonas aeruginosa*. *The FEBS journal*, 279, 910-918.
- Suleman, L. (2016). Extracellular bacterial proteases in chronic wounds: a potential therapeutic target?. *Advances in wound care*, 5, 455-463.
- Sutcliffe, J. A., O'Brien, W., Fyfe, C. i Grossman, T. H. (2013). Antibacterial activity of eravacycline (TP-434), a novel fluorocycline, against hospital and community pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57, 5548-5558.
- Szczuka, E., Jabłońska, L. i Kaznowski, A. (2017). Effect of subinhibitory concentrations of tigecycline and ciprofloxacin on the expression of biofilm-associated genes and biofilm structure of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 163, 712.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N., WHO Pathogens Priority List Working Group (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18, 318-327.
- Talyansky, Y., Nielsen, T. B., Yan, J., Carlino-Macdonald, U., Di Venanzio, G., Chakravorty, S., Ulhaq, A., Feldman, M. F., Russo, T. A., Vinogradov, E., Luna, B., Wright, M. S., Adams, M. D. i Spellberg, B. (2021). Capsule carbohydrate structure determines virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS pathogens*, 17, e1009291.

- Tankovic, J., Legrand, P., De Gatines, G., Chemineau, V., Brun-Buisson, C. i Duval, J. (1994). Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *Journal of clinical microbiology*, *32*, 2677-2681.
- Tao, C., Kang, M., Chen, Z., Xie, Y., Fan, H., Qin, L. i Ma, Y. (2009). Microbiologic study of the pathogens isolated from wound culture among Wenchuan earthquake survivors. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *63*, 268-270.
- Tepedelen, B. E., Soya, E. i Korkmaz, M. (2016). Boric acid reduces the formation of DNA double strand breaks and accelerates wound healing process. *Biological trace element research*, *174*, 309-318.
- Thom, K. A., Rock, C., Jackson, S. S., Johnson, J. K., Srinivasan, A., Magder, L., Roghmann, M. C., Bonomo, R. A. i Harris, A. D. (2017). Factors leading to transmission risk of *Acinetobacter baumannii*. *Critical care medicine*, *45*, e633.
- Thompson, M. G., Black, C. C., Pavlicek, R. L., Honnold, C. L., Wise, M. C., Alamneh, Y. A., Moon, J. K., Kessler, J. L., Si, Y., Williams, R. i Zurawski, D. V. (2014). Validation of a novel murine wound model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *58*, 1332-1342.
- Thummeepak, R., Kongthai, P., Leungtongkam, U. i Sitthisak, S. (2016). Distribution of virulence genes involved in biofilm formation in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Int Microbiol*, *19*, 121-129.
- Tian, G. B., Adams-Haduch, J. M., Taracila, M., Bonomo, R. A., Wang, H. N. i Doi, Y. (2011). Extended-spectrum AmpC cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*: ADC-56 confers resistance to cefepime. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *55*, 4922-4925.
- Tiku, V., Kofoed, E. M., Yan, D., Kang, J., Xu, M., Reichelt, M., Dikic, I. i Tan, M. W. (2021). Outer membrane vesicles containing OmpA induce mitochondrial fragmentation to promote pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *Scientific reports*, *11*, 1-16.
- Tilley, D., Law, R., Warren, S., Samis, J. A. i Kumar, A. (2014). CpaA a novel protease from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates deregulates blood coagulation. *FEMS microbiology letters*, *356*, 53-61.
- Tipton, K. A., Dimitrova, D. i Rather, P. N. (2015). Phase-variable control of multiple phenotypes in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *Journal of bacteriology*, *197*, 2593-2599.
- Tipton, K. A. i Rather, P. N. (2017). An ompR-envZ two-component system ortholog regulates phase variation, osmotic tolerance, motility, and virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *Journal of bacteriology*, *199*.
- Tipton, K. A., Chin, C. Y., Farokhyfar, M., Weiss, D. S. i Rather, P. N. (2018). Role of capsule in resistance to disinfectants, host antimicrobials, and desiccation in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *62*.

- Tiwari, V., Tiwari, D., Patel, V. i Tiwari, M. (2017). Effect of secondary metabolite of *Actinidia deliciosa* on the biofilm and extra-cellular matrix components of *Acinetobacter baumannii*. *Microbial pathogenesis*, *110*, 345-351.
- Tiwari, V., Meena, K. i Tiwari, M. (2018). Differential anti-microbial secondary metabolites in different ESKAPE pathogens explain their adaptation in the hospital setup. *Infection, Genetics and Evolution*, *66*, 57-65.
- Tomaras, A. P., Dorsey, C. W., Edelman, R. E. i Actis, L. A. (2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*, *149*, 3473-3484.
- Tomaras, A. P., Flagler, M. J., Dorsey, C. W., Gaddy, J. A. i Actis, L. A. (2008). Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology*, *154*, 3398-3409.
- Tran, T. D., Do, T. H., Tran, N. C., Ngo, T. D., Tran, C. D. i Thai, K. M. (2012). Synthesis and anti Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity of substituted chalcones alone and in combination with non-beta-lactam antibiotics. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *22*, 4555-4560.
- Trebosc, V., Gartenmann, S., Tötzl, M., Lucchini, V., Schellhorn, B., Pieren, M., Lociuro, S., Gitzinger, M., Tigges, M., Bumann, D. i Kemmer, C. (2019). Dissecting colistin resistance mechanisms in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *MBio*, *10*.
- Trottier, V., Segura, P. G., Namias, N., King, D., Pizano, L. R. i Schulman, C. I. (2007). Outcomes of *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill burned patients. *Journal of burn care & research*, *28*, 248-254.
- Tseng, B. S., Zhang, W., Harrison, J. J., Quach, T. P., Song, J. L., Penterman, J., Singh, P. K., Chopp, D. L., Packman, A. I. i Parsek, M. R. (2013). The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environmental microbiology*, *15*, 2865-2878.
- Tsuji, B. T., Pogue, J. M., Zavascki, A. P., Paul, M., Daikos, G. L., Forrest, A., Giacobbe, D. R., Viscoli, C., Giamarellou, H., Karaiskos, I. i Kaye, K. S. (2019). International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, *39*, 10-39.
- Turton, J. F., Ward, M. E., Woodford, N., Kaufmann, M. E., Pike, R., Livermore, D. M. i Pitt, T. L. (2006). The role of IS Aba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS microbiology letters*, *258*, 72-77.
- Umland, T. C., Schultz, L. W., MacDonald, U., Beanan, J. M., Olson, R. i Russo, T. A. (2012). In vivo-validated essential genes identified in *Acinetobacter baumannii* by using human ascites overlap poorly with essential genes detected on laboratory media. *MBio*, *3*.

- Uppuluri, P., Lin, L., Alqarihi, A., Luo, G., Youssef, E. G., Alkhazraji, S., Yount, N. Y., Ibrahim, B. A., Bolaris, M. A., Edwards Jr, J. E., Swidergall, M. i Ibrahim, A. S. (2018). The Hyr1 protein from the fungus *Candida albicans* is a cross kingdom immunotherapeutic target for *Acinetobacter* bacterial infection. *PLoS pathogens*, *14*, e1007056.
- Urban, C., Mariano, N., Rahal, J. J., Tay, E., Ponio, C., Koprivnjak, T. i Weiss, J. (2001). Polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical isolate susceptible to recombinant BPI21 and Cecropin P1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *45*, 994-995.
- Valencia, R., Arroyo, L. A., Conde, M., Aldana, J. M., Torres, M. J., Fernández-Cuenca, F., Garnacho-Montero, J., Cisneros, J. M., Ortiz, C., Pachón, J. i Aznar, J. (2009). Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. *Infection control and hospital epidemiology*, *30*, 257.
- Van Faassen, H., KuoLee, R., Harris, G., Zhao, X., Conlan, J. W. i Chen, W. (2007). Neutrophils play an important role in host resistance to respiratory infection with *Acinetobacter baumannii* in mice. *Infection and immunity*, *75*, 5597-5608.
- Vanechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., de Vos, P. A. U. L., Claeys, G. i Verschraegen, G. (1995). Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Journal of clinical microbiology*, *33*, 11-15.
- Vardakas, K. Z., Mavroudis, A. D., Georgiou, M. i Falagas, M. E. (2018). Intravenous colistin combination antimicrobial treatment vs. monotherapy: a systematic review and meta-analysis. *International journal of antimicrobial agents*, *51*, 535-547.
- Vasconcelos, A. T. R., Barth, A. L., Zavascki, A. P., Gales, A. C., Levin, A. S., Lucarevski, B. R., Cabral, B. G., Brasiliense, D. M., Rossi, F., Furtado, G. H., Carneiro, I. C. R., da Silva, J. O., Ribeiro, J., Lima, K. V. B., Correa, L., Britto, M. H., Silva, M. T., da Conceicao, M. L., Moreira, M., Martino, M. D. V., de Freitas, M. R., Oliveira, M. S., Dalben, M. F., Guzman, R. D., Cayo, R., Morais, R., Santos, S. A. i Martins, W. M. B. S. (2015). The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *83*, 382-385.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K. H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M. i Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, *84*, 377-410.
- Vidal, R., Dominguez, M., Urrutia, H., Bello, H., Gonzalez, G., Garcia, A. i Zemelman, R. (1996). Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Microbios*, *346*, 49-58.
- Vijayakumar, S., Rajenderan, S., Laishram, S., Anandan, S., Balaji, V. i Biswas, I. (2016). Biofilm formation and motility depend on the nature of the *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Frontiers in public health*, *4*, 105.
- Vijayakumar, S., Biswas, I. i Veeraraghavan, B. (2019). Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. *Future science OA*, *5*, FSO395.

- Vila, J., Marcos, A., Marco, F., Abdalla, S., Vergara, Y., Reig, R., Gomez-Lus, R. i De Anta, T. J. (1993). In vitro antimicrobial production of beta-lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *37*, 138-141.
- Vila, J., Martí, S. i Sanchez-Céspedes, J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *59*, 1210-1215.
- Vila-Farrés, X., Parra-Millán, R., Sánchez-Encinales, V., Varese, M., Ayerbe-Algaba, R., Bayó, N., Guardiola, S., Pachón-Ibáñez, M. E., Kotev, M., García, J., Teixidó, M., Vila, J., Pachón, J., Giralt, E. i Smani, Y. (2017). Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition. *Scientific reports*, *7*, 1-11.
- Vinutha, P. R., Jayarama, A., Kaliprasad, C. S., Narayana, Y., Byrappa, K. i MR, S. K. (2017). Synthesis, single crystal structure and spectroscopic aspects of chalcone 2 (2E)-1-(4'-bromobiphenyl-4-yl)-3-(2, 3-dimethoxybenzaldehyde) prop-2-ene-1-one. *Chemical Data Collections*, *9*, 208-219.
- Vourli, S., Dafopoulou, K., Vrioni, G., Tsakris, A. i Pournaras, S. (2017). Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*, 2528-2530.
- Vukotic, G., Obradovic, M., Novovic, K., Di Luca, M., Jovicic, B., Fira, D., Neve, H., Kojic, M. i McAuliffe, O. (2020). Characterization, antibiofilm, and depolymerizing activity of two phages active on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in medicine*, *7*, 426.
- Wainwright, M. (2001). Acridine—a neglected antibacterial chromophore. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *47*, 1-13.
- Walsh, T. R. (2005). The emergence and implications of metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology and infection*, *11*, 2-9.
- Wang, X. i Quinn, P. J. (2010). Lipopolysaccharide: biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in lipid research*, *49*, 97-107.
- Wang, N., Ozer, E. A., Mandel, M. J. i Hauser, A. R. (2014a). Genome-wide identification of *Acinetobacter baumannii* genes necessary for persistence in the lung. *MBio*, *5*.
- Wang, J., Ruan, Z., Feng, Y., Fu, Y., Jiang, Y., Wang, H. i Yu, Y. (2014b). Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. *PloS one*, *9*, e104882.
- Wang, J., Zhou, Z., He, F., Ruan, Z., Jiang, Y., Hua, X. i Yu, Y. (2018a). The role of the type VI secretion system *vgrG* gene in the virulence and antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. *PLoS One*, *13*, e0192288.
- Wang, T. H., Leu, Y. S., Wang, N. Y., Liu, C. P. i Yan, T. R. (2018b). Prevalence of different carbapenemase genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* blood isolates in Taiwan. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *7*(1), 1-8.

- Wang, L., Liu, D., Lv, Y., Cui, L., Li, Y., Li, T., Song, H., Hao, Y., Shen, J., Wang, Y. i Walsh, T. R. (2019). Novel plasmid-mediated tet (X5) gene conferring resistance to tigecycline, eravacycline, and omadacycline in a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *64*.
- Wang, X., Cole, C. G., DuPai, C. D. i Davies, B. W. (2020). Protein Aggregation is Associated with *Acinetobacter baumannii* Desiccation Tolerance. *Microorganisms*, *8*, 343.
- Wareth, G., Brandt, C., Sprague, L. D., Neubauer, H. i Pletz, M. W. (2020). Spatio-Temporal Distribution of *Acinetobacter baumannii* in Germany—A Comprehensive Systematic Review of Studies on Resistance Development in Humans (2000–2018). *Microorganisms*, *8*, 375.
- Weber, D. J., Rutala, W. A. i Sickbert-Bennett, E. E. (2007). Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *51*, 4217-4224.
- Weber, B. S., Miyata, S. T., Iwashkiw, J. A., Mortensen, B. L., Skaar, E. P., Pukatzki, S. i Feldman, M. F. (2013). Genomic and functional analysis of the type VI secretion system in *Acinetobacter*. *PloS one*, *8*, e55142.
- Weber, B. S., Ly, P. M., Irwin, J. N., Pukatzki, S. i Feldman, M. F. (2015). A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*, 9442-9447.
- Weber, B. S., Harding, C. M. i Feldman, M. F. (2016). Pathogenic *Acinetobacter*: from the cell surface to infinity and beyond. *Journal of bacteriology*, *198*, 880-887.
- Weber, B. S., Kinsella, R. L., Harding, C. M. i Feldman, M. F. (2017). The secrets of *Acinetobacter* secretion. *Trends in microbiology*, *25*, 532-545.
- Wei, J. R., Richie, D. L., Mostafavi, M., Metzger, L. E., Rath, C. M., Sawyer, W. S., Takeoka, K. T. i Dean, C. R. (2017). LpxK is essential for growth of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606: Relationship to toxic accumulation of lipid A pathway intermediates. *MSphere*, *2*.
- Weidensdorfer, M., Chae, J. I., Makobe, C., Stahl, J., Averhoff, B., Müller, V., Schürmann, C., Brandes, R. P., Wilharm, G., Ballhorn, W., Christ, S., Linke, D., Fischer, D., Göttig, S. i Kempf, V. A. J. (2016). Analysis of endothelial adherence of *Bartonella henselae* and *Acinetobacter baumannii* using a dynamic human ex vivo infection model. *Infection and immunity*, *84*, 711-722.
- Weiss, A., Broach, W. H., Lee, M. C. i Shaw, L. N. (2016). Towards the complete small RNome of *Acinetobacter baumannii*. *Microbial genomics*, *2*.
- Weldhagen, G. F., Poirel, L. i Nordmann, P. (2003). Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *47*, 2385-2392.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J. i Salmond, G. P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*, *25*, 365-404.

- Wilharm, G., Piesker, J., Laue, M. i Skiebe, E. (2013). DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *Journal of bacteriology*, *195*, 4146-4153.
- Wilharm, G. i Skiebe, E. (2019). Methods for natural transformation in *Acinetobacter baumannii*. In *Acinetobacter baumannii* (pp. 75-85). Humana Press, New York, NY.
- Wisplinghoff, H., Schmitt, R., Wöhrmann, A., Stefanik, D. i Seifert, H. (2007). Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of hospital infection*, *66*, 174-181.
- Wojnicz, D. i Tichaczek-Goska, D. (2013). Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin, amikacin and colistin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli* planktonic and biofilm forms isolated from human urine. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*, 259-265.
- Wong, D., Nielsen, T. B., Bonomo, R. A., Pantapalangkoor, P., Luna, B. i Spellberg, B. (2017). Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clinical microbiology reviews*, *30*, 409-447.
- Wood, C. R., Ohneck, E. J., Edelmann, R. E. i Actis, L. A. (2018). A light-regulated type I pilus contributes to *Acinetobacter baumannii* biofilm, motility, and virulence functions. *Infection and immunity*, *86*.
- World Health Organization. (2018). Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2017-2018.
- World Health Organization. (2019). Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance: Annual report 2019.
- World Health Organization. (2020). Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2020.
- Wright, M. S., Mountain, S., Beerli, K. i Adams, M. D. (2017). Assessment of insertion sequence mobilization as an adaptive response to oxidative stress in *Acinetobacter baumannii* using IS-seq. *Journal of bacteriology*, *199*.
- Wu, H., Ye, H. Q. i Chen, D. C. (2006). A new method for green synthesis of chalcone. *Ind. Catal*, *14*, 34-37.
- Wu, X., Chavez, J. D., Schweppe, D. K., Zheng, C., Weisbrod, C. R., Eng, J. K., Murali, A., Lee, S. A., Ramage, E., Gallagher, L. A., Kulasekara, H. D., Edrozo, M. E., Kamischke, C. N., Brittnacher, M. J., Miller, S. I., Singh, P. K., Manoil, C. i Bruce, J. E. (2016). In vivo protein interaction network analysis reveals porin-localized antibiotic inactivation in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *Nature communications*, *7*, 1-14.
- Wu, Y. K., Cheng, N. C. i Cheng, C. M. (2019). Biofilms in chronic wounds: pathogenesis and diagnosis. *Trends in biotechnology*, *37*, 505-517.

Wunderink, R. G., Matsunaga, Y., Ari, M., Ariyasu, M., Echols, R., Menon, A. i Nagata, T. D. (2019). LB4. Efficacy and Safety of Cefiderocol vs. High-Dose Meropenem in Patients with Nosocomial Pneumonia—Results of a Phase 3, Randomized, Multicenter, Double-Blind, Non-Inferiority Study. In *Open Forum Infectious Diseases*, 6.

Wunderink, R. G., Matsunaga, Y., Ariyasu, M., Clevenbergh, P., Echols, R., Kaye, K. S., Kollef, M., Menon, A., Pogue, J. M., Shorr, A. F., Timsit, J. F., Zeitlinger, M. i Nagata, T. D. (2021). Cefiderocol versus high-dose, extended-infusion meropenem for the treatment of Gram-negative nosocomial pneumonia (APEKS-NP): a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 21, 213-225.

Yadav, P., Lal, K., Kumar, L., Kumar, A., Kumar, A., Paul, A. K. i Kumar, R. (2018). Synthesis, crystal structure and antimicrobial potential of some fluorinated chalcone-1, 2, 3-triazole conjugates. *European journal of medicinal chemistry*, 155, 263-274.

Yamabe, K., Arakawa, Y., Shoji, M., Onda, M., Miyamoto, K., Tsuchiya, T., Akeda, Y., Terada, K. i Tomono, K. (2020). Direct anti-biofilm effects of macrolides on *Acinetobacter baumannii*: comprehensive and comparative demonstration by a simple assay using microtiter plate combined with peg-lid. *Biomedical Research*, 41, 259-268.

Yamada, Y. M. i Uozumi, Y. (2007). Development of a convoluted polymeric nanopalladium catalyst: α -alkylation of ketones and ring-opening alkylation of cyclic 1, 3-diketones with primary alcohols. *Tetrahedron*, 63, 8492-8498.

Yamamoto, T., Takiwaki, H., Arase, S. i Ohshima, H. (2008). Derivation and clinical application of special imaging by means of digital cameras and Image J freeware for quantification of erythema and pigmentation. *Skin Research and Technology*, 14, 26-34.

Yamazaki, Y., Suh, D. Y., Sitthithaworn, W., Ishiguro, K., Kobayashi, Y., Shibuya, M., Ebizuka, Y. i Sankawa, U. (2001). Diverse chalcone synthase superfamily enzymes from the most primitive vascular plant, *Psilotum nudum*. *Planta*, 214, 75-84.

Yang, Y., Fu, Y., Lan, P., Xu, Q., Jiang, Y., Chen, Y., Ruan, Z., Ji, S., Hua, X. i Yu, Y. (2018). Molecular epidemiology and mechanism of sulbactam resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates with diverse genetic backgrounds in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62.

Yang, C. H., Su, P. W., Moi, S. H. i Chuang, L. Y. (2019). Biofilm formation in *Acinetobacter Baumannii*: genotype-phenotype correlation. *Molecules*, 24, 1849.

Yin, B. T., Yan, C. Y., Peng, X. M., Zhang, S. L., Rasheed, S., Geng, R. X. i Zhou, C. H. (2014). Synthesis and biological evaluation of α -triazolyl chalcones as a new type of potential antimicrobial agents and their interaction with calf thymus DNA and human serum albumin. *European journal of medicinal chemistry*, 71, 148-159.

Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K. i Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53, 5046-5054.

- Yoon, E. J., Chabane, Y. N., Goussard, S., Snesrud, E., Courvalin, P., Dé, E. i Grillot-Courvalin, C. (2015). Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *MBio*, *6*.
- Yoon, E. J., Balloy, V., Fiette, L., Chignard, M., Courvalin, P. i Grillot-Courvalin, C. (2016). Contribution of the Ade resistance-nodulation-cell division-type efflux pumps to fitness and pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *MBio*, *7*.
- Zahn, M., Bhamidimarri, S. P., Baslé, A., Winterhalter, M. i Van den Berg, B. (2016). Structural insights into outer membrane permeability of *Acinetobacter baumannii*. *Structure*, *24*, 221-231.
- Zarrilli, R., Pournaras, S., Giannouli, M. i Tsakris, A. (2013). Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *International journal of antimicrobial agents*, *41*, 11-19.
- Zeidler, S. i Müller, V. (2019). The role of compatible solutes in desiccation resistance of *Acinetobacter baumannii*. *Microbiologyopen*, *8*, e00740.
- Zeighami, H., Valadkhani, F., Shapouri, R., Samadi, E. i Haghi, F. (2019). Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. *BMC infectious diseases*, *19*, 1-9.
- Zhanel, G. G., Golden, A. R., Zelenitsky, S., Wiebe, K., Lawrence, C. K., Adam, H. J., Idowu, T., Domalaon, R., Schweizer, F., Zhanel, M. A., Lagacé-Wiens, P. R., Walkty, A. J., Noreddin, A., Lynch III, J. P. i Karlowsky, J. A. (2019). Cefiderocol: a siderophore cephalosporin with activity against carbapenem-resistant and multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Drugs*, *79*, 271-289.
- Zhang, M., Prior, A. M., Maddox, M. M., Shen, W. J., Hevener, K. E., Bruhn, D. F., Lee, R. B., Singh, A. P., Reinicke, J., Simmons, C. J., Hurdle, J. G., Lee, R. E. i Sun, D. (2018). Pharmacophore modeling, synthesis, and antibacterial evaluation of chalcones and derivatives. *ACS omega*, *3*, 18343-18360.
- Zhao, W. H. i Hu, Z. Q. (2012). *Acinetobacter*: a potential reservoir and dispenser for β -lactamases. *Critical reviews in microbiology*, *38*, 30-51.
- Zhou, T., Deng, X. i Qiu, J. (2012). Antimicrobial activity of licochalcone E against *Staphylococcus aureus* and its impact on the production of staphylococcal alpha-toxin. *Journal of microbiology and biotechnology*, *22*, 800-805.
- Zhou, B. i Xing, C. (2015). Diverse molecular targets for chalcones with varied bioactivities. *Medicinal chemistry*, *5*, 388.
- Zhou, Y. H., Xu, C. G., Yang, Y. B., Xing, X. X., Liu, X., Qu, Q. W., Ding, W. Y., Bello-Onaghise, G. S. i Li, Y. H. (2018). Histidine metabolism and IGPD play a key role in cefquinome inhibiting biofilm formation of *Staphylococcus xylosus*. *Frontiers in microbiology*, *9*, 665.
- Zhu, L., Yan, Z., Zhang, Z., Zhou, Q., Zhou, J., Wakeland, E. K., Fang, X., Xuan, Z., Shen, D. i Li, Q. Z. (2013). Complete genome analysis of three *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in China for insight into the diversification of drug resistance elements. *PloS one*, *8*, e66584.

Zhuang, C., Zhang, W., Sheng, C., Zhang, W., Xing, C. i Miao, Z. (2017). Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. *Chemical reviews*, 117, 7762-7810.

Zilberberg, M. D., Kollef, M. H. i Shorr, A. F. (2016). Secular trends in *Acinetobacter baumannii* resistance in respiratory and blood stream specimens in the United States, 2003 to 2012: a survey study. *Journal of hospital medicine*, 11, 21-26.

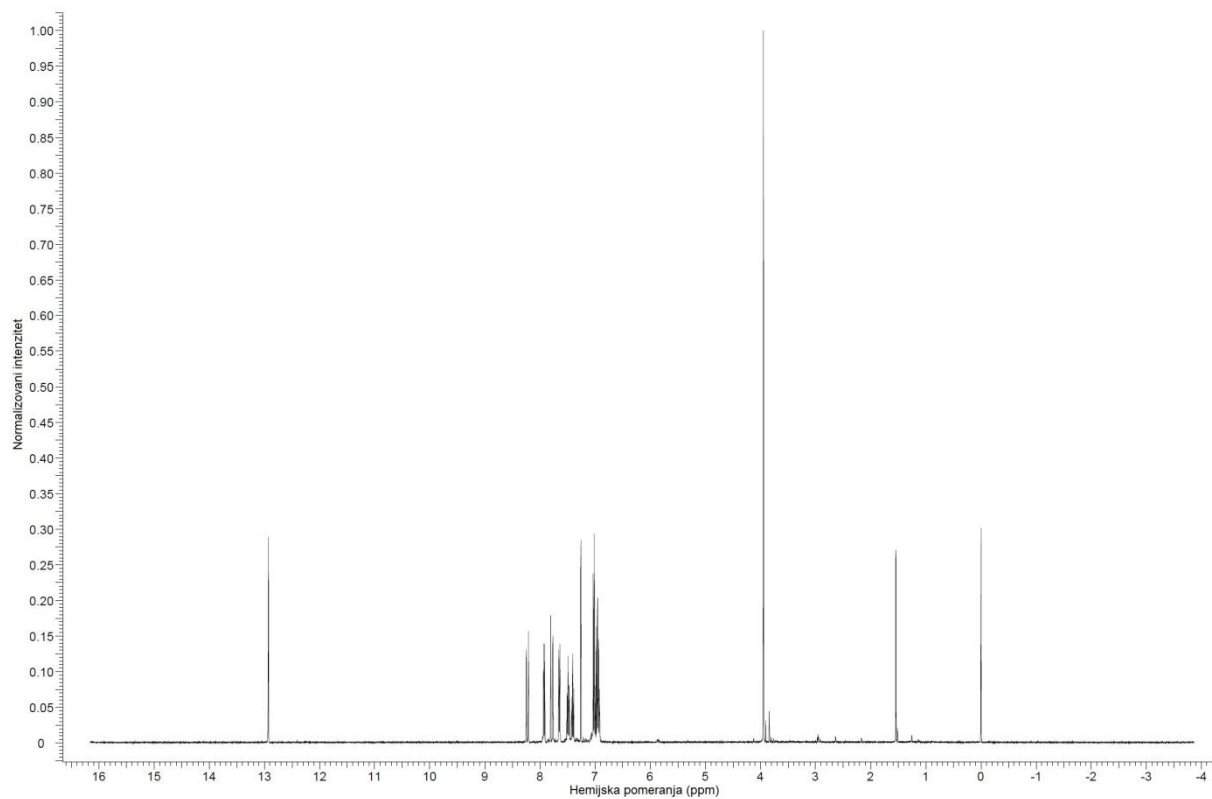
Zschiedrich, C. P., Keidel, V. i Szurmant, H. (2016). Molecular mechanisms of two-component signal transduction. *Journal of molecular biology*, 428, 3752-3775.

Zurawski, D. V., Black, C. C., Alamneh, Y. A., Biggemann, L., Banerjee, J., Thompson, M. G., Wise, M. C., Honnold, C. L., Kim, R. K., Parnavitana, C., Shearer, J. P., Tyner, S. D. i Demons, S. T. (2019). A porcine wound model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Advances in wound care*, 8, 14-27.

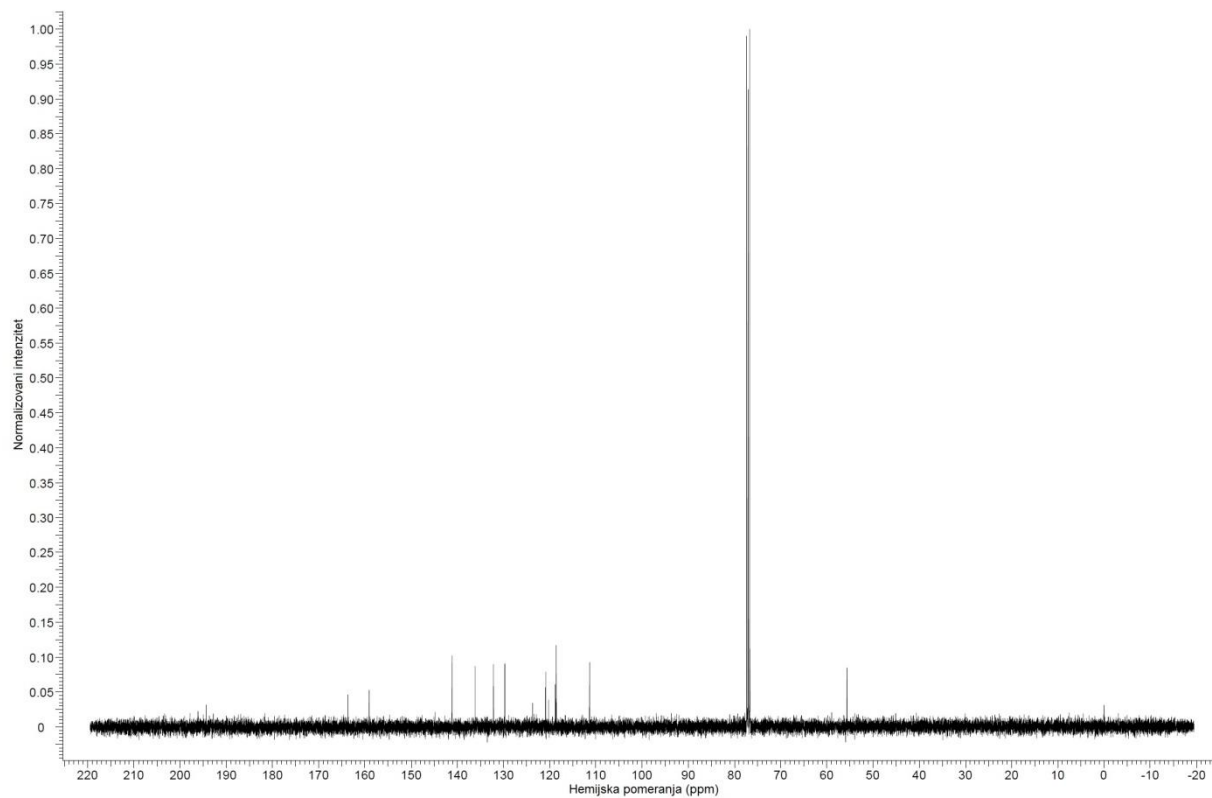
8. PRILOZI

Prilog 1. NMR spektri halkona o-OCH₃.

¹H NMR

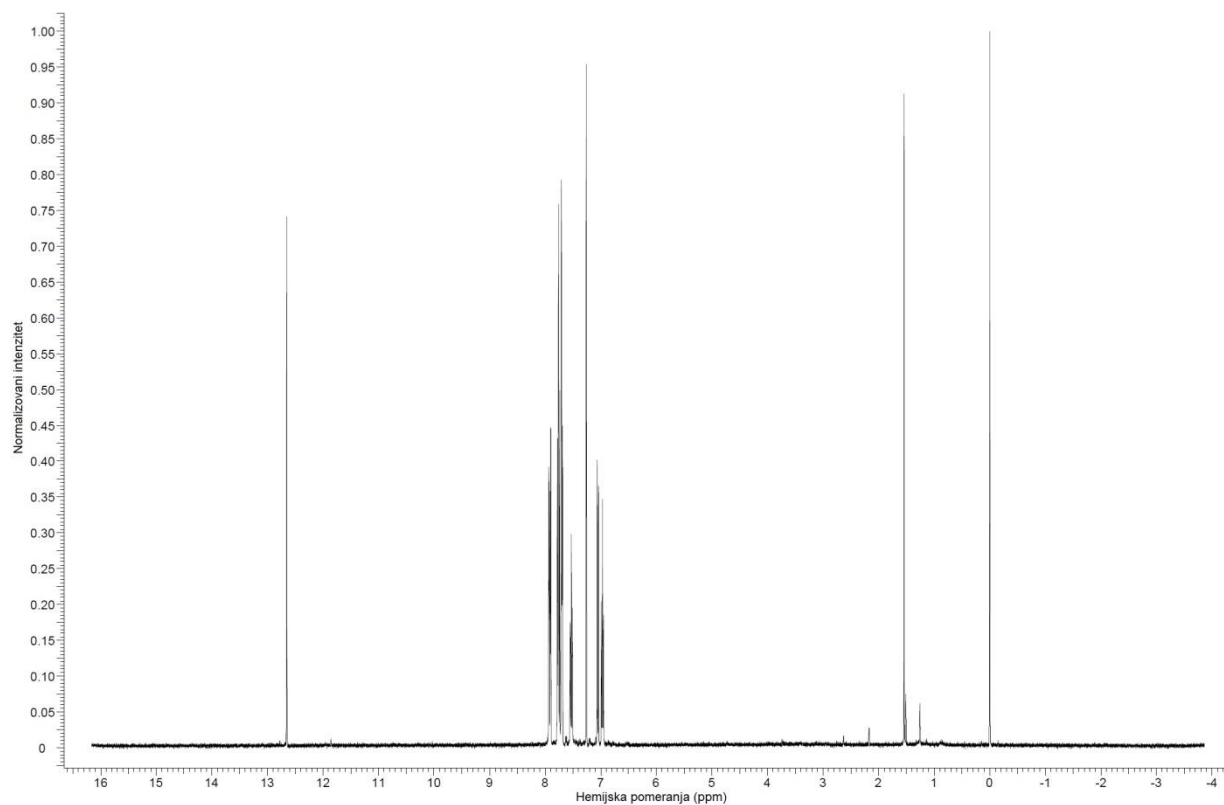


¹³C NMR

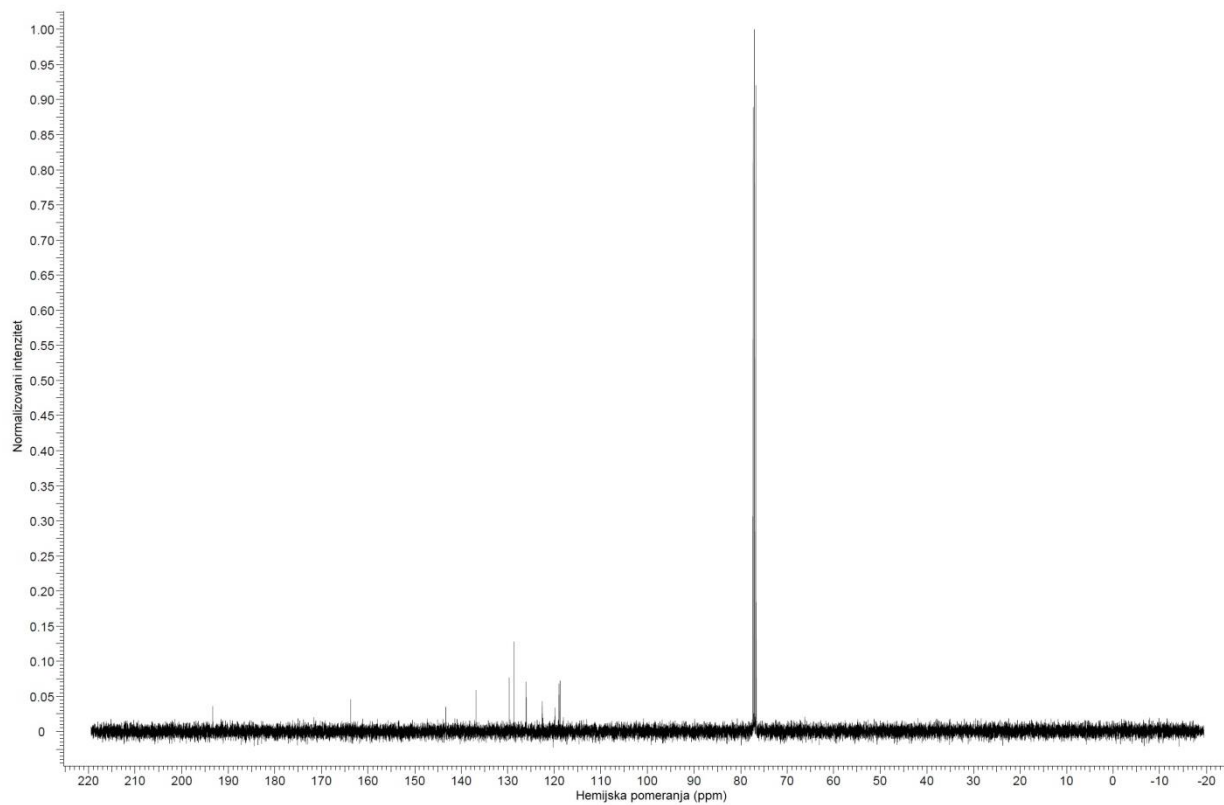


Prilog 2. NMR spektri halkona p-CF₃.

¹H NMR

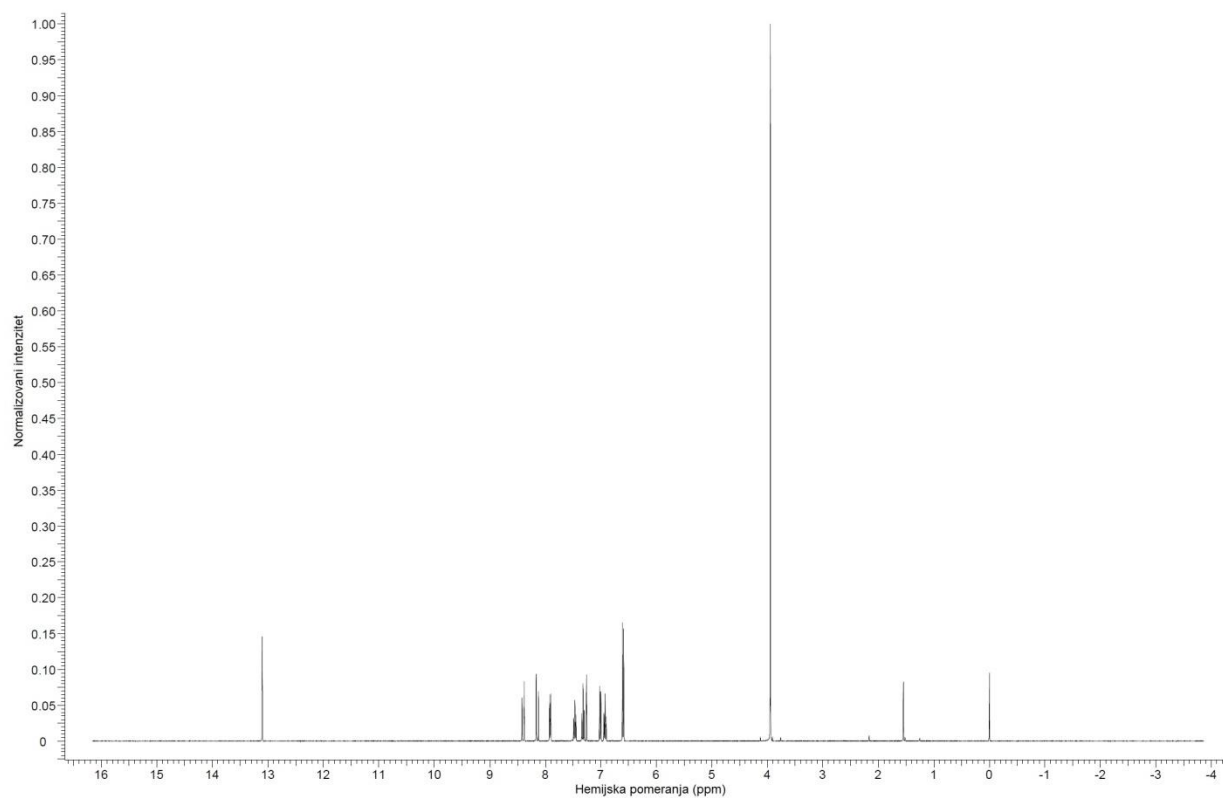


¹³C NMR

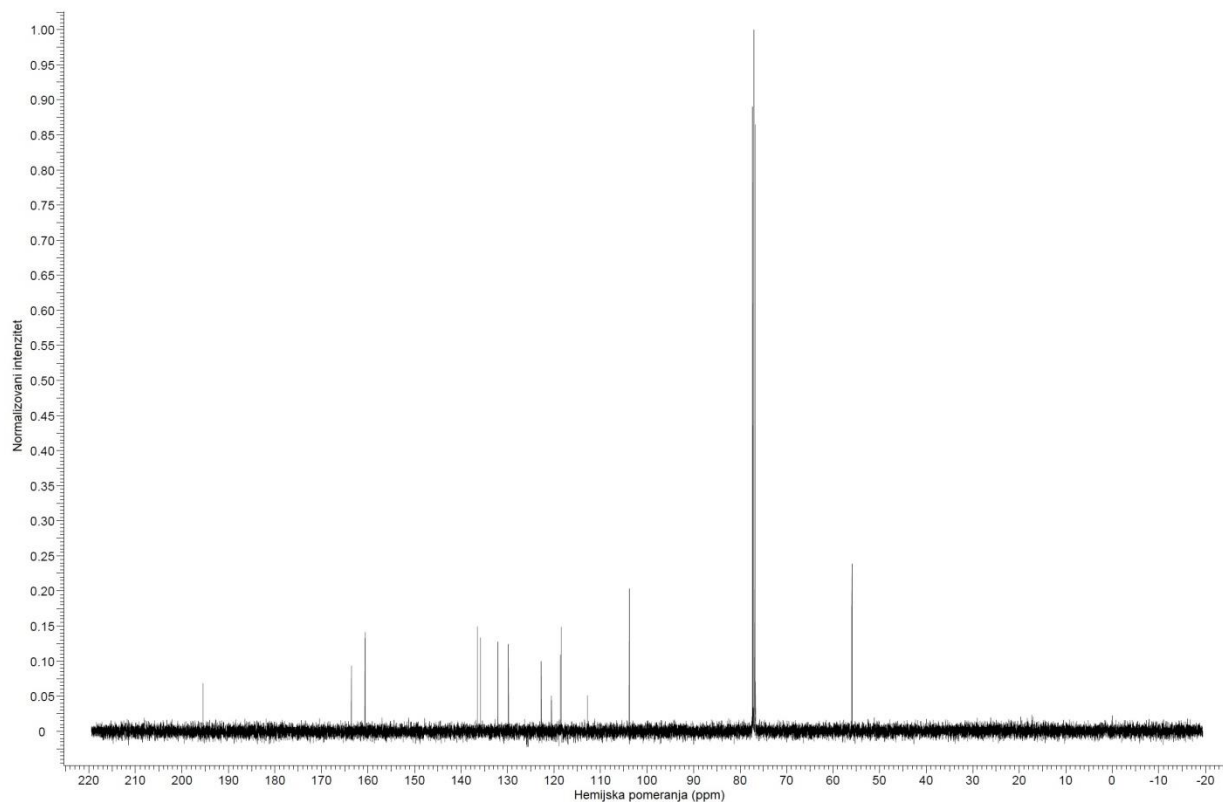


Prilog 3. NMR spektri halkona 2,6-OCH₃.

¹H NMR

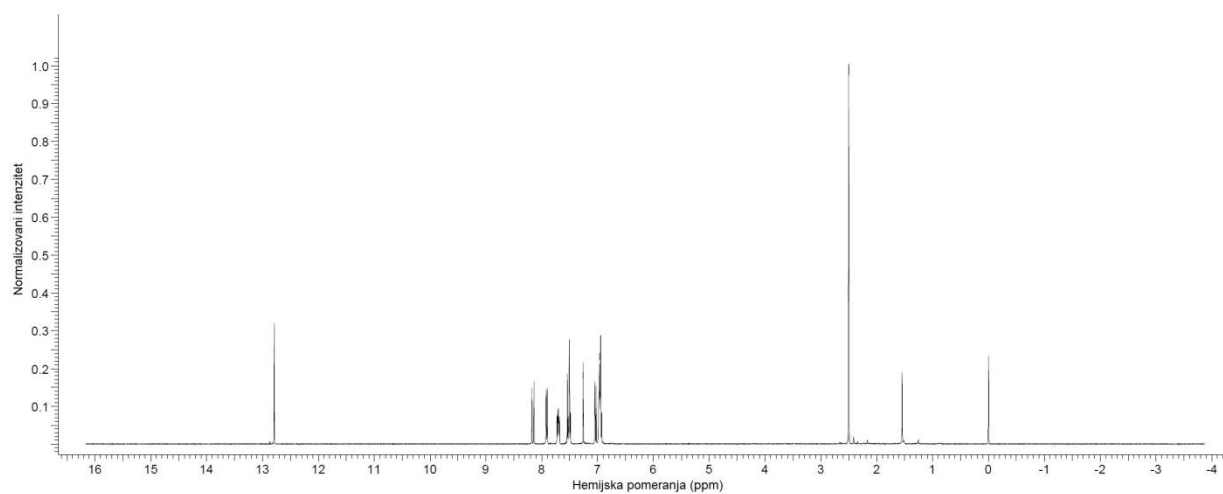


¹³C NMR

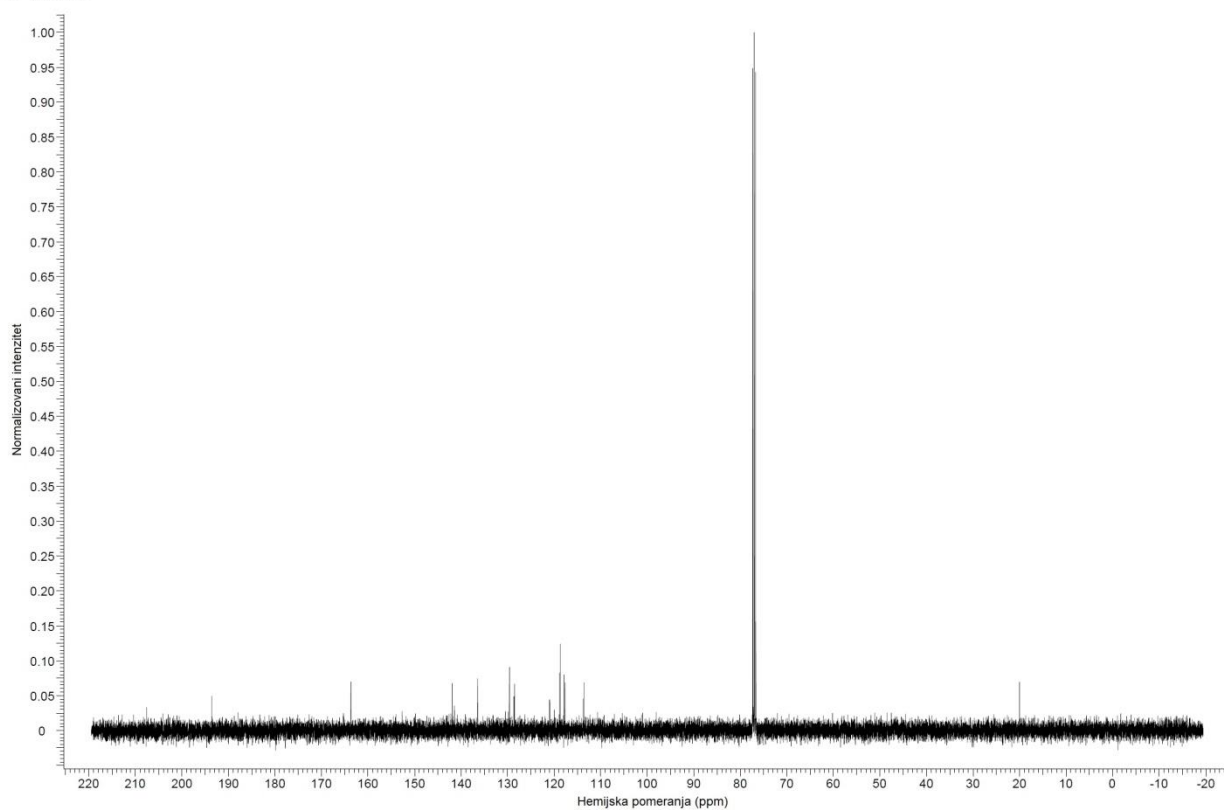


Prilog 4. NMR spektri halkona p-F-o-CH₃.

¹H NMR



¹³C NMR



BIOGRAFIJA AUTORA

Dušan J. Ušjak rođen je 19.10.1991. godine u Pančevu, Srbija. Osnovnu školu „Mlada Pokolenja“, kao i Gimnaziju „Mihajlo Pupin“ završio je u Kovačici kao nosilac Vukove diplome. Integrisane akademske studije – studijski program Farmacija, na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, upisao je 2010. godine. Tokom školskih godina 2011/2012. i 2012/2013. bio je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, a u februaru 2016. godine odbranom završnog rada pod nazivom „Značaj trans masnih kiselina hrane“ diplomirao je sa prosečnom ocenom 8,94. Državni ispit položio je u oktobru 2016. godine nakon obavljenog pripravničkog staža i bio je zaposlen kao diplomirani farmaceut u BENU apoteci. Doktorske akademske studije – studijski program Farmaceutske nauke, modul Farmaceutska mikrobiologija, upisao je 2017. godine na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Dobitnik je Godišnje nagrade za najbolje studente doktorskih akademskih studija Farmaceutskog fakulteta, a u novembru 2020. godine dobio je nagradu za najbolju postersku prezentaciju na međunarodnom kongresu FEMS. U zvanje istraživač pripravnik, Dušan Ušjak je izabran u julu 2020. godine, a od februara 2021. godine učestvuje u sprovođenju projekta pod nazivom „Ispitivanje potencijalnog antibakterijskog delovanja proizvoda sa 3HFWC u *in vitro/in vivo* uslovima“ (Inovacioni vaučer br. 91, nosilac Quantum cosmetics d.o.o.). U toku dosadašnjeg naučnog rada Dušan Ušjak je objavio šest radova: jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), tri rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22) i dva rada u međunarodnim časopisima M23 kategorije. Na međunarodnim kongresima ima tri saopštenja štampanih u izvodu.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Dušan Ušjak

Број индекса 22/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Uticaj novosintetisanih derivata halikona na rast, produkciju biofilma i faktore virulencije multirezistentnih sojeva Acinetobacter baumannii

- 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, 22. 10. 2021.

Dušan Ušjak

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Dušan Ušjak

Број индекса 22/2017

Студијски програм Farmaceutске науке

Наслов рада Uticaj novosintetisanih derivata halikona na rast, produkciju biofilma i faktore virulencije multirezistentnih sojeva Acinetobacter baumannii

Ментор Dr Marina Milenković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања 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, 22. 10. 2021.

Dušan Ušjak

Изјава о коришћењу

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

Uticaj novosintetisanih derivata halikona na rast produkciju biofilma i faktore virulencije multirezistentnih sojeva Acinetobacter baumannii

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, 22. 10. 2021.

Dušan Ujčak

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.



Antimicrobial activity of novel chalcones and modulation of virulence factors in hospital strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*

Dušan Ušjak^a, Branka Ivković^b, Dragana D. Božić^a, Lidija Bošković^c, Marina Milenković^{a,*}

^a Department of Microbiology and Immunology, University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221, Belgrade, Serbia

^b Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221, Belgrade, Serbia

^c Department of Laboratory Diagnostics, Clinical Hospital Centre "Dr. Dragiša Mišović", Heroja Milana Tepića 1, 11000, Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:

Chalcones
Acinetobacter baumannii
Pseudomonas aeruginosa
Biofilm
Motility

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii and *Pseudomonas aeruginosa* are frequent multiresistant nosocomial pathogens that cause wound and pulmonary infections in hospitalized patients. As being increasingly resistant to most clinically available antibiotics, there is a constant need for exploration of new substances that could kill them or inhibit their growth, or alternatively inhibit some of their essential virulence factors. Chalcones are chemical compounds with well-documented antimicrobial potential. The aim of this study was to examine effectiveness of four newly-synthesized chalcones against the multiresistant clinical strains of *A. baumannii* and *P. aeruginosa*. Antibacterial activity of chalcones was investigated with broth-microdilution test and time-dependent killing assay. Synergistic effects of tested compounds with antibiotics (meropenem, amikacin and ciprofloxacin) were determined by checkerboard assay. The effects of chalcones on expression of virulence factors in *P. aeruginosa* (pyocyanin production, swimming and swarming motility) and *A. baumannii* (twitching and surface-associated motility), along with their biofilm production, were also examined. The obtained results indicate substantial antimicrobial activity of the tested chalcones (MICs = 100–175 µg/mL) and several synergistic interactions with antibiotics, as well as notable reduction in expression of all investigated virulence factors. These promising results may constitute a good basis for further research.

1. Introduction

Healthcare-associated infections are a leading cause of morbidity and mortality worldwide. Over the last decade, multidrug-resistant Gram-negative bacteria, including *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, have been implicated in severe healthcare-associated infections and their occurrence has increased steadily [1]. *A. baumannii* and *P. aeruginosa* are of great concern for public health, as being seriously involved in nosocomial wound and pulmonary infections in hospitalized patients, which pose significant problem because many of the infections are caused by strains resistant to most antibiotics. Both of these opportunistic pathogens possess intrinsic resistance to certain groups of antimicrobial agents and can additionally acquire further resistance by means of mobile genetic elements [2]. *A. baumannii* has transformed from being susceptible to most antibiotics three decades ago, to the current global situation where some strains are resistant to almost all available agents including carbapenems,

colistin and tigecycline. Carbapenem and pan-resistant *A. baumannii* became a major threat to patient care in many hospitals, as mortality is understandably higher for serious infections due to these strains [3]. In order to slow down a bit resistance development, investigators are searching for the proper effective combinations of different classes of antimicrobial agents, which could potentially act synergistically [4]. In case of multi-drug resistant *A. baumannii* infections, colistin, antimicrobial agent that acts through the interaction with lipid A moiety of lipopolysaccharide, often remains as the sole therapeutic option. Emergence of colistin-resistant strains, as a consequence of the complete loss of lipopolysaccharide or by modification of the lipid A moiety, is of major concern [5,6]. Furthermore, carbapenem-resistant strains of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* have been recently recognized by WHO as two out of three pathogens of number one (critical) priority level for research and development of new antimicrobial agents [7].

The special characteristic of *A. baumannii*, which is partially responsible for making it one of the most important and most dangerous

* Corresponding author. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, 450 Vojvode Stepe, 11221, Belgrade, Serbia.
E-mail address: marinama@pharmacy.bg.ac.rs (M. Milenković).

nosocomial pathogens, is its ability to persist on various environmental surfaces, particularly in hospital settings. One of the main reason that confers *A. baumannii* such an advantage is the formation of biofilm, a highly organized microbial community that live inside a self-produced extracellular matrix. *A. baumannii* can produce biofilms on various surfaces, both biotic and abiotic, providing bacteria resistance to antibiotics and desiccation, and an ability to survive harsh conditions for a long time [8,9]. Biofilm production is an important characteristic of *P. aeruginosa* as well, which is responsible for severe infections in hospitalized and immunocompromised patients. Biofilm renders these bacteria extremely resistant against antibiotics and disinfectants, which enables them to persist on indwelling medical devices and in host tissues, causing diseases such as chronic pneumonia in cystic fibrosis patients [10]. Some of the recent studies were directed towards the effects of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents, as they could modify the gene transcription, which could in turn result in changed expression of several virulence factors, including the biofilm production. Moreover, results of several studies suggest the importance of bacterial species, types of antimicrobial agents, or resistance mechanisms on these phenotype alterations [11–13]. A fact that the results gathered by different authors were inconsistent, reducing the biofilm production in some cases, while acting as inducing agents in others [9,11,14,15], there is a need for further exploration of the influence of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents on biofilm production. *P. aeruginosa* has three well studied virulence determinants that are important in pathogenesis: quorum-sensing, type III secretion system, and lipopolysaccharide O-antigen. Quorum-sensing signals are generated when bacterial population density reaches certain level, and bacterial cells respond by increasing the expression of several virulence factor genes [16]. Among those virulence factors, pyocyanin production, swarming and swimming motility are the important determinants of pathogenesis. Pyocyanin can interfere with immune system, cause the oxidative stress, or inactivate the vacuolar ATPase vesicle transport, which can in turn disrupt or diminish several cell functions [17–20]. Swarming and swimming are two out of three (along with twitching) different motilities that *P. aeruginosa* uses to facilitate colonization in different environmental settings. Their significant role in surface attachment and biofilm maturation has also been described. Swimming motility is driven by the single polar flagellum in aqueous environments. Swarming is more complex mechanism of genetic regulation, which is responsible for several properties of cells, as the enhanced antibiotic resistance, or increased expression of other virulence factor genes, besides their role in movement of bacteria through the semisolid surface by using both flagella and type IV pili structures [21,22]. *A. baumannii* lacks flagella, but is also motile organism. Two separate modes of motility have been described in *A. baumannii*: twitching and surface-associated motility. Although, these are not essential virulence factors as in case of *P. aeruginosa*, there are studies that indicate their association with increased virulence. Twitching is mediated by extension/retraction system of type IV pili, while the mechanism that triggers the surface-associated motility has not yet been revealed, but it is mostly similar to *P. aeruginosa* swarming motility. Interestingly, unlike twitching motility, surface-associated motility is influenced by several environmental factors, for instance, room temperature and blue light suppress this type of motility [23,24].

The emergence of multi-drug resistant bacteria poses a difficult task for physicians, leaving them with limited or non-existent therapeutic options [25]. Consequentially, many of the research studies are directed towards the discovery of new potential therapeutics. The derivatives of 1,3-diaryl-2-propen-1-ones, otherwise known as chalcones, have well-documented broad range of pharmacological activities. Naturally occurring as the intermediate compounds of the flavonoid biosynthetic pathways in plants, these α,β -unsaturated ketones display various antibacterial, antifungal, antimalarial, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and immunomodulatory properties, due to their distinct structural and molecular organization [26,27]. Several studies

demonstrated antibacterial activity of various chalcones against both Gram-positive and Gram-negative species, including *A. baumannii* and *P. aeruginosa* [28–32].

Therefore, we decided to investigate for the first time antibacterial activity of four newly-synthesized chalcones, and their effects on various virulence factors of multiresistant clinical strains of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* isolated from hospitalized patients.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Five clinical isolates of *A. baumannii* obtained from wounds (4) and tracheal aspiration catheter (1), and one clinical isolate of *P. aeruginosa* obtained from the wound were used in this study. The isolates were gathered from multiple sources, including Clinical Medical Center Zvezdara Belgrade, Clinic for Gynecology and Obstetrics – Clinical Center of Serbia and Clinical Hospital Center “Dr. Dragiša Mišović” Belgrade. The reference strains of *A. baumannii* ATCC 19606 (KWIK-STIK™, Microbiologics, USA) and *P. aeruginosa* ATCC 9027 (KWIK-STIK™, Microbiologics, USA) were used as the positive controls. Identification and determination of antibiotic susceptibility profiles was performed with VITEK® 2 GN ID and VITEK® 2 AST cards (bioMérieux, France). Clinical isolates were stored in brain heart infusion broth at –80 °C. Thawing was carried out at room temperature, and bacteria inoculated onto tryptic soy agar and cultivated for 24 h at 35 °C prior to experiments.

2.2. Chemical compounds and culture media

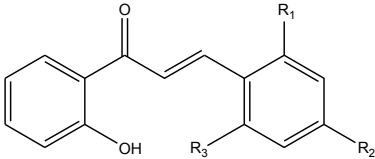
Culture media used in the study were: Mueller-Hinton broth, Mueller-Hinton agar, tryptic soy broth, tryptic soy agar, nutrient broth and Andrade lactose peptone water (Torlak, Serbia); brain heart infusion broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India); peptone, tryptone and agar agar (Torlak, Serbia). Sterile phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2) (Torlak, Serbia), 0.5% safranin (HiMedia), dimethylsulfoxide (DMSO), chloroform, methanol, 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) (Sigma-Aldrich, USA) and antibiotics amikacin, meropenem and ciprofloxacin (Sigma-Aldrich, USA) were also used in the study.

2.3. Chalcones

Four different novel chalcones (Table 1) were tested: 3-(4-trifluoromethylphenyl)-1-(2-hydroxyphenyl)-2-propen-1-on (further referred to as p-CF₃), 3-(2,6-dimethoxyphenyl)-1-(2-hydroxyphenyl)-2-propen-1-on (further referred to as 2,6-OCH₃), 3-(2-methoxyphenyl)-1-(2-hydroxyphenyl)-2-propen-1-on (further referred to as o-OCH₃) and 3-(4-fluoro-2-methylphenyl)-1-(2-hydroxyphenyl)-2-propen-1-on (further referred to as p-F-o-CH₃). The chalcones were synthesized at the

Table 1

Structures of the tested chalcones.



Chalcone	R ₁	R ₂	R ₃
p-CF ₃	-H	-CF ₃	-H
2,6-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃
o-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃
p-F-o-CH ₃	-CH ₃	-F	-H

Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Belgrade – Faculty of Pharmacy.

2.4. Antimicrobial assay

Antimicrobial activity was tested by the broth microdilution method according to guidelines of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [33]. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined as the lowest concentrations of chalcones that inhibited visible growth of bacteria. In brief, the method was carried out in 96-well polystyrene microtiter plates by using serial dilutions of the tested compounds dissolved in DMSO and further diluted in Mueller-Hinton broth to tested concentrations (50–200 µg/mL). Final concentrations of DMSO in each well were less than 5%. The bacterial strains were previously prepared by incubating for 24 h at 35 °C on Mueller-Hinton agar. Fresh overnight cultures were suspended into sterile physiological saline and adjusted to 0.5 McFarland standard which is approximately 2×10^8 CFU/mL. The bacterial suspensions were further diluted in Mueller-Hinton broth to a final suspension with 10^6 CFU/mL. The results were interpreted after incubation of plates for 24 h at 35 °C. Each test was repeated three times.

2.5. Time-kill assay

In short, three concentrations (MIC, 2xMIC and 4xMIC) of the p-CF₃ chalcone, were used to evaluate time-dependent effect on bacterial growth. Inoculum density of approximately 10^5 CFU/mL was prepared in Mueller-Hinton broth and incubated at 35 °C. After incubation at five different time intervals (0 h, 2 h, 4 h, 8 h and 24 h) appropriate dilutions were streaked onto Mueller-Hinton agar plates, and results obtained by using the colony counting method, after 24 h of incubation [34]. Experiments were repeated three times.

2.6. Checkerboard assay

Checkerboard method was used to evaluate combined effects of the chalcones and antibiotics (amikacin, meropenem, and ciprofloxacin). In brief, the method was performed in 96-well polystyrene microtiter plates, by pouring decreasing concentrations of tested chalcones and twofold dilutions of examined antibiotics, lower than the recorded MICs, into horizontal and vertical wells, respectively. The chalcones were prepared as described above and diluted using the Mueller-Hinton broth to tested concentrations (12.5–125 µg/mL). Each well was filled with the same amounts of tested agents (50 µL) and a bacterial suspension to a final volume of 200 µL. The bacterial suspension was prepared as described earlier. After the incubation of plates for 24 h at 35 °C, MICs were determined as the lowest concentrations of combinations, where visible growth was absent. The results were interpreted by calculating the fractional inhibitory concentrations (FICs) and the fractional inhibitory concentration indices (FICIs). FIC of each compound, both chalcones and antibiotics, is equal to the ratio of MICs of agents in combination and agents alone. FICI represents the sum of FICs of chalcone and antibiotic [35]. The results were interpreted as follows: FICI ≤ 0.5 – synergism, 0.5 < FICI < 1.0 – partial synergism, FICI = 1.0 – additive effect, 1.0 < FICI ≤ 4.0 – indifferent effect, or FICI > 4.0 – antagonism [36]. Each test was repeated three times.

2.7. Pyocyanin production assay

The test was carried out according to method described by Rampioni et al. [37] with slight modifications. In brief, after incubation for 48 h at 35 °C of suspensions that contained approximately 10^8 CFU/mL (OD₆₀₀ = 0.2) of bacteria in tryptic soy broth supplemented with sub-MICs of tested chalcones, the produced pyocyanin was extracted with chloroform. After the centrifugation at 3000 rpm for 10 min, bluish chloroform phase was isolated and treated with 0.2 M HCl. The

content was then vigorously vortexed for 10 s until extraction of pinkish upper aqueous phase, and absorbance was measured at 520 nm using the UV–visible spectrophotometer (Shimadzu UV-1800, Japan). The same method was performed without the addition of chalcones to obtain positive control. Every experiment was repeated three times.

2.8. Motility assays

2.8.1. *P. aeruginosa* anti-swarming and anti-swimming assay

Briefly, agar medium for swarming assay was prepared (1% peptone, 0.5% NaCl, 0.5% agar and 0.5% filter-sterilized D-glucose) and point inoculated into the center with 5 µL (OD₆₀₀ = 0.4) of an overnight culture of *P. aeruginosa* treated with sub-MICs of chalcones (50 µg/mL and 100 µg/mL). In the similar manner swimming assay was performed on specifically prepared agar medium (1% tryptone, 0.5% NaCl and 0.3% agar) by point inoculating the media with 3 µL of treated bacterial overnight cultures. Positive control was prepared by incubating bacteria without the chalcones [38]. Measurements of the surface areas were performed with ImageJ software v1.51j8 (National Institute of Health, USA). Each experiment was repeated three times.

2.8.2. *A. baumannii* anti-twitching and anti-surface-associated motility assay

The influence of p-CF₃ chalcone on *A. baumannii* clinical and reference strains motility was tested. Twitching motility was produced by stab inoculating 5 µL (OD₆₀₀ = 0.2) of previously prepared overnight *A. baumannii* cultures treated with sub-MICs of p-CF₃ (25 µg/mL and 50 µg/mL) into the interface of petri plate and specifically prepared agar medium (1% tryptone, 0.5% NaCl and 1% agar) and by allowing the plates to incubate for 24 h. After the removal of agarose, plates were stained with 0.5% safranin and excess dye washed off with phosphate-buffered saline. The surface-associated motility was created by inoculation of 2 µL (OD₆₀₀ = 0.2) of stationary phase *A. baumannii* cultures treated with sub-MICs of p-CF₃ (25 µg/mL and 50 µg/mL) in the center of freshly prepared agar medium (0.5% tryptone, 0.25% NaCl and 0.5% agar). Plates were then incubated for 18 h. Positive control was prepared by incubating bacteria without the chalcones [39]. Measurements of the surface areas were performed with ImageJ software v1.51j8 (National Institute of Health, USA). Both tests were conducted at three separate times.

2.9. Biofilm assay

The test was performed according to method described by Stepanović et al. [40]. In brief, overnight cultures of *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, both reference and clinical strains, were prepared in sterile saline to approximately 2×10^8 CFU/mL and vigorously vortexed for at least one minute. The amounts (20 µL) of bacterial suspensions were mixed with appropriate media to final volumes of 200 µL in each well of polystyrene microtiter plates. Tryptic soy broth, supplemented with an additional 1% glucose was used as standard medium, according to recommendations of Knobloch et al. as the medium that enhances the most abundant biofilm production [41]. After incubation of the plates for 24 h at 35 °C the contents were washed out three times using the 300 µL of sterile phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2), and remaining biofilm fixed with 150 µL of methanol for 20 min. After overnight drying at room temperature, each well was stained with 150 µL of 0.5% safranin for 15 min. Unbounded dye was then rinsed with water and remaining bounded dye extracted out of cells using the 96% ethanol for at least 30 min. The optical density (OD) was measured at 490 nm with microtiter plate reader (BioTek ELx800, USA). To evaluate effects of the chalcones and antibiotics on biofilm production, sub-MICs of each of these antimicrobial agents were added to tryptic soy broth supplemented with 1% glucose.

Since the method was performed in triplicate for each sample, average OD values were calculated and reduced by cut-off optical

density (ODc) values. The resulting OD values were then compared to ODc values to determine the type of biofilm producer. ODc values were calculated as the sum of average OD values and three standard deviations of negative control. Interpretation was carried out as follows: $OD \leq ODc$ – no biofilm producer, $ODc < OD \leq 2xODc$ – weak biofilm producer, $2xODc < OD \leq 4xODc$ – moderate biofilm producer, $4xODc < OD$ – strong biofilm producer [42]. All of the tests were repeated three times.

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using the SPSS Statistics, IBM SPSS Software, v24.0 (IBM, USA). The Student's t-test and Mann-Whitney *U* test were used for comparisons between the groups.

3. Results

3.1. Antimicrobial activity of the chalcones

All of the tested chalcones exhibited considerable antimicrobial activity (Supplemental Table S1). MICs were lower in case of *A. baumannii* strains, ranging from 100 to 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, compared to 150–175 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of chalcones needed for inhibition of *P. aeruginosa*. Chalcones p-CF₃ and o-OCH₃ expressed better antibacterial activities compared to other tested compounds, with respect to action against *A. baumannii*.

3.2. Killing kinetics

The results of time-kill testing on *A. baumannii* suggest bactericidal effect of p-CF₃ after 24 h of incubation when applied in concentrations that are more than two times higher than MIC (Fig. 1A and B), except one clinical strain against which 4xMIC of p-CF₃ exhibited bactericidal effect after as early as 8 h. The MICs only temporarily inhibited the

growth of bacteria, as they reached the numbers almost as high as in case of positive control after 24 h of incubation. Also we could observe that MICs delayed the entrance of bacteria into the stationary phase.

On the other hand, p-CF₃ did not show bactericidal activity in any of the tested concentrations, when used against *P. aeruginosa* (Fig. 1C and D). It seems that clinical strain was more resistant, based on the effects of MIC and 2xMIC after 24 h of incubation. However, dose-dependent inhibition was achieved with respect to increasing concentrations of tested chalcone.

3.3. The effects of chalcones in combination with antibiotics

All clinical strains of *A. baumannii* exhibited resistance to tested antibiotics, except one strain which was susceptible to meropenem (MIC = 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and amikacin (MIC = 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Two of them were highly resistant to amikacin (MIC > 4096 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and were excluded from testing. Control strain of *A. baumannii* ATCC 19606 was susceptible to meropenem (MIC = 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and amikacin (MIC = 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), but resistant to ciprofloxacin (MIC = 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Most of the synergistic interactions were observed in case of chalcone/meropenem combinations (41.67%). Combinations chalcone/amikacin yielded 12.5% of synergistic interactions, whereas chalcone/ciprofloxacin produced 4.17% of them (Fig. 2). Synergistic interactions were achieved after application of 12.5–25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the chalcones in combination with relevant subinhibitory concentrations of antibiotics. Additionally, a number of partially synergistic interactions were noticed, especially in case of chalcone/amikacin combinations, where they constituted 87.5% of all recorded interactions.

The tested clinical strain of *P. aeruginosa* was susceptible to meropenem (MIC = 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), but resistant to amikacin (MIC = 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and ciprofloxacin (MIC = 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Control *P. aeruginosa* ATCC 9027 strain was susceptible to all of the tested antibiotics. No synergistic interaction was observed and in most of the cases there was no interaction at all between tested agents. However, cases of partial

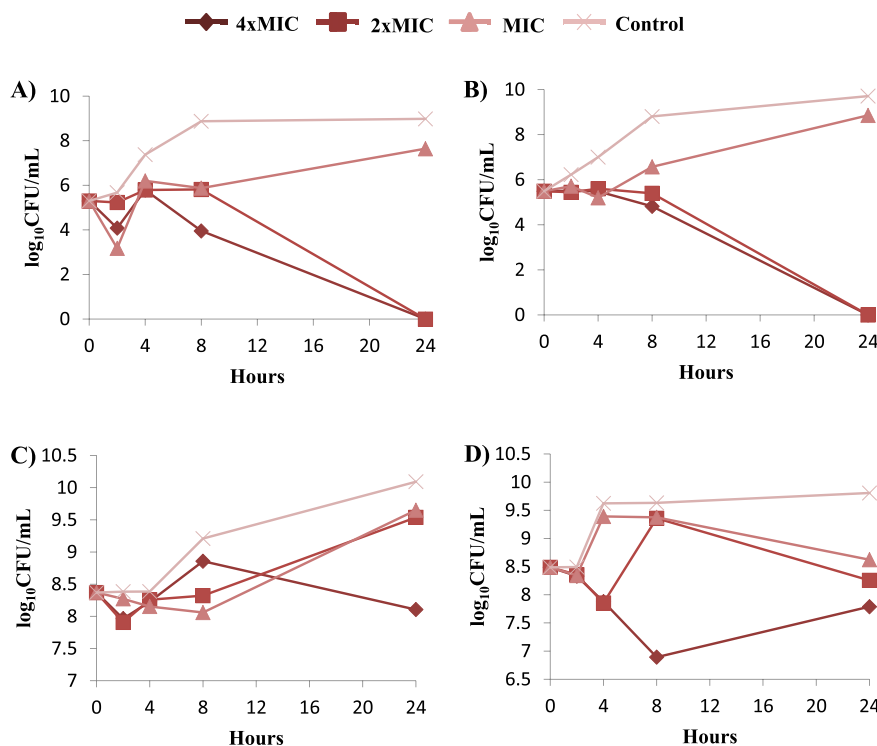


Fig. 1. Time-kill curves of: (A) Clinical strain of *A. baumannii*, (B) *A. baumannii* ATCC 19606, (C) Clinical strain of *P. aeruginosa*, (D) *P. aeruginosa* ATCC 9027. Testing was conducted with p-CF₃.

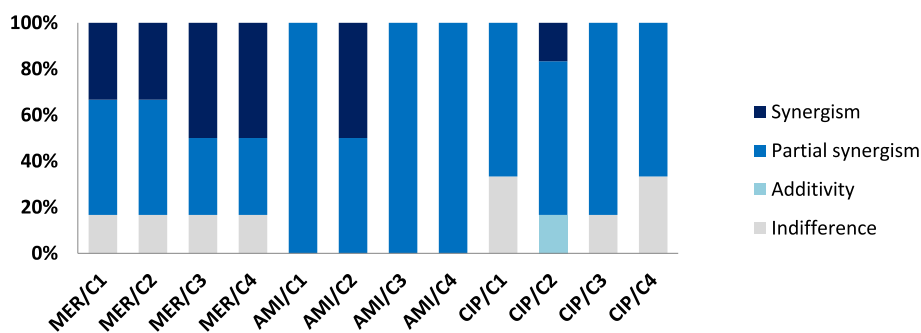


Fig. 2. The effects of interactions between chalcones and antibiotics against *A. baumannii*. MER-meropenem, AMI-amikacin, CIP-ciprofloxacin, C1-p-CF₃, C2-2,6-OCH₃, C3-o-OCH₃, C4-p-F-o-CH₃. Results are presented as percentage of the strains.

synergism and additivity were recorded with meropenem (in combination with 37.5 µg/mL of chalcones) and especially amikacin (in combination with 37.5–75 µg/mL of chalcones), indicating that there still might be some beneficial interactions of these agents against *P. aeruginosa*.

3.4. The effects of chalcones on *P. aeruginosa* virulence factors expression

3.4.1. Inhibition of pyocyanin production

The results of these experiments suggest that all of the tested chalcones significantly reduce pyocyanin production of *P. aeruginosa* (Fig. 3). Clinical strain turned out to be a stronger pyocyanin producer,

as it yielded more intensive pink coloured aqueous extract (Supplemental Fig. S1A). Generally, pyocyanin production was most reduced by p-CF₃, whereas the reduction in the presence of o-OCH₃ was markedly lower. Statistically significant reduction ($P \leq 0.05$) was observed in all of the cases, with an exception of o-OCH₃ at both sub-MICs and 50 µg/mL of p-F-o-CH₃ when tested against the clinical strain. Individually, the most abundant reduction, at concentration of 100 µg/mL, was produced by p-CF₃, lowering the formation by 71.1% and 72.11% compared to the positive control, when tested against clinical and reference strain, respectively (Supplemental Fig. S1). The same chalcone was the most effective at concentration of 50 µg/mL, as it lowered the pyocyanin production by 59.19% and 49.54% when tested

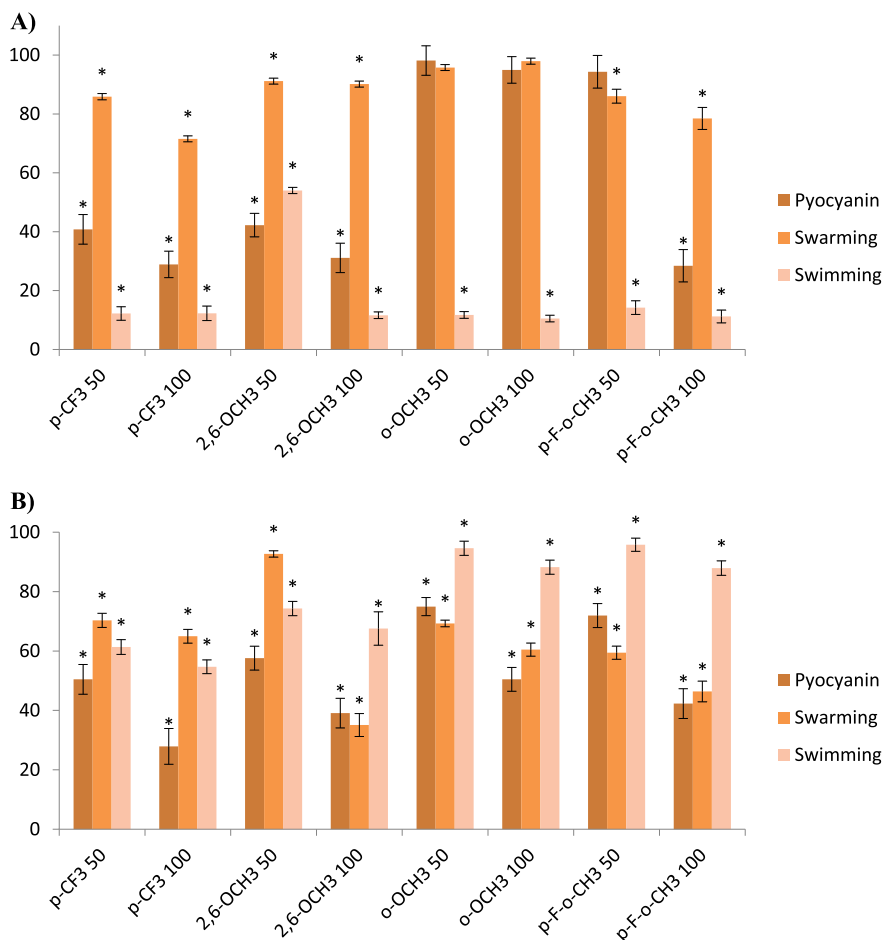


Fig. 3. The effects of subinhibitory concentrations of chalcones (50 and 100 µg/mL) on pyocyanin production, swarming and swimming motility: (A) *P. aeruginosa* clinical strain, (B) *P. aeruginosa* ATCC 9027 control strain. Results are presented as percentage of the reduction compared to the positive control. * $P \leq 0.05$.

against clinical and reference strain, respectively.

3.4.2. Inhibition of swarming and swimming motility

The swarming motility was significantly inhibited ($P \leq 0.05$) by all of the tested chalcones (except *o*-OCH₃ chalcone in case of clinical strain of *P. aeruginosa*) (Fig. 3). The greatest inhibition was achieved by 2,6-OCH₃ at concentration of 100 µg/mL which reduced the motility by as much as 64.92%, when used against the reference strain (Supplemental Fig. S2D). Swarming motility of clinical isolate was most inhibited by *p*-CF₃ chalcone, which reduced it by 28.46% at concentration of 100 µg/mL (Supplemental Fig. S2B). Chalcone *p*-F-*o*-CH₃ was the most effective at concentration of 50 µg/mL, reducing the motility by 13.95% and 40.56%, when tested against clinical and reference strain, respectively.

The swimming motility was especially expressed by the clinical strain of *P. aeruginosa*, as it covered complete surface of the agar plate after incubating for 24 h (Supplemental Fig. S3A), but was greatly inhibited after addition of the chalcones. Among them, *o*-OCH₃ had the greatest inhibitory effect (89.50%) at concentration of 100 µg/mL (Supplemental Fig. S3B). Chalcone *p*-CF₃ had the greatest inhibitory effect (45.32%) on swimming of the *P. aeruginosa* reference strain (Supplemental Fig. S3D). At concentrations of 50 µg/mL, all of the chalcones were very effective in inhibiting a swimming motility of clinical strain, but considering the effects on both strains, *p*-CF₃ gave the best results.

3.5. Inhibition of *A. baumannii* motility

The twitching motility of *A. baumannii* clinical strains, in average, was substantially inhibited (29.83%) by 50 µg/mL of *p*-CF₃, although without statistical significance (Fig. 4A). Among them the highest inhibition was by 47.06% in a particular strain (Supplemental Fig. S4B). In contrast, concentration of 25 µg/mL did not affect the motility at all. *A. baumannii* control strain twitching motility, on the other hand, was significantly ($P \leq 0.05$) inhibited by both concentrations (Fig. 4B). The motility was reduced by 48.35% and 32.78% with 50 µg/mL and 25 µg/mL of *p*-CF₃, respectively.

Surface-associated motility of the *A. baumannii* clinical strains was not affected by the addition of 25 µg/mL of *p*-CF₃, but the 50 µg/mL of *p*-CF₃ significantly ($P \leq 0.05$) reduced the extent of the motility, averagely by 29.74% (Fig. 4A). The greatest inhibition, seen in one strain, reached as far as 67.02% (Supplemental Fig. S5B). Both tested concentrations, diversely from twitching motility, had no effect on *A. baumannii* control strain surface-associated motility (Fig. 4B).

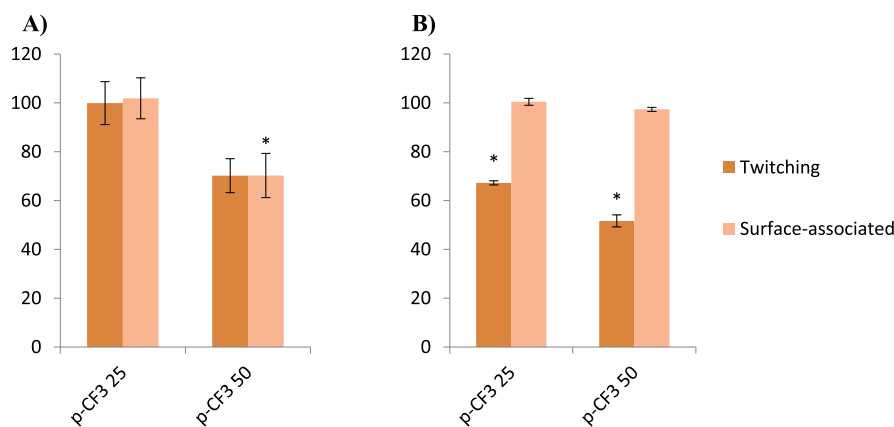


Fig. 4. The motility of *A. baumannii* after the addition of *p*-CF₃ chalcone in subinhibitory concentrations (25 and 50 µg/mL) compared to positive control: (A) *A. baumannii* clinical strains, (B) *A. baumannii* ATCC 19606 control strain. * $P \leq 0.05$.

3.6. Biofilm production

All of the tested *A. baumannii* strains exhibited massive biofilm production, when incubated without the addition of antimicrobial agents, and were classified as strong producers (mean OD₄₉₀ = 0.591).

Every tested chalcone at sub-MICs managed to substantially lower a quantity of biofilm in all strains of *A. baumannii*, in a dose-dependent manner. Statistically significant reduction of biofilm production was observed in case of *p*-CF₃ and *o*-OCH₃, at 66.5 µg/mL ($P \leq 0.05$) (Fig. 5). Lower concentrations (33.25 µg/mL and 16.62 µg/mL) reduced biofilm production from strong to moderate, in several isolates of *A. baumannii*, with no statistical significance. Chalcone *p*-CF₃ was the most effective and succeeded to convert four of the strong producers into moderate producers at concentration of 33.25 µg/mL, as well as one strong producer into moderate producer at the concentration of 16.62 µg/mL (Table 2).

For the evaluation of the influence of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm production, only the resistant strains were selected and compared to positive control of relevant strains (Fig. 5). Meropenem exhibited significant influence on biofilm production ($P \leq 0.05$) at the highest tested concentration (4 µg/mL), whereas the lowest tested concentration (1 µg/mL) stimulated the production, according to mean overall amount of biofilm (mean OD₄₉₀ = 0.637). Similarly, lowest tested concentration of amikacin (4 µg/mL) yielded more biofilm than a positive control (mean OD₄₉₀ = 0.610), but there was no significant reduction at higher concentrations. On the other hand, ciprofloxacin decreased production of biofilm at all the tested subinhibitory concentrations, of which significant reduction could be seen in case of two higher concentrations, that is 0.5 µg/mL and 1 µg/mL. Distribution of biofilm producer types is presented in Table 3, which also reflects the greatest effectiveness of ciprofloxacin as biofilm inhibitor of *A. baumannii*.

Both clinical and reference strains of *P. aeruginosa* used in this study exhibited extremely strong production of biofilm (mean OD₄₉₀ = 1.216).

In general, 100 µg/mL of chalcones managed to substantially inhibit the biofilm production of *P. aeruginosa*, with statistical significance ($P \leq 0.05$) seen only in case of *o*-OCH₃ (Fig. 6). At concentrations of 50 µg/mL only *p*-CF₃ produced notable inhibition, while others induced a slight reduction in average. Concentrations of 25 µg/mL generally did not affect the production.

The antibiotics at sub-MICs yielded various results (Fig. 6). Meropenem and ciprofloxacin inhibited the biofilm production with statistical significance ($P \leq 0.05$) at all three tested concentrations in a dose dependent manner. Diversely, amikacin stimulated the

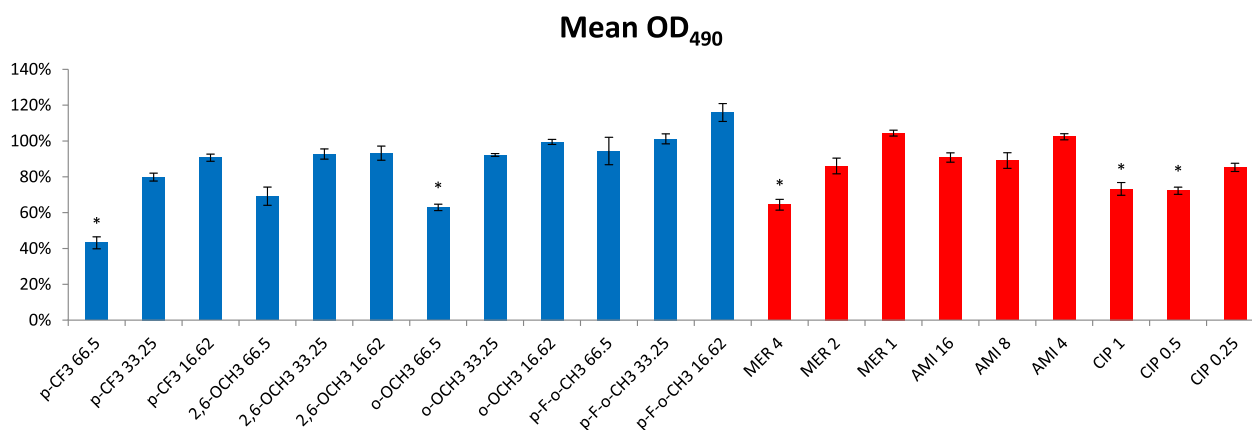


Fig. 5. Percentage of *A. baumannii* biofilm production after the addition of various antimicrobial agents (chalcones and antibiotics), at three different concentrations each, compared to positive control. The concentrations are represented in $\mu\text{g/mL}$. * $P \leq 0.05$.

Table 2

Distribution of biofilm producer types after 24 h of incubation of *A. baumannii* strains in the presence of sub-MIC of tested chalcones (note that without treatment, all of the strains behaved as strong producers).

Chalcone	p-CF ₃ ($\mu\text{g/mL}$)			2,6-OCH ₃ ($\mu\text{g/mL}$)			o-OCH ₃ ($\mu\text{g/mL}$)			p-F-o-CH ₃ ($\mu\text{g/mL}$)		
	concentration	16.62	33.25	66.5	16.62	33.25	66.5	16.62	33.25	66.5	16.62	33.25
Strong producer	5/6	2/6	1/6	4/6	4/6	2/6	6/6	5/6	1/6	6/6	5/6	2/6
Moderate producer	1/6	4/6	1/6	2/6	2/6	2/6	–	1/6	4/6	–	1/6	2/6
Weak producer	–	–	1/6	–	–	–	–	–	1/6	–	–	1/6
No producer	–	–	3/6	–	–	2/6	–	–	–	–	–	1/6

production, especially at the lowest tested concentration of 8 $\mu\text{g/mL}$. Reference strain was excluded from this result, as amikacin completely inhibited its growth, leaving no biofilm behind.

4. Discussion

In this study we investigated the effectiveness of four newly-synthesized chalcones against *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, including their antimicrobial activity, potential interactions with antibiotics and action against some virulence factors of these pathogens. The tested chalcones showed a valuable bacteriostatic activity on both *A. baumannii* and *P. aeruginosa*. Among them, 2'-methoxy- and 4'-trifluoromethyl-substituted analogs showed slightly greater activity, with respect to their action against *A. baumannii*. Compared to some of the recently tested chalcones, activity against *P. aeruginosa* could be classified as moderately high [30,31,43–45]. There are limited studies regarding the inhibitory action of chalcones against the emerging pathogen *A. baumannii*. However, the results of existing studies are in consistency with our results [32,46]. On the basis of the structures of these investigated types of chalcones compared to our tested chalcones, we could agree with a generally accepted opinion that the α,β -unsaturated ketone moiety is essential for antimicrobial properties [47]. Also, we could conclude that methoxy and halogen groups support the antimicrobial activity. Furthermore, the results suggest that chalcones

had better activity against *A. baumannii* clinical strains, according to lower MICs and an obtained time-kill curves which indicated bactericidal effects of 2xMICs and 4xMICs, opposite to *P. aeruginosa* in which they produced only bacteriostatic effect.

Interactions between the chalcones and antibiotics are well-documented. Antibiotics used in this study were selected based on their effectiveness against *A. baumannii* and *P. aeruginosa* strains and potential to develop resistance to them, which could be slowed down in combination with antimicrobial agents that have different mechanisms of action [48,49]. All of the tested compounds showed good potential for suitable combination with either of examined antibiotics. Analog with two methoxy groups (2,6-OCH₃) particularly interacted well with amikacin and ciprofloxacin, whereas the best results regarding the synergism with meropenem were observed in cases of o-OCH₃ and p-F-o-CH₃. Interactions with aminoglycoside and fluoroquinolone antibiotics proved to be in consistency with existing results [28,50]. In addition, our results suggest that some types of chalcone molecules might constitute a good combination with carbapenems, such as meropenem. Another study suggests that this observation may be due to a great potential of the chalcones in competitive inhibition of β -lactamase enzymes [51].

Next, we examined the effectiveness of the tested compounds against virulence factors of these two pathogens, in accordance with modern approach for bypassing the rapid development of resistance

Table 3

Distribution of biofilm producer types after 24 h of incubation of *A. baumannii* strains in the presence of sub-MIC of tested antibiotics.

Antibiotic	Meropenem ($\mu\text{g/mL}$)			Amikacin ($\mu\text{g/mL}$)			Ciprofloxacin ($\mu\text{g/mL}$)			
	concentration	1	2	4	4	8	16	0.25	0.5	1
Strong producer	4/4	2/4	1/4	4/5	4/5	2/5	2/6	4/6	2/6	1/6
Moderate producer	–	1/4	2/4	1/5	1/5	3/5	2/6	3/6	3/6	4/6
Weak producer	–	1/4	–	–	–	–	–	1/6	–	–
No producer	–	–	1/4	–	–	–	–	–	–	1/6

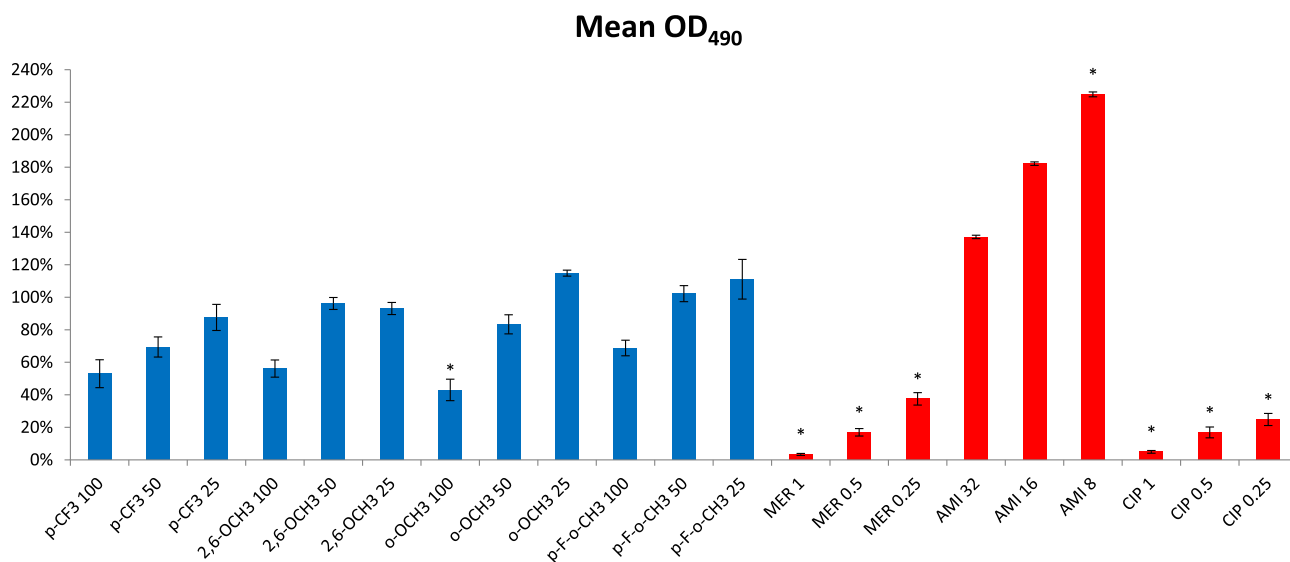


Fig. 6. *P. aeruginosa* biofilm production in the presence of chalcones or antibiotics at three different concentrations, compared to positive control. The concentrations are represented in $\mu\text{g/mL}$. * $P \leq 0.05$.

[52]. In case of *P. aeruginosa*, we decided to investigate the effects on pyocyanin production, swarming and swimming motility, which are important virulence factors, therefore, inhibition of one of these factors could prevent the bacteria from causing a disease. Pyocyanin is a toxin that belongs to group of secreted virulence factors known as phenazines. It has cytotoxic properties due to its potential to cause oxidative stress by increasing the intracellular levels of superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), and to induce apoptosis. Additionally, pyocyanin was shown to participate in biofilm maturation and modify the cytokine expression and secretion, thus significantly contributing to bacterial pathogenesis [53,54]. Swarming motility is a complex multicellular, rapid and coordinated movement of bacteria across the semi-solid surface, triggered by the rotation of flagella, as well as retraction and extension of type IV pili. Consequently, it enables bacteria the ability to adhere at the site of infection, migrate over it and spread to contiguous areas. Moreover swarming can protect the bacteria from engulfment by macrophages and provide resistance to antibiotics, which further contributes to its important role in pathogenesis [21,55]. Swimming, on the other hand, is a flagellum-dependent type of motility mediated by chemotactic signals, thus allowing the bacteria to move towards the attractants, such as nutrients, and away from repellents [56]. Several authors have proved that inhibition of these virulence factors by various substances, which act as quorum-sensing inhibitors, can lead to diminished virulence of *P. aeruginosa* [57–59]. All of the tested chalcones showed significant activity in inhibiting the pyocyanin production, when used in subinhibitory concentrations. Among them, the most active was p-CF₃, which has managed to decrease the amount of pyocyanin by more than 70% when added at approximately 2/3 of MIC. Additionally, it reduced production by about 50–60% when used at even lower concentration, i.e. around 1/3 of MIC. There are existing results which prove that other chalcones and related flavonoids, as well, can achieve the same effect [60]. Regarding the inhibition of *P. aeruginosa* swarming and swimming motility, p-CF₃ yet again proved to be overall the most effective tested chalcone. On average, it reduced swarming motility by 21.91% and 31.74% at concentrations of 50 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Swimming motility was even more inhibited by this chalcone (i.e. 63.22% and 66.51% averagely). Although the chalcones have not been examined so far as potential inhibitors of *P. aeruginosa* motility, some of the related flavonoids were tested, and proved to have similar activity [61,62]. In *A. baumannii* we tested the influence of p-CF₃ chalcone on two types of motility: twitching and surface-associated motility. A definite connection of

Acinetobacter spp. motility to bacterial virulence has not yet been described. However, notices of increased expression of type IV pili during the *A. baumannii* bacteraemia and the observation of twitching in highly virulent *A. baumannii* isolates, suggest that it may be virulence-associated factor [23,63]. Additionally, type IV pili are also responsible for the uptake of exogenous DNA molecules, which makes the twitching closely related to the process of natural transformation [39]. In this study we observed that the application of p-CF₃ at 1/2 of MIC, notably reduces both modes of motility of tested *A. baumannii* clinical strains, nearly by 30%. Interestingly, twitching motility of reference strain was significantly inhibited by this chalcone, at both tested sub-MICs, while it had no influence on surface-associated motility at all.

Another subject of this study was to examine the biofilm production of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* clinical strains, which were normally strong producers, after the addition of chalcones at subinhibitory concentrations, and to compare that with the influence of subinhibitory concentrations of some clinically used antibiotics. Most of their time, the bacteria, including *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, reside inside a complex interacting multicellular communities embedded in the matrix composed primarily of polymeric substances as proteins, polysaccharides and extracellular DNA. The biofilm, in turn, can provide bacteria with increased resistance to antimicrobials and persistence at the site of infection. Moreover, it can exacerbate immune response of the host, which further contributes to the bacterial pathogenesis [64,65]. The efficiency of biofilm disruption, linked to reduced virulence of *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, has been recorded in several studies [66–69]. Application of the tested chalcones at subinhibitory concentrations has led to notable dose-dependent reduction of biofilm formation in both *A. baumannii* and *P. aeruginosa*. According to results the most effective among four tested compounds were 4'-trifluoromethyl- and 2'-methoxy-substituted analogs. Biofilm production of *A. baumannii* was mostly inhibited with highest tested sub-MIC of p-CF₃, reducing the biofilm amount by 56.85%, whereas conversely, highest tested sub-MIC o-CH₃ had the greatest inhibitory potential in case of *P. aeruginosa*, reducing its biofilm formation by as much as 57.02% in average. Altogether, p-CF₃ proved to be the most effective chalcone in biofilm inhibition. Chalcone p-F-o-CH₃ had the least impact. The ability of chalcone molecules to decrease the amount of biofilm produced by some other pathogenic bacteria was observed by several other authors as well [29,70]. Diversely, results of this study suggest that certain subinhibitory concentrations of meropenem and amikacin could even enhance the biofilm production. It is well known

that some of the antibiotics in lower concentrations can stimulate synthesis of biofilm. For example, resistant mutants of *A. baumannii* isolated after the exposure to subinhibitory concentration of meropenem exhibited significantly higher biofilm production [11]. The same situation was observed in our case when applying the lowest tested sub-MIC of meropenem to *A. baumannii* growth media. *P. aeruginosa* biofilm formation, on the other hand, was significantly reduced by sub-MICs of meropenem. Aminoglycoside antibiotics are also known as agents with capability to stimulate the biofilm production at sub-MICs, as exemplified by tobramycin, against *P. aeruginosa* and *Escherichia coli* [15]. According to our results, amikacin proved to be particularly potent stimulator, doubling the biofilm size of *P. aeruginosa* clinical strain, at the lowest tested sub-MIC. Production was also stimulated in case of *A. baumannii*. There are few mechanisms proposed that could describe this curiosity, as the usage of contemporary dead cells and their products to build up the biofilm barrier, or increased adherence to surfaces, the initial stage of biofilm formation, as a result of changes in cell surface charge and hydrophobicity elicited by sub-inhibitory concentrations of antibiotics. The induction of cell stress response, as well, may be the cause and an explanation of meropenem action, which could trigger some stress pathways, by stimulating the cell lysis [71]. Still, there are indications that some types of antibiotics could act inhibitory on biofilm production at sub-MICs, such as ciprofloxacin, which caused significant reduction of both *A. baumannii* and *P. aeruginosa* biofilm production, which is in agreement with some of the earlier reports [14]. Perhaps the absence of certain cell stress pathways related to fluoroquinolone mechanism of action could explain this phenomenon [71]. When comparing the antibiofilm effects of tested chalcones and antibiotics, we can conclude that the effects of chalcones were comparable to effects of ciprofloxacin when tested against *A. baumannii*, among which, p-CF₃ managed to lower the amount of biofilm more than any tested antibiotic. In *P. aeruginosa* meropenem and ciprofloxacin induced greater biofilm inhibition, but the antibiofilm effect of chalcones was much greater than the effect of amikacin.

5. Conclusion

In this study we demonstrated the antibacterial activity of four newly-synthesized chalcone molecules, and proved their ability to act inhibitory or bactericidally on some multiresistant clinical isolates of *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, in a dose-dependent manner. Besides, these compounds were able to significantly inhibit some of the important virulence factors when applied at subinhibitory concentrations, such as biofilm production and motility of *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, as well as pyocyanin production in *P. aeruginosa*. Additionally, we proved that these compounds could interact synergistically with some antibiotics that belong to three different classes. Obtained results constitute a good basis for further research of these agents, either as potential antibiofilm disinfectants in hospital settings, or as novel antimicrobials, in combinations with conventional antibiotics, for treatment of multiresistant *A. baumannii* or *P. aeruginosa* infections.

Conflicts of interest

All of the authors confirm that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.015>.

References

- [1] E. Tacconelli, M.A. Cataldo, S.J. Dancer, G. De Angelis, M. Falcone, U. Frank, G. Kahlmeter, A. Pan, N. Petrosillo, J. Rodríguez-Baño, N. Singh, M. Venditti, D.S. Yokoe, B. Cookson, European Society of Clinical Microbiology, ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients, *Clin. Microbiol. Infect.* 20 (2014) 1–55, <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12427>.
- [2] M. Carretero-Ledesma, M. García-Quintanilla, R. Martín-Peña, M.R. Pulido, J. Pachón, M.J. McConnell, Phenotypic changes associated with colistin resistance due to lipopolysaccharide loss in *Acinetobacter baumannii*, *Virulence* 9 (2018) 930–942, <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1460187>.
- [3] M. Kempf, J.M. Rolain, Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options, *Int. J. Antimicrob. Agents* 39 (2012) 105–114, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.10.004>.
- [4] G.A. March, M.A. Bratos, A meta-analysis of in vitro antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*, *J. Microbiol. Methods* 119 (2015) 31–36, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.09.014>.
- [5] G.M. Matar, Editorial: *Pseudomonas* and *acinetobacter*: from drug resistance to pathogenesis, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8 (2018) 68, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00068>.
- [6] Z. Farshadzadeh, B. Taheri, S. Rahimi, S. Shoja, M. Pourhajibagher, M.A. Haghghi, A. Bahador, Growth rate and biofilm formation ability of clinical and laboratory-evolved colistin-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 153, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00153>.
- [7] B. Cai, R. Echols, G. Magee, J.C. Arjona Ferreira, G. Morgan, M. Ariyasu, T. Sawada, T.D. Nagata, Prevalence of carbapenem-resistant gram-negative infections in the United States predominated by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Open Forum Infect. Dis.* 3 (2017) 4, <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx176>.
- [8] J. Rodríguez-Baño, S. Martí, S. Soto, F. Fernández-Cuenca, J.M. Cisneros, J. Pachón, A. Pascual, L. Martínez-Martínez, C. McQueary, L.A. Actis, J. Vila, Spanish Group for the Study of Nosocomial Infections (GEIH), Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications, *Clin. Microbiol. Infect.* 14 (2008) 276–278, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01916.x>.
- [9] M. Bogdan, D. Drenjancevic, I. Harsanji Drenjancevic, B. Bedenic, V. Zujic Atalic, J. Talapko, D. Vukovic, In vitro effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on the biofilm formation ability of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, *J. Chemother.* 30 (2018) 16–24, <https://doi.org/10.1080/1120009X.2017.1378835>.
- [10] K. Lee, S.S. Yoon, *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness, *J. Microbiol. Biotechnol.* 27 (2017) 1053–1064, <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11056>.
- [11] X. Chen, X. Meng, Q. Gao, G. Zhang, H. Gu, X. Guo, Meropenem selection induced overproduction of the intrinsic carbapenemase as well as phenotype divergence in *Acinetobacter baumannii*, *Int. J. Antimicrob. Agents* 50 (2017) 419–426, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.04.015>.
- [12] S.P. Bernier, M.G. Surette, Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments, *Front. Microbiol.* 4 (2013) 20, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00020>.
- [13] J. Davies, G.B. Spiegelman, G. Yim, The world of subinhibitory antibiotic concentrations, *Curr. Opin. Microbiol.* 9 (2006) 445–453, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.006>.
- [14] P. Gupta, S. Chhibber, K. Harjai, Subinhibitory concentration of ciprofloxacin targets quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa* causing inhibition of biofilm formation & reduction of virulence, *Indian J. Med. Res.* 143 (2016) 643–651, <https://doi.org/10.4103/0971-5916.187114>.
- [15] L.R. Hoffman, D.A. D'Argenio, M.J. MacCoss, Z. Zhang, R.A. Jones, S.I. Miller, Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation, *Nature* 436 (2005) 1171–1175, <https://doi.org/10.1038/nature03912>.
- [16] A.R. Hauser, *Pseudomonas aeruginosa*: so many virulence factors, so little time, *Crit. Care Med.* 39 (2011) 2193–2194, <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318221742d>.
- [17] G.W. Lau, D.J. Hassett, H. Ran, F. Kong, The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection, *Trends Mol. Med.* 10 (2004) 599–606, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>.
- [18] L. Allen, D.H. Dockrell, T. Patterly, D.G. Lee, P. Cornelis, P.G. Hellewell, M.K. Whyte, Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo, *J. Immunol.* 174 (2005) 3643–3649, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3643>.
- [19] E. Kipnis, T. Sawa, J. Wiener-Kronish, Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis, *Med. Maladies Infect.* 36 (2006) 78–91, <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.10.007>.
- [20] Y.Q. O'Malley, K.J. Reszka, D.R. Spitz, G.M. Denning, B.E. Britigan, *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 287 (2004) L94–L103, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00025.2004>.
- [21] H. Oura, Y. Tashiro, M. Toyofuku, K. Ueda, T. Kiyokawa, S. Ito, Y. Takahashi, S. Lee, H. Nojiri, T. Nakajima-Kambe, H. Uchiyama, H. Futamata, N. Nomura, Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility by 1-naphthol and other bicyclic compounds bearing hydroxyl groups, *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (2015) 2808–2818, <https://doi.org/10.1128/AEM.04220-14>.
- [22] D.G. Ha, S.L. Kuchma, G.A. O'Toole, Plate-based assay for swimming motility in *Pseudomonas aeruginosa*, *Methods Mol. Biol.* 1149 (2014) 59–65, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_7.
- [23] C.M. Harding, S.W. Hennon, M.F. Feldman, Uncovering the mechanisms of

- Acinetobacter baumannii* virulence, Nat. Rev. Microbiol. 16 (2018) 91–102, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>.
- [24] I. Biswas, A. Machen, J. Mettlach, In vitro motility assays for *acinetobacter* species, Methods Mol. Biol. (2019) 177–187, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9118-1_17 1946.
- [25] P. Cornejo-Juárez, D. Vilar-Compte, C. Pérez-Jiménez, S.A. Namendys-Silva, S. Sandoval-Hernández, P. Volkow-Fernández, The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit, Int. J. Infect. Dis. 31 (2015) 31–34, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.12.022>.
- [26] M.H. Safdar, H. Hasan, S. Afzal, T. Hussain, Exploring promising immunomodulatory potential of natural and synthetic 1,3-Diphenyl-2-propen-1-one analogs: a review of mechanistic insight, Mini Rev. Med. Chem. 18 (2018) 1047–1063, <https://doi.org/10.2174/1389557517666171123212039>.
- [27] J. Wu, C. Wang, Y. Cai, J. Peng, D. Liang, Y. Zhao, S. Yang, X. Li, X. Wu, G. Liang, Synthesis and crystal structure of chalcones as well as on cytotoxicity and antibacterial properties, Med. Chem. Res. 21 (2012) 444–452, <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9549-9>.
- [28] T.D. Tran, T.H. Do, N.C. Tran, T.D. Ngo, T.N. Huynh, C.D. Tran, K.M. Thai, Synthesis and anti Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity of substituted chalcones alone and in combination with non-beta-lactam antibiotics, Bioorg. Med. Chem. Lett 22 (2012) 4555–4560, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.05.112>.
- [29] D.D. Bozic, M. Milenkovic, B. Ivkovic, I. Cirkovic, Newly-synthesized chalcones-inhibition of adherence and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Braz. J. Microbiol. 45 (2014) 263–270, <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000100038>.
- [30] R. Kant, D. Kumar, D. Agarwal, R.D. Gupta, R. Tilak, S.K. Awasthi, A. Agarwal, Synthesis of newer 1,2,3-triazole linked chalcone and flavone hybrid compounds and evaluation of their antimicrobial and cytotoxic activities, Eur. J. Med. Chem. 113 (2016) 34–49, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.041>.
- [31] O.A. Fadare, D.A. Akinpelu, H. Ejemubu, C.A. Obafemi, 1-Indanone chalcones and their 2,4-Dinitrophenylhydrazones derivatives: synthesis, physicochemical properties and in vitro antibacterial activity, Afr. J. Pure Appl. Chem. 8 (2014) 68–77, <https://doi.org/10.5897/AJPAC2014.0558>.
- [32] M.Z. Gibson, M.A. Nguyen, S.K. Zingales, Design, synthesis, and evaluation of (2-pyridinyl)methylene-1-tetralone chalcones for anticancer and antimicrobial activity, Med. Chem. 14 (2018) 333–343, <https://doi.org/10.2174/1573406413666171020121244>.
- [33] CLSI, Clinical and laboratory standards institute, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Tenth Edition vol. 32, CLSI document M07–A10, Wayne, PA; USA, 2015.
- [34] NCCLS, National Committee For Clinical Laboratory Standards, Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline, NCCLS document M26-A, Wayne, PA; USA, 1999.
- [35] G. Orhan, A. Bayram, Y. Zer, I. Balci, Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*, J. Clin. Microbiol. 43 (2005) 140–143, <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.140-143.2005>.
- [36] M.B. Marques, E.S. Brookings, S.A. Moser, P.B. Sonke, K.B. Waites, Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations, Antimicrob. Agents Chemother. 41 (1997) 881–885.
- [37] G. Rampioni, G. Giallonardi, F. D'Angelo, L. Leoni, A coculture-based approach for screening campaigns aimed at identifying novel *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibitors, Methods Mol. Biol. 1673 (2018) 287–296, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7309-5_22.
- [38] S.S. Pattnaik, S. Ranganathan, D.R. Amasala, A. Syed, F. Ameen, S. Busi, Attenuation of quorum sensing regulated virulence and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Diaporthe phaseolorum SSP12, Microb. Pathog. 118 (2018) 177–189, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.031>.
- [39] C.M. Harding, E.N. Tracy, M.D. Carruthers, P.N. Rather, L.A. Actis, R.S. Munson Jr., *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility, mBio 4 (2013), <https://doi.org/10.1128/mBio.00360-13> e00360-13.
- [40] S. Stepanović, D. Vuković, V. Hola, G. Di Bonaventura, S. Djukic, I. Čirković, F. Ruzicka, Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci, APMIS 115 (2007) 891–899, https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
- [41] J.K. Knobloch, M.A. Horstkothe, H. Rohde, D. Mack, Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*, Med. Microbiol. Immunol. 191 (2002) 101–106, <https://doi.org/10.1007/s00430-002-0124-3>.
- [42] S. Stepanovic, D. Vukovic, I. Dakic, B. Savic, M. Svabic-Vlahovic, A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, J. Microbiol. Methods 40 (2000) 175–179, [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6).
- [43] J. Ramírez-Prada, S.M. Robledo, I.D. Vélez, M.D.P. Crespo, J. Quiroga, R. Abonia, A. Montoya, L. Svetaz, S. Zacchino, B. Insuasti, Synthesis of novel quinoline-based 4,5-dihydro-1H-pyrazoles as potential anticancer, antifungal, antibacterial and antiprotozoal agents, Eur. J. Med. Chem. 131 (2017) 237–254, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.016>.
- [44] O. Dammene Debbih, A. Sid, R. Bouchene, S. Bouacida, W. Mazouz, N. Gherraf, Two hydrazones derived from 1-aryl-3-(p-substituted phenyl)prop-2-en-1-one: synthesis, crystal structure, Hirshfeld surface analysis and in vitro biological properties, Acta Crystallogr. C. Struct. Chem. 74 (2018) 703–714, <https://doi.org/10.1107/S20532296180006812>.
- [45] T.O. Ajiboye, F.Z. Haliru, Redox and respiratory chain related alterations in the lophirones B and C-mediated bacterial lethality, Microb. Pathog. 100 (2016) 95–111, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.027>.
- [46] J.H. Tomma, M.S. Khazaal, R.K. Baker, Synthesis, characterization and antibacterial activity of new chalcones derived from new aldehyde; 4-[5-(4'-tolyl)-1,3,4-thiadiazole-2-yl] benzaldehyde, ibn Al-haitham jour, for Pure & Appl. Sci. 30 (2017) 68–76, <https://doi.org/10.30526/30.3.1603>.
- [47] Z. Nowakowska, A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones, Eur. J. Med. Chem. 42 (2007) 125–137, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.09.019>.
- [48] G.A. Pankuch, G. Lin, H. Seifert, P.C. Appelbaum, Activity of meropenem with and without ciprofloxacin and colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, Antimicrob. Agents Chemother. 52 (2008) 333–336, <https://doi.org/10.1128/AAC.00689-07>.
- [49] K. Lee, M.N. Kim, J.S. Kim, H.L. Hong, J.O. Kang, J.H. Shin, Y.J. Park, D. Yong, S.H. Jeong, Y. Chong, KONSAR group, Further increases in carbapenem-, amikacin-, and fluoroquinolone-resistant isolates of *Acinetobacter* spp. and *P. aeruginosa* in Korea: KONSAR study 2009, Yonsei Med. J. 52 (2011) 793–802, <https://doi.org/10.3349/ymj.2011.52.5.793>.
- [50] D.D. Božić, M. Milenković, B. Ivković, I. Čirković, Antibacterial activity of three newly-synthesized chalcones & synergism with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Indian J. Med. Res. 140 (2014) 130–137.
- [51] M.C. Jaramillo, C. Mora, L.E. Vélez, J. Quijano, Kinetic and theoretical study of the chalcones as inhibitors of beta-lactamase enzyme, Med. Chem. 5 (2009) 434–439, <https://doi.org/10.2174/157340609789117895>.
- [52] R. López-Rojas, Y. Smani, J. Pachón, Treating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection by blocking its virulence factors, Expert Rev. Anti Infect. Ther. 11 (2013) 231–233, <https://doi.org/10.1586/eri.13.11>.
- [53] S. Hall, C. McDermott, S. Anoopkumar-Dukie, A.J. McFarland, A. Forbes, A.V. Perkins, A.K. Davey, R. Chess-Williams, M.J. Kiefel, D. Arora, G.D. Grant, Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*, Toxins 8 (2016) 236, <https://doi.org/10.3390/toxins8080236>.
- [54] M.F. Moradali, S. Ghods, B.H. Rehm, *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence, Front. Cell. Infect. Microbiol. 7 (2017) 39, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>.
- [55] D.B. Kearns, A field guide to bacterial swarming motility, Nat. Rev. Microbiol. 8 (2010) 634–644, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>.
- [56] I. Sampedro, R.E. Parales, T. Krell, J.E. Hill, *Pseudomonas* chemotaxis, FEMS Microbiol. Rev. 39 (2015) 17–46, <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12081>.
- [57] M. Chatterjee, S. D'Morris, V. Paul, S. Warriar, A.K. Vasudevan, M. Vanuopadath, S.S. Nair, B. Paul-Prasanth, C.G. Mohan, R. Biswas, Mechanistic understanding of Phenylacetic acid mediated inhibition of quorum sensing and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 101 (2017) 8223–8236, <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8546-4>.
- [58] C.T. O'Loughlin, L.C. Miller, A. Siryaporn, K. Drescher, M.F. Semmelhack, B.L. Bassler, A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110 (2013) 17981–17986, <https://doi.org/10.1073/pnas.1316981110>.
- [59] F.M. Husain, I. Ahmad, M.S. Khan, N.A. Al-Shabib, *Trigonella foenum-graceum* (seed) extract interferes with quorum sensing regulated traits and biofilm formation in the strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*, evid. Based complement, Altern. Med. (2015) 879540, <https://doi.org/10.1155/2015/879540>.
- [60] O.M. Vandeputte, M. Kienrebeogo, T. Rasamiravaka, C. Stévigny, P. Duez, S. Rajaonson, B. Diallo, A. Mol, M. Baucher, M. El Jaziri, The flavanone naringenin reduces the production of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, Microbiology 157 (2011) 2120–2132, <https://doi.org/10.1099/mic.0.049338-0>.
- [61] J. Rajkumari, S. Busi, A.C. Vasu, P. Reddy, Facile green synthesis of baicalein fabricated gold nanoparticles and their antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, Microb. Pathog. 107 (2017) 261–269, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.044>.
- [62] E. Noumi, M. Snoussi, A. Merghni, F. Nazzaro, G. Quindós, G. Akdamar, M. Mastouri, A. Al-Sieni, O. Ceylan, Phytochemical composition, anti-biofilm and anti-quorum sensing potential of fruit, stem and leaves of *Salvadora persica* L. methanolic extracts, Microb. Pathog. 109 (2017) 169–176, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.036>.
- [63] I.Y. Na, E.S. Chung, C.Y. Jung, D.H. Kim, J. Shin, K. Kang, S.T. Kim, K.S. Ko, Comparison of the virulence-associated phenotypes of five species of *Acinetobacter baumannii* complex, J. Microbiol. Biotechnol. 26 (2016) 171–179, <https://doi.org/10.4014/jmb.1507.07076>.
- [64] R.A. Gabrilska, K.P. Rumbaugh, Biofilm models of polymicrobial infection, Future Microbiol. 10 (2015) 1997–2015, <https://doi.org/10.2217/fmb.15.109>.
- [65] J. Azeredo, N.F. Azevedo, R. Briandet, N. Cerca, T. Coenye, A.R. Costa, M. Desvaux, G. Di Bonaventura, M. Hébraud, Z. Jaglic, M. Kačániová, S. Knöchel, A. Lourenço, F. Mergulhão, R.L. Meyer, G. Nychas, M. Simões, O. Tresse, C. Sternberg, Critical review on biofilm methods, Crit. Rev. Microbiol. 43 (2017) 313–351, <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>.
- [66] Y.Q. Xiong, A. Estellés, L. Li, W. Abdelhady, R. Gonzales, A.S. Bayer, E. Tenorio, A. Leighton, S. Ryser, L.M. Kauvar, A human biofilm-disrupting monoclonal antibody potentiates antibiotic efficacy in rodent models of both *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii* infections, Antimicrob. Agents Chemother. 61 (2017), <https://doi.org/10.1128/AAC.00904-17> e00904-e00917.
- [67] Y. Wang, X. Wu, J. Chen, R. Amin, M. Lu, B. Bhayana, J. Zhao, C.K. Murray, M.R. Hamblin, D.C. Hooper, T. Dai, Antimicrobial blue light inactivation of gram-negative pathogens in biofilms: in vitro and in vivo studies, J. Infect. Dis. 213 (2016) 1380–1387, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv070>.
- [68] D. Pletzer, R.E. Hancock, Antibiofilm peptides: potential as broad-spectrum agents, J. Bacteriol. 198 (2016) 2572–2578, <https://doi.org/10.1128/JB.00017-16>.

- [69] B. Gökalsın, B. Aksoydan, B. Erman, N.C. Sesal, Reducing virulence and biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* by potential quorum sensing inhibitor carotenoid: zeaxanthin, *Microb. Ecol.* 74 (2017) 466–473, <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0949-3>.
- [70] D. Kunthalert, S. Baothong, P. Khetkam, S. Chokchaisiri, A. Suksamrarn, A chalcone with potent inhibiting activity against biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*, *Microbiol. Immunol.* 58 (2014) 581–589, <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12194>.
- [71] M.R. Ranieri, C.B. Whitchurch, L.L. Burrows, Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials, *Curr. Opin. Microbiol.* 45 (2018) 164–169, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.07.006>.

Methoxy-Substituted Hydroxychalcone Reduces Biofilm Production, Adhesion and Surface Motility of *Acinetobacter baumannii* by Inhibiting *ompA* Gene Expression

Dušan Ušjak,^a Miroslav Dinić,^b Katarina Novović,^b Branka Ivković,^c Nenad Filipović,^d Magdalena Stevanović,^d and Marina T. Milenković^{*,a}

^a Department of Microbiology and Immunology, University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia, e-mail: marinama@pharmacy.bg.ac.rs

^b Laboratory for Molecular Microbiology, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444/a, 11010 Belgrade, Serbia

^c Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

^d Institute of Technical Sciences of the Serbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35/IV, 11000 Belgrade, Serbia

An increasing lack of available therapeutic options against *Acinetobacter baumannii* urged researchers to seek alternative ways to fight this extremely resistant nosocomial pathogen. Targeting its virulence appears to be a promising strategy, as it offers considerably reduced selection of resistant mutants. In this study, we tested antibiofilm potential of four synthetic chalcone derivatives against *A. baumannii*. Compound that showed the greatest activity was selected for further evaluation of its antivirulence properties. Real-time PCR was used to evaluate mRNA expression of biofilm-associated virulence factor genes (*ompA*, *bap*, *abaI*) in treated *A. baumannii* strains. Also, we examined virulence properties related to the expression of these genes, such as fibronectin- and collagen-mediated adhesion, surface motility, and quorum-sensing activity. The results revealed that the expression of all tested genes is downregulated together with the reduction of adhesion and motility. The conclusion is that 2'-hydroxy-2-methoxychalcone exhibits antivirulence activity against *A. baumannii* by inhibiting the expression of *ompA* and *bap* genes, which is reflected in reduced biofilm formation, adhesion, and surface motility.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, chalcones, virulence factors, polymerase chain reaction, gene expression.

Introduction

Acinetobacter baumannii is recognized as one of the most troublesome nosocomial pathogens, due to its outstanding ability to rapidly develop antimicrobial resistance and to persist in wide range of environmental conditions.^[1] Extreme tolerance to desiccation and formation of highly recalcitrant biofilms provide *A. baumannii* potential to survive for extended periods on hospital surfaces, materials, and medical devices,

thus promoting hospital outbreaks and epidemics.^[2] The ever-increasing number of extensively drug-resistant (XDR) isolates, resistant to carbapenems, as well as emergence of pandrug-resistant (PDR) strains, emphasizes the indisputable need for discovery and development of new therapeutic strategies.^[3] One such strategy that is being investigated deals with targeting of the *A. baumannii* virulence factors, which provides possibility to disarm pathogens, while minimally affecting their growth, thereby generating much weaker selection of resistant mutants.^[4,5]

Besides the well-known resistance to desiccation and an ability of biofilm formation that mediate the so-called 'persist and resist' strategy of virulence, there

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000786>

are now numerous recognized virulence factors in *A. baumannii*.^[6] These include adherence mechanisms, motility, siderophore-mediated iron acquisition systems, activities of polysaccharide membrane and outer membrane protein phospholipases, alteration in penicillin-binding proteins (PBPs), outer membrane vesicles (OMVs), and mechanisms of immune evasion.^[7] Of the particular interest is outer membrane protein A (OmpA), the most abundant protein in outer membrane of *A. baumannii*, with well-characterized virulence involvement.^[8] OmpA promotes bacterial adherence and invasion, as well as subsequent apoptosis of host epithelial cells, partially by acting as a major fibronectin binding ligand.^[9–11] Additionally, this protein induces the biogenesis of cytotoxic OMVs, thus further enhancing host cell apoptosis.^[12,13] Also, OmpA contributes to the resistance, survival, and persistence of *A. baumannii*, by promoting immune evasion, biofilm formation, surface motility, and multi-drug resistance.^[8,14–17] Biofilm-associated protein (Bap) is another large outer membrane protein that enables formation of fully mature biofilms and increases adherence to human cells,^[18,19] whose inhibition was shown to diminish the virulence potential of *A. baumannii*.^[20] Finally, the quorum-sensing (QS) system in *A. baumannii*, consisting of auto-inducer synthase (AbaI), acyl-homoserine lactone (AHL) signal molecules, and AbaR receptor,^[21] was also shown to influence the expression of virulence factors such as biofilm formation^[22] and surface motility.^[16] Moreover, the attenuated virulence in a zebrafish infection model was demonstrated for *abal* deficient mutants.^[23]

Chalcones are natural compounds with simple common chemical scaffold 1,3-diaryl-2-propen-1-one (chalconoid), which can be found in fruits, vegetables, spices, teas, and other products of some plant species.^[24] A wide variety of biological and pharmacological activities of chalcones have been observed. These include antioxidant properties, anti-inflammatory effects, chemopreventive and cytotoxic activities,

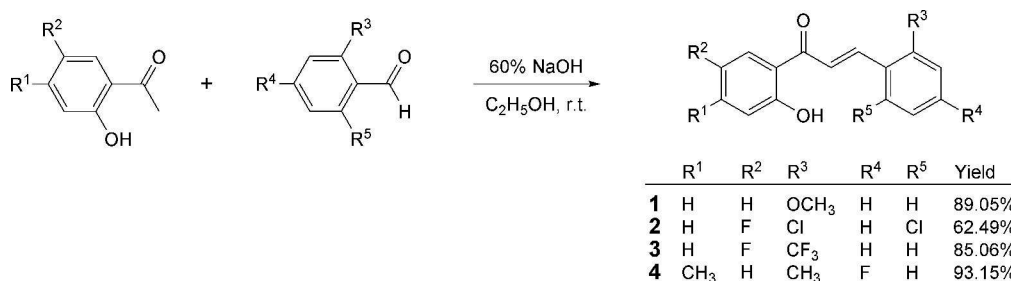
anti-hyperglycemic and hypolipidemic activities, cardioprotective and neuroprotective effects, antibacterial, antifungal, antiviral, and antiparasitic activities, and many others.^[25–27] In addition to natural isolation, chalcones can be obtained by chemical synthesis that allows construction of compounds with targeted activity and minimal side effects.^[25,28] In that sense, a variety of synthetic chalcones were screened for antimicrobial activity and lots of them showed great potential in this respect.^[29]

In our recent study, we had demonstrated that among the four differently substituted 2'-hydroxychalcones, 2-methoxy substituted derivative is the most active in inhibition of bacterial biofilm production.^[30] For the purpose of this study, we synthesized two differently substituted 5'-fluoro-2'-hydroxychalcones and one 2'-hydroxy-4'-methylchalcone, and tested their antibiofilm potential, along with 2'-hydroxy-2-methoxychalcone from previous study, against *A. baumannii*. Further, since the biofilm production itself is not associated with *A. baumannii* virulence, we selected compound that exhibited greatest antibiofilm activity for examination of its influence on biofilm-related virulence factors. We monitored expression levels of biofilm-associated virulence factor genes, as well as fibronectin- and collagen-mediated adhesion, surface motility, and QS activity of *A. baumannii* strains treated with the selected chalcone compound. Also, we examined crystallinity and thermal properties of this compound to get better insights into its stability, solubility, and bioavailability.

Results

Synthesis

Compounds **1–4** were obtained by base-catalyzed Claisen-Schmidt condensation (*Scheme 1*) in the form of yellow colored powders. Their structures were verified by Fourier-transform infrared (FT-IR), ¹H-NMR,



Scheme 1. Synthesis of compounds **1–4**.

^{13}C -NMR and ^{19}F -NMR spectroscopy techniques, and high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HR-ESI-MS). NMR spectra are provided in the *Supporting Information*.

Antibiofilm Activity of Compounds 1–4

Compounds **1–4** were screened for antibiofilm activity against *A. baumannii* reference strain and wound isolate at concentration of $70\ \mu\text{g ml}^{-1}$ (*Supplementary Figure S1*). Significant activity against *A. baumannii* ATCC 19606 was exhibited by compounds **1**, **2**, and **4**. However, only compound **1** significantly inhibited production of biofilm in *A. baumannii* wound isolate. Subsequently, we selected compound **1** for further examination of crystallinity, thermal characteristics, and biofilm-associated virulence factor genes expression. Also, we evaluated its biofilm inhibitory activity at $35\ \mu\text{g ml}^{-1}$ and $10\ \mu\text{g ml}^{-1}$ and revealed dose-dependent influence. Whereas concentration of $35\ \mu\text{g ml}^{-1}$ still yielded significant biofilm inhibition in both strains, concentration of $10\ \mu\text{g ml}^{-1}$ had little effect.

Crystallinity and Thermal Properties of Compound 1

To further examine the structure and properties of compound **1**, we employed X-ray diffraction (XRD), microscopy, and thermal analyses. Based on the numerous sharp peaks, observed from the XRD pattern (*Figure 1B*), the sample possesses a highly crystalline nature which is also confirmed by optical microscopy (*Figure 1A*). The most intense reflections of the incident beam were detected at the following 2θ angles: 26.25 and 24.85 along with a triplet in the interval 14.05–15.4. Regarding the investigation of thermal stability, based on the data obtained from thermogravimetric differential thermal analysis (TGA/DTA; *Figure 1C*), it can be concluded that the sample is stable up to 250°C , after which it goes through the rapid weight loss of about 90%. The combustion of remaining decomposition products took place at around 490°C , which could be also noticed as a big exothermic peak on the DTA signal. Differential scanning calorimetry (DSC) further revealed that two endothermic events took place (*Figure 1D*). The first one has a substantially lower intensity and the second one clearly represents the melting of the sample with a detected melting

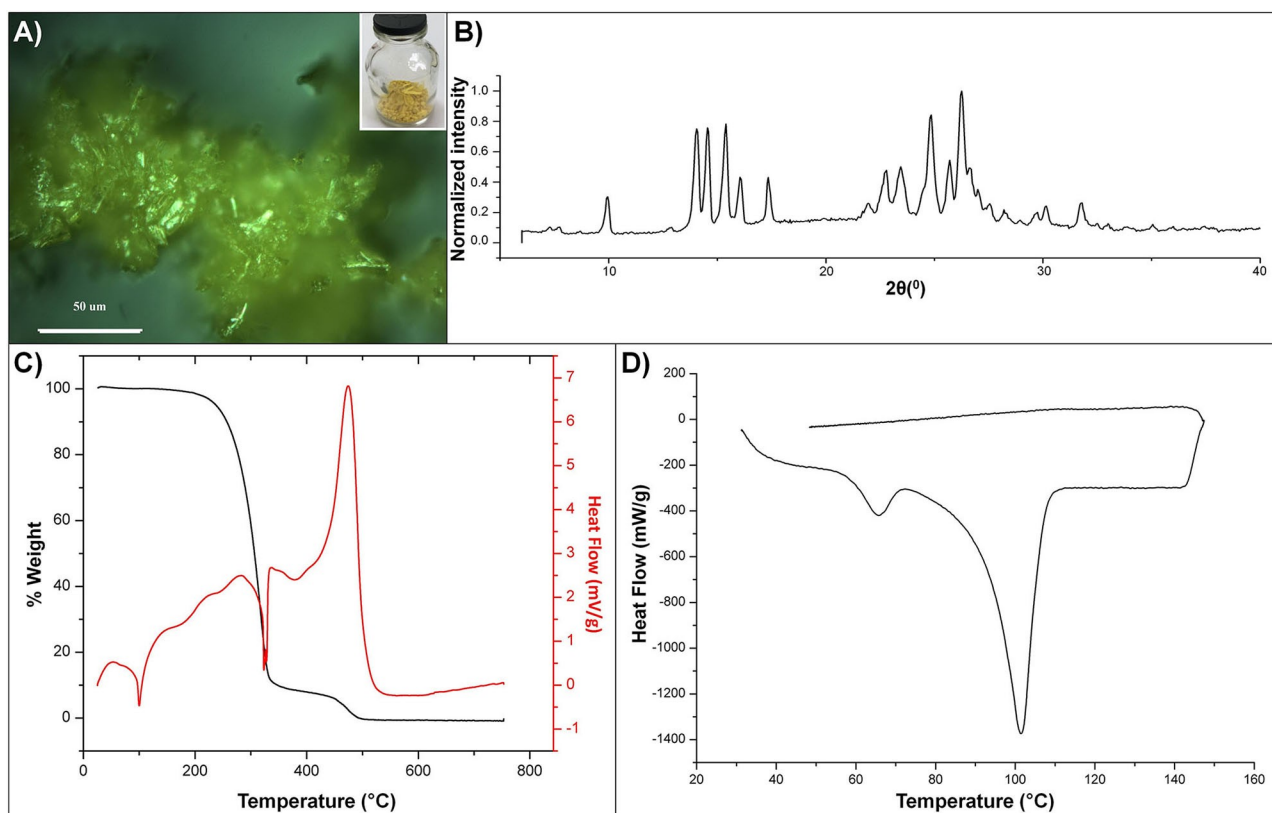


Figure 1. Crystallinity and thermal properties of compound **1**. (A) Microscopic and macroscopic evaluation, (B) XRD, (C) TGA/DTA, (D) DSC.

temperature of 101.4 °C. The first peak occurs around 66 °C and it could be attributed to the removal of adsorbed moisture. However, the TGA signal did not record any weight loss in this region, thus it is possible that this peak corresponds to some structural changes and arrangement of molecular conformation. The molecular conformation of chalcone is influenced by the intramolecular forces, and based on the composition of the sample presented here, results obtained from FT-IR spectroscopy, and XRD, there is more than one conformation present in the sample.

The Expression of *ompA*, *bap*, and *abal* Genes is Down-regulated by Compound **1**

The mRNA expression, influenced by compound **1** at decreasing sub-minimum inhibitory concentrations (sub-MICs) from 70 to 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, was investigated for several biofilm-associated virulence factor genes of *A. baumannii* (Figure 2). Remarkably, all the tested genes exhibited significant downregulation of the expression by all tested concentrations. The mRNA level of *ompA*, which encodes a protein involved in numerous virulence-associated traits of *A. baumannii*, was dose-dependently decreased in both tested strains. Most notably, 1.58-fold and 1.85-fold downregulation was achieved at concentration of 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in strains

ATCC 19606 and 766, respectively. Interestingly, the reduction of mRNA level of *Bap*-encoding gene was greater when using lower concentrations. In particular, its expression was almost twofold reduced in *A. baumannii* ATCC 19606 by compound **1** at 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Finally, mRNA expression of *abal*, a gene that encodes auto-inducer synthase, an essential component of *A. baumannii* QS system, was decreased in *A. baumannii* ATCC 19606, but also in a reverse dose-dependent manner. The expression of this gene was not detected in strain 766.

Compound **1** Inhibits Fibronectin- and Collagen-Mediated Binding of *A. baumannii*

The adherence ability of *A. baumannii* strains treated with compound **1** was evaluated through fibronectin- and collagen-binding affinity. *A. baumannii* ATCC 19606 exhibited much higher binding affinity to both of these extracellular matrix (ECM) proteins, in comparison to the wound isolate (Figure 3B and 3C). Strikingly, the cells of the standard strain were almost completely deprived of the binding ability to both fibronectin and collagen, when incubated in the presence of compound **1** at 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The binding affinity of this strain was substantially reduced by compound **1** at other two tested concentrations as

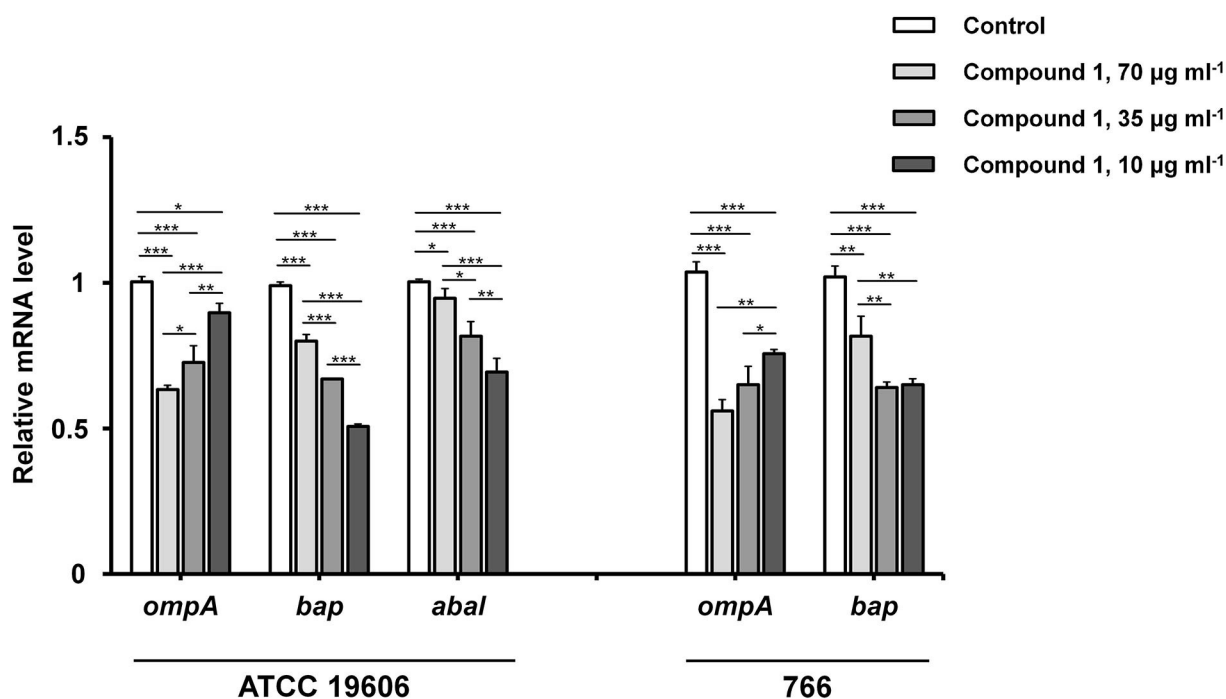


Figure 2. The mRNA expression of *ompA*, *bap*, and *abal* genes in *A. baumannii* treated with different concentrations of compound **1**. Data are presented as mean values of three experiments (\pm SD). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to the control group.

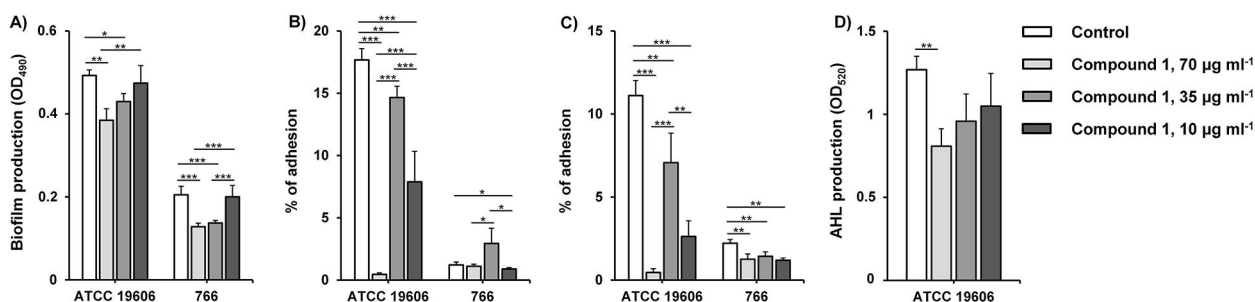


Figure 3. Comparisons between control and treated groups of *A. baumannii* ATCC 19606 and *A. baumannii* 766. (A) Biofilm production, represented as OD values of the extracted safranin dye at 490 nm, (B) Fibronectin- and (C) Collagen-binding ability represented as the percentage of bound bacterial cells, and (D) AHL production, measured as OD values of dark brown colored ferric hydroxamate complexes at 520 nm. Data are presented as mean values of three experiments (\pm SD). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to the control group.

well. In the case of *A. baumannii* 766, however, only the collagen-binding affinity was significantly reduced by compound **1** at all tested sub-MICs.

Surface Motility of *A. baumannii* Wound Isolate is Inhibited by Compound **1**

Surface motility was not exhibited by *A. baumannii* ATCC 19606, thus only *A. baumannii* 766 was used for the evaluation of antimotility activity of compound **1**. The surface motility of *A. baumannii* 766 was considerably inhibited by compound **1** at 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 35 $\mu\text{g ml}^{-1}$, while the lowest tested concentration had no effect, since the surface of entire plate was covered as in the case of untreated control (Figure 4). Comparison of migration areas revealed that the treatment with 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ resulted in 150.16 mm² of covered surface area, which is less compared to the extent of migration exhibited by bacteria treated with 35 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (229.94 mm²), indicating the existence of dose-dependent activity.

Compound **1** Reduces AHL Secretion in *A. baumannii* ATCC 19606

Since the expression of Abal-encoding gene was not detected in *A. baumannii* wound isolate, we evaluated the influence of compound **1** on AHL production only in strain ATCC 19606. The results revealed that the production is reduced by compound **1**, at all tested concentrations, in a dose-dependent manner (Figure 3D). However, significant reduction was achieved only with 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$, which inhibited AHL secretion by 36.22%.

A. baumannii Growth is not Affected by Tested Sub-MICs of Compound **1**

In order to demonstrate that investigated sub-MICs (70 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 35 $\mu\text{g ml}^{-1}$, and 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) of compound **1** do not affect *A. baumannii* growth, we measured bacterial cell growth at five different time points. According to constructed growth curves (Supplementary Figure S2), it can be concluded that tested concentrations do not inhibit *A. baumannii* growth. Subsequently, it is reasonable to consider that potential inhibition of virulence by compound **1** will not enhance selection of resistant mutants, i.e., compound

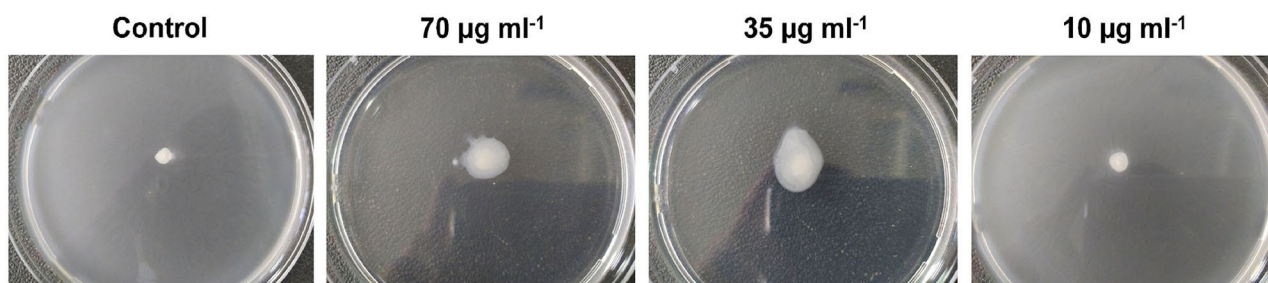


Figure 4. Surface motility of *A. baumannii* 766 treated with decreasing sub-MICs of compound **1** compared to untreated control.

1 at selected concentrations is an appropriate antivirulence drug candidate.

Discussion

So far, myriad of chalcone structures have displayed efficient antibacterial activities against both Gram-positive and Gram-negative species (aerobic or anaerobic), *Mycobacterium tuberculosis*, and other resilient genera.^[29,31] Besides the substantially efficient growth inhibition activities, with MICs reaching the values below $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ in some cases,^[32,33] several antivirulence properties of chalcones have also been documented, including the inhibition of biofilm formation, glycocalyx production, motility, and adhesion,^[30,34,35] the quorum-quenching activity,^[36] inhibition of certain genes' expression and bacterial toxin production,^[37] and inhibition of the efflux pumps.^[38–40]

Biofilm formation in *A. baumannii* is responsible for colonization of abiotic and biotic surfaces, including medical devices and host tissues, thus enabling the persistence and spreading of infection in hospital settings.^[6,15] Besides, increased resistance or tolerance of biofilm-associated *A. baumannii* cells to antimicrobial drugs, including carbapenems, aminoglycosides, and colistin, has been documented in several studies.^[41–43] Also, *A. baumannii* biofilm formation was shown to contribute to the immune evasion,^[44] and could be related to several other virulence properties, perhaps at the level of gene expression. Earlier, we demonstrated that a synthetic 2-methoxy substituted 2'-hydroxychalcone has the greatest antibiofilm activity in comparison to other tested variously substituted 2'-hydroxychalcones.^[30] For the purpose of this study, we synthesized three new chalcones (compounds **2–4**) and compared their antibiofilm activity to that of 2'-hydroxy-2-methoxychalcone (compound **1**). One of the newly-synthesized compounds was derivative of 2'-hydroxy-4'-methylchalcone, while the remaining two were derivatives of 5'-fluoro-2'-hydroxychalcone. Still, the best activity was exhibited by 2'-hydroxy-2-methoxychalcone, possibly due to the presence of methoxy group, considering that potentiating effect of methoxy group on antibiofilm activity is known from some previous studies.^[45,46] We therefore selected this compound for further investigation of its antivirulence properties. To demonstrate that this chalcone is not just a potent antibiofilm agent, we tested its influence on several important biofilm-associated virulence factor genes of *A. baumannii*. All of the tested biofilm-associated genes exhibited significant downregulation;

however, the most notable finding is significant inhibition of *ompA* gene expression. As described previously, OmpA is a protein which can induce adherence and invasion of bacteria to human epithelial cells, and trigger host cell apoptosis, promote antimicrobial resistance, inhibit the alternative complement pathway, and induce the biogenesis of cytotoxic OMVs, biofilm formation, and surface motility.^[1,8] The combination of these features results in a strain that is much more virulent and associated with higher morbidity and mortality rates in infected patients. Recent study has demonstrated that bacteremic or non-bacteremic pneumonia-causing strains express much higher levels of *ompA* compared to colonizing non-pathogenic strains. Multivariate analysis, performed within the latter study, further showed that *ompA* expression is an independent risk factor for pneumonia, bacteremia, and mortality in *A. baumannii* infected patients. Additionally, the same study demonstrated a substantial role of OmpA in mortality and dissemination of infection in a murine peritoneal sepsis model.^[47]

In order to demonstrate the potential *ompA*-dependent antivirulence activity of compound **1**, we decided to further evaluate phenotypic features associated with this gene, such as adhesion and motility. ECM proteins are important mediators in bacterial adhesion to host tissues, and *A. baumannii* displays high affinity binding to these proteins, including fibronectin and collagen.^[48] Furthermore, it was shown that OmpA plays a significant role in fibronectin-mediated adhesion.^[11] Therefore, we tested fibronectin- and collagen-mediated binding affinity of *A. baumannii*, and found that it is considerably reduced by compound **1**. Only the fibronectin binding of *A. baumannii* wound isolate was not significantly affected, most likely due to generally weaker ECM-binding affinity exhibited by this strain. Fibronectin-associated anti-adherence properties of similar chalcone compounds were previously demonstrated against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).^[34] Also, comparable results were reported for AOA-2, a cyclic hexapeptide that was shown to inhibit the adhesion of *A. baumannii* strain ATCC 17978 to A549 cells. This peptide, also a potent biofilm inhibitor, was further tested *in vivo*, in a peritoneal sepsis murine model, where it succeeded to significantly reduce spleen and lung bacterial loads, and to decrease mortality. Most importantly, the authors have demonstrated that AOA-2 interact with OmpA protein.^[49]

Two independent forms of motility have been described in *A. baumannii*: twitching and surface motility.^[6] Although, the role of motility in virulence of *A. baumannii* is still not well established, there are some observations that indicate its potential contribution to the increased virulence. For example, a hypermotile variant of *A. baumannii* ATCC 17978 strain with disrupted *hns*-like gene displayed increased virulence potential in the *Caenorhabditis elegans* infection model.^[50] Similarly, several isolated rifampin-resistant *A. baumannii* ATCC 17978 *rpoB* mutants showed defective surface motility and attenuated phenotype in *C. elegans* fertility model.^[51] According to Clemmer *et al.*,^[16] the expression of *ompA* is linked to the surface motility of *A. baumannii*, therefore, we tested the impact of compound **1** on this type of motility. Unluckily, *A. baumannii* ATCC 19606 is a non-motile strain,^[52] so it could not be used for evaluation of antimotility activity. However, surface motility of *A. baumannii* wound isolate was considerably inhibited by compound **1**. The QS system is also involved in surface motility of *A. baumannii*, but since the expression of *abal* was not detected in wound isolate, it could be assumed that impaired motility is related to the inhibition of *ompA* expression. Interestingly, two recent studies showed that honokiol, magnolol, and curcumin, which are plant products same as chalcones, also co-inhibit biofilm formation and surface motility in *A. baumannii* ATCC 17978 strain. These studies further demonstrated increased survival of *C. elegans* nematodes infected with treated strains in comparison to positive controls. Consequently, these results provide additional evidence that impaired biofilm formation and surface motility in *A. baumannii* strains result in reduced virulence *in vivo*.^[53,54]

Finally, since we demonstrated significant down-regulation of *abal* in *A. baumannii* ATCC19606, we decided to test the production of AHLs, signal molecules that are synthesized by *Abal*, as a part of QS system.^[21] *N*-(3-Hydroxydodecanoyl)-L-homoserine lactone is so far the only described AHL molecule in *A. baumannii*, whose binding to *AbaR* was shown to contribute to biofilm forming ability and surface motility through the modification of gene expression. More importantly, some authors have documented its association with virulence.^[23,55] Regarding the quorum-quenching ability of chalcone-related compounds in *A. baumannii*, i.e., the ability to suppress QS-mediated intercellular communication, *Bhargava et al.* discovered potent activity of certain *Glycyrrhiza glabra* flavonoids.^[55] This finding is in agreement with potent quorum-quenching activity of compound **1** against *A.*

baumannii ATCC 19606, that we observed in this study, however, we could not test its impact on QS system of *A. baumannii* 766, since the expression of key QS element *Abal*, was not detected by qPCR.

Conclusions

Thus far, we showed that the use of 2-methoxy and 2'-hydroxy substituted chalcone could provide us with a possibility to reduce two key features that make *A. baumannii* one of the most problematic pathogens of today, that is, ability to persist and to rapidly develop antimicrobial resistance. By inhibiting its biofilm production, this compound makes these bacteria vulnerable to a range of exterior agents, whereas attenuation of its virulence substantially reduces pathogenic infections and severe outcomes without direct activity against its growth, consequently generating much slower selection of resistant mutants. The fact that the impact of chalcones or related compounds on the expression of *A. baumannii* key virulence factors have not been studied earlier, further contributes to the significance of this study. Having described structure and properties of this potential antivirulence agent, we provide information on its stability, solubility, and bioavailability that could be useful in future investigations, perhaps design of drug formulations for *in vivo* studies.

Experimental Section

Materials and Methods

Reagents purchased from Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA) were used for synthesis of compounds. Also, 96% (v/v) ethanol, NaOH, HCl, dimethyl sulfoxide (DMSO), type I recombinant human collagen, Triton X-100, ethyl acetate, and hydroxylamine were purchased from Sigma-Aldrich Inc. Tryptic soy broth (TSB), agarose, and tryptone were bought from Torlak (Belgrade, Serbia), whereas Mueller-Hinton broth (MHB) and 0.5% safranin were procured from HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. (Mumbai, India). Also, human fibronectin, purchased from Serva (Heidelberg, Germany) was used in this study. Thin-layer chromatography (TLC) was conducted with silica gel 60 F₂₅₄ aluminum sheets (Merck, Darmstadt, Germany). FT-IR spectra were recorded on spectrometer Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), using attenuated total reflectance (ATR) mode. Measurements were performed in a spectral range of 400–

4000 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} and the number of scans was 32. NMR spectra were taken on Bruker 400 spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA), at 400, 100 and 376.46 MHz for ^1H , ^{13}C and ^{19}F NMR spectra, respectively, using tetramethylsilane as an internal standard in deuterated chloroform (CDCl_3). The chemical shifts were expressed in ppm and the coupling constants (J) in Hz. Splitting patterns were designated as singlet (s), doublet (d), triplet (t) and multiplet (m). High-resolution mass spectra were measured by Agilent 6210 Time-of-Flight LC/MS system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The microscopy analysis was performed using the OPTICA B-500MET light microscope (Optica SRL, Ponteranica, Italy). Image was collected in reflective mode with OPTIKAM PRO 8LT - 4083.18 camera equipped with scientific-grade CCD sensor. XRD from sample powder was obtained on Philips PW 1050 diffractometer (Philips, Eindhoven, The Netherlands) using $\text{CuK}\alpha$ radiation (Ni filter). The sample was scanned in the 2θ range of 10° to 70° , with a scanning step width of 0.05° , and speed of 2 s per step. Thermal analysis was conducted on SETARAM apparatuses (Caluire-et-Cuire, France), SETSYS evolution TGA/DTA and DSC 131 EVO controlled by CALISTO software. For TGA/DTA sample was placed in an alumina crucible and heated from room temperature up to 900°C with a heating rate of $10^\circ\text{C min}^{-1}$. The phase transition within the region of thermal stability was evaluated by DSC. For this purpose accurately weighed sample was hermetically sealed in 30 μl aluminum pans and heated from 30°C to 150°C at a rate of $10^\circ\text{C min}^{-1}$ in nitrogen gas flow. EZ Read 400 Microplate Reader (Biochrom, Holliston, MA, USA) was used for the measurement of optical density (OD) values.

General Procedure for the Synthesis of Compounds 1–4

Compounds were synthesized by Claisen-Schmidt condensation of non-substituted (**1**) or substituted 2-hydroxyacetophenone (**2–4**) and substituted benzaldehyde, in the presence of relatively strong base (60% (w/v) NaOH), at room temperature. 2-hydroxyacetophenone (0.012 mol) and benzaldehyde (0.01 mol) were simultaneously dissolved in 96% (v/v) ethanol (10 ml) with continuous stirring. Resulting colorless solution was supplemented gradually with 60% (w/v) NaOH in small portions (20 g in total), until the blood-red color was achieved. The solution was then stirred overnight at room temperature, in order to precipitate the chalcone as orange sodium salt and the resulting mixture was kept at 0°C for 24 h. Afterwards, the

mixture was diluted with ice water and acidified with cold 1 mol l^{-1} HCl, gradually until the pH of approx. 3 was reached. The resulting yellow precipitate was then filtered in vacuum, washed with ice water to a near neutral pH level, and the crude mixture was left to air-dry in dark, after which it was purified by preparative TLC using the silica gel plates and toluene as eluent. After removal of toluene under vacuum, the crude products recrystallized from ethanol.

(2E)-3-(2,6-Dichlorophenyl)-1-(5-fluoro-2-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (2). Yellow crystals. Yield: 62.49%. IR (ATR): 1645.1, 1578.9, 1478.9, 1355.4, 1240.9, 1170.0, 972.3, 850.5, 835.5, 784.1, 722.1, 677.2. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 12.43 (s , OH, 1H); 8.02 (d , $J=16$, a, 1H); 7.75 (d , $J=16$, b, 1H); 7.51–7.49 (m , ArH–C(6'), 1H); 7.42 (d , $J=8$, ArH–C(3), ArH–C(5), 2H); 7.26–7.22 (m , ArH–C(4), ArH–C(4'), 2H); 7.03–6.99 (m , ArH–C(3'), 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 192.90; 159.88; 156.13; 153.76; 139.18; 135.44; 132.04; 130.34; 129.05; 128.34; 124.46; 124.22; 120.00; 119.92; 119.43; 119.37; 114.92; 114.69. $^{19}\text{F-NMR}$ (376.46 MHz, CDCl_3): –123.78. HR-ESI-MS: m/z calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{FO}_2$ $[\text{M}]^+$ 311.135, found 311.839.

(2E)-1-(5-Fluoro-2-hydroxyphenyl)-3-[2-(trifluoromethyl)phenyl]prop-2-en-1-one (3). Yellow crystals. Yield: 85.06%. IR (ATR): 1644.3, 1586.8, 1574.6, 1484.1, 1351.8, 1286.4, 1238.9, 1099.8, 1061.1, 1034.7, 1015.6, 970.9, 850.8, 771.4, 757.5, 719.2, 680.3, 651.1. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 12.50 (s , OH, 1H); 8.31 (d , $J=15.20$, a, 1H); 7.85 (d , $J=7.6$, ArH–C(6'), 1H); 7.69 (d , $J=7.6$, ArH–C(3), 1H); 7.66–7.62 (m , ArH–C(6), 1H); 7.56–7.53 (m , ArH–C(4), ArH–C(5), 2H); 7.49 (d , $J=15.20$, b, 1H); 7.28–7.23 (m , ArH–C(4'), 1H); 7.03–6.99 (m , ArH–C(3'), 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 192.47; 159.92; 156.11; 153.74; 141.57; 133.48; 132.22; 130.27; 128.10; 126.51; 126.45; 124.42; 124.19; 123.99; 120.11; 114.74. $^{19}\text{F-NMR}$ (376.46 MHz, CDCl_3): –124.00 (–F); –58.78 (–CF₃). HR-ESI-MS: m/z calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{F}_4\text{O}_2$ $[\text{M}]^+$ 310.243, found 311.084.

(2E)-3-(4-Fluoro-2-methylphenyl)-1-(2-hydroxy-4-methylphenyl)prop-2-en-1-one (4). Yellow crystals. Yield: 93.15%. IR (ATR): 3015.3, 1640.7, 1573.2, 1504.2, 1493.9, 1365.5, 1286.9, 1234.9, 1208.3, 1167.9, 1146.06, 975.9, 955.7, 943.8, 849.7, 784.2, 735.1. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 12.79 (s , OH, 1H); 8.15 (d , $J=15.6$, a, 1H); 7.79 (d , $J=8.4$, ArH–C(6'), 1H); 7.71–7.67 (m , ArH–C(6), 1H); 7.51 (d , $J=15.2$, b, 1H); 6.96–6.93 (m , ArH–C(5), ArH–C(5'), 2H); 6.84 (s , ArH–C(3), 1H); 6.76–6.74 (m , ArH–C(3'), 1H); 2.49 (s , C(2)–CH₃, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$

(100 MHz, CDCl₃): 193.01; 163.17; 163.88; 162.67; 148.17; 141.37; 141.32; 141.24; 130.05; 129.52; 128.61; 128.52; 121.15; 120.21; 118.75; 117.81; 117.60; 113.74; 113.53; 22.00; 19.95. ¹⁹F-NMR (376.46 MHz, CDCl₃): −109.90. HR-ESI-MS: *m/z* calc. for C₁₇H₁₅FO₂ [M]⁺ 270.298, found 270.829.

Spectral data of previously published compound **1**^[30] are provided in the *Supporting Information*.

Bacterial Strains and Growth Conditions

A. baumannii wound isolate (766) obtained from Clinical Medical Center Zvezdara Belgrade and *A. baumannii* type strain ATCC 19606 (KWIK-STIK™, Microbiologics Inc., St. Cloud, MN, USA) were used in this study. The wound isolate (766) was initially identified as member of *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (*Acb*) complex by VITEK[®] 2 system (bioMérieux, Craponne, France). The strain was later confirmed as *A. baumannii* on the basis of growth at 44 °C and obtained FT-IR spectrum. According to susceptibility testing performed by broth microdilution method and VITEK[®] 2 system, *A. baumannii* 766 was classified as XDR, susceptible only to colistin. Both strains were grown in TSB at 37 °C for 24 h prior to experiments.

Growth of *A. baumannii* strains in MHB supplemented with compound **1** at concentrations of 70 μg ml^{−1}, 35 μg ml^{−1}, and 10 μg ml^{−1} was monitored at five different time points (1 h, 3 h, 6 h, 24 h, and 48 h).^[56] Cultures were inoculated at an initial optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.04 and incubated at 37 °C. The growth was followed by determining OD₆₀₀ values at each time point.

Biofilm Assay

The biofilm production of *A. baumannii* was tested in the presence of compounds **1–4** at sub-MIC of 70 μg ml^{−1}. Compound that exhibited greatest activity was further evaluated at concentrations of 35 μg ml^{−1} and 10 μg ml^{−1}. The samples were prepared by using DMSO at concentrations below 1% (v/v) for dissolution. TSB supplemented with an additional 1% glucose was used as the growth medium. Briefly, strains, inoculated at approx. 10⁶ CFU ml^{−1}, were grown in 96-well plates (Sarstedt, Newton, NC, USA) at 37 °C for 24 h. Afterwards, the plates were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and then, fixed by air-drying at 60 °C for 1 h. Fixed biofilms were then stained with 0.5% safranin for 15 min. Unbounded dye

was rinsed off under running tap water, and the bounded dye extracted with 96% (v/v) ethanol. Finally, ODs were measured at 490 nm.^[57]

Quantitative Real-Time PCR

Cultures of *A. baumannii* in MHB, inoculated at approx. 10⁸ CFU ml^{−1} and treated with 70 μg ml^{−1}, 35 μg ml^{−1}, and 10 μg ml^{−1} of compound **1**, along with untreated counterparts, were incubated at 37 °C overnight. Then, the total RNA extraction was performed using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with a modified lysis step.^[58] DNase I treatment was performed by an Ambion DNasefree™ Kit (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, MA, USA). Reversed transcription was done using isolated RNA (1 μg) as a template, according to the manufacturer's protocol (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). Random hexamers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and RiboLock RNase inhibitor (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) were used in the reactions. Quantification of gene transcripts was performed using KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) in 7500 Real-Time PCR 265 system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) under the following conditions: 3 min at 95 °C activation, 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C. Normalization was done against the *rpoB* gene using the 2^{−ΔΔCt} method.^[59] Primers used in the study are listed in *Table 1*. All primers were purchased from Thermo Scientific.

Fibronectin- and Collagen-Binding Assays

The methods were performed as described earlier with some modifications.^[11,64] Wells of the sterile 96-well plates were coated with human fibronectin (100 μg ml^{−1}) or type I recombinant human collagen (100 μg ml^{−1}) at 4 °C for 16 h. Then the wells were washed three times with PBS and blocked with 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in PBS at room

Table 1. The list of primers used in this study.

Gene	Primer sequence (5'→3')	Reference
<i>rpoB</i>	TCCGCACGTAAAGTAGGAAC ATGCCGCCTGAAAAAGTAAC	[60]
<i>ompA</i>	TCTTGGTGGTCACTTGAAGC ACTCTGTGGTTGTGGAGCA	[61]
<i>bap</i>	AATGCACCGGTACTTGATCC TATTGCCTGCAGGGTCAGTT	[62]
<i>abal</i>	CCGCCTTCTCTAGCAGTCA AAAACCCGCAGCACGTAATAA	[63]

temperature for 1 h. Following the removal of BSA, the wells were once more washed three times with PBS, just before the addition of *A. baumannii* strains (100 μ l), previously grown overnight at 37 °C in MHB (initial inoculum of approx. 10^8 CFU ml⁻¹), non-supplemented or supplemented with compound **1** at 70 μ g ml⁻¹, 35 μ g ml⁻¹, and 10 μ g ml⁻¹. The plates were subsequently incubated at 37 °C for 3 h, after which non-adherent bacteria were washed out with PBS and the adhered cells collected by adding of sterile PBS supplemented with 0.5% Triton X-100 (125 μ l). Serial tenfold dilutions of lysates were then plated onto Luria-Bertani agar (LBA) and incubated at 37 °C for 24 h in order to enumerate the colonies.

Surface Motility Assay

Surface motility was tested on 0.3% agarose plates, containing 2.5 g l⁻¹ NaCl and 5 g l⁻¹ of tryptone, as described with slight modification.^[65] Cultures in MHB, with an inoculum size of 1.5×10^8 CFU ml⁻¹, treated with 70 μ g ml⁻¹, 35 μ g ml⁻¹, and 10 μ g ml⁻¹ of compound **1**, along with untreated control, were grown at 37 °C to an early stationary phase, after which the freshly prepared plates were point inoculated with bacterial suspensions (2 μ l). The plates were subsequently incubated at 37 °C in dark for 42 h, i.e., until the appearance of specific motility patterns. ImageJ 1.52a software (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA) was used for the calculation of surface areas covered by migrating bacteria.

Colorimetric Quantification of AHLs

AHL production was screened by colorimetric quantification method.^[66] The strains, inoculated at 1.5×10^8 CFU ml⁻¹, were grown overnight in MHB (5 ml) supplemented with compound **1** at 70 μ g ml⁻¹, 35 μ g ml⁻¹, and 10 μ g ml⁻¹. Then, the tubes were centrifuged at 5,000 rpm for 15 min, and the cell pellets were discarded. Supernatants were collected and filtered through a 0.22 μ m pore size filters, in order to eliminate cell debris. The filtrates were mixed with ethyl acetate in 2:1 ratio and vortexed for 10 min, after which the mixtures were left to stand for 5 min. The upper organic portions were recovered, and the procedure was repeated twice with the remaining lower aqueous portions. Collected organic portions were then dried at 40 °C, and each sample (160 μ l) was transferred into wells of 96-well plates supplemented with 1:1 mixture of 2 M hydroxylamine and 3.5 M NaOH (20 μ l), and 1:1 mixture of FeCl₃ (10%

in 4 M HCl) and 96% (v/v) ethanol (20 μ l). The ODs of dark brown colored ferric hydroxamate complexes were then measured at 520 nm.

Statistical Analysis

All experiments were performed at least three times and the results are presented as mean values \pm SDs. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test was used for comparisons between control and experimental groups. Values for $P < 0.05$ or less were considered to be statistically significant. Statistical analysis was carried out and graphs were prepared by using GraphPad Prism 8 software (San Diego, CA, USA).

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Miloš Petković for recording the NMR spectra.

Author Contribution Statement

Dušan Ušjak collected the bacterial strains, performed the experiments regarding biofilm production, QS activity, motility, and growth curves, assisted in other experiments, analyzed the data, and wrote the article. Miroslav Dinić and Katarina Novović performed the Real-Time PCR and adhesion assays. Miroslav Dinić also assisted in the study design, data interpretation, and writing of article. Branka Ivković synthesized the compounds. Nenad Filipović and Magdalena Stevanović performed the XRD, microscopy, and thermal analyses. Marina T. Milenković designed the study and supervised the work.

References

- [1] C. R. Lee, J. H. Lee, M. Park, K. S. Park, I. K. Bae, Y. B. Kim, C. J. Cha, B. C. Jeong, S. H. Lee, 'Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options', *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 55.
- [2] M. V. Villegas, A. I. Hartstein, 'Acinetobacter outbreaks, 1977–2000', *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **2003**, *24*, 284–295.
- [3] B. Isler, Y. Doi, R. A. Bonomo, D. L. Paterson, 'New Treatment Options against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections', *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *63*, e01110–18.

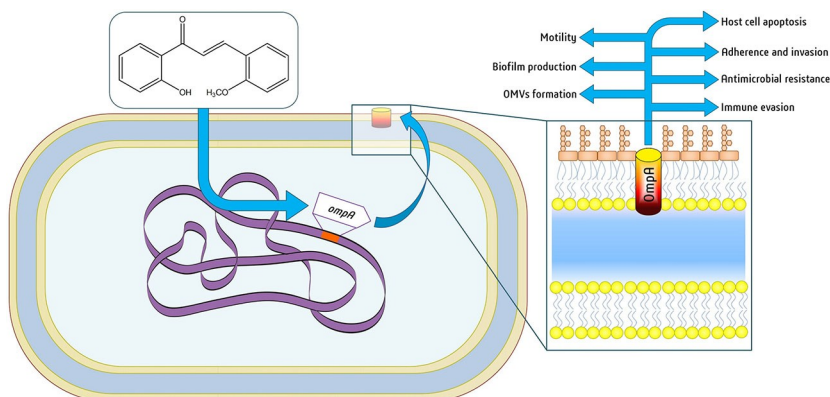
- [4] R. López-Rojas, Y. Smani, J. Pachón, 'Treating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection by blocking its virulence factors', *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2013**, *11*, 231–233.
- [5] S. W. Dickey, G. Y. C. Cheung, M. Otto, 'Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance', *Nat. Rev. Drug Discovery* **2017**, *16*, 457–471.
- [6] C. M. Harding, S. W. Hennon, M. F. Feldman, 'Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence', *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 91–102.
- [7] D. Wong, T. B. Nielsen, R. A. Bonomo, P. Pantapalangkoor, B. Luna, B. Spellberg, 'Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges', *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 409–447.
- [8] M. J. McConnell, L. Actis, J. Pachón, '*Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models', *FEMS Microbiol. Rev.* **2013**, *37*, 130–155.
- [9] C. H. Choi, J. S. Lee, Y. C. Lee, T. I. Park, J. C. Lee, '*Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells', *BMC Microbiol.* **2008**, *8*, 216.
- [10] J. S. Lee, C. H. Choi, J. W. Kim, J. C. Lee, '*Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A induces dendritic cell death through mitochondrial targeting', *J. Microbiol.* **2010**, *48*, 387–392.
- [11] Y. Smani, M. J. McConnell, J. Pachón, 'Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells', *PLoS One* **2012**, *7*, e33073.
- [12] J. S. Jin, S. O. Kwon, D. C. Moon, M. Gurung, J. H. Lee, S. I. Kim, J. C. Lee, '*Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles', *PLoS One* **2011**, *6*, e17027.
- [13] D. C. Moon, C. H. Choi, J. H. Lee, C. W. Choi, H. Y. Kim, J. S. Park, S. I. Kim, J. C. Lee, '*Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles', *J. Microbiol.* **2012**, *50*, 155–160.
- [14] S. W. Kim, C. H. Choi, D. C. Moon, J. S. Jin, J. H. Lee, J. H. Shin, J. M. Kim, Y. C. Lee, S. Y. Seol, D. T. Cho, J. C. Lee, 'Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins', *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *301*, 224–231.
- [15] J. A. Gaddy, A. P. Tomaras, L. A. Actis, 'The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells', *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 3150–3160.
- [16] K. M. Clemmer, R. A. Bonomo, P. N. Rather, 'Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*', *Microbiology* **2011**, *157*, 2534–2544.
- [17] Y. Smani, A. Fàbrega, I. Roca, V. Sánchez-Encinales, J. Vila, J. Pachón, 'Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*', *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 1806–1808.
- [18] T. W. Loehfelme, N. R. Luke, A. A. Campagnari, 'Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein', *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 1036–1044.
- [19] K. A. Brossard, A. A. Campagnari, 'The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells', *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 228–233.
- [20] Y. Fattahian, I. Rasooli, S. L. Mousavi Gargari, M. R. Rahbar, S. Darvish Alipour Astaneh, J. Amani, 'Protection against *Acinetobacter baumannii* infection via its functional deprivation of biofilm associated protein (Bap)', *Microb. Pathog.* **2011**, *51*, 402–406.
- [21] K. Saipriya, C. H. Swathi, K. S. Ratnakar, V. Sritharan, 'Quorum-sensing system in *Acinetobacter baumannii*: a potential target for new drug development', *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *128*, 15–27.
- [22] C. Niu, K. M. Clemmer, R. A. Bonomo, P. N. Rather, 'Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*', *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 3386–3392.
- [23] M. S. Bhuiyan, F. Ellett, G. L. Murray, X. Kostoulas, G. M. Cerqueira, K. E. Schulze, M. H. Mahamad Maifiah, J. Li, D. J. Creek, G. J. Lieschke, A. Y. Peleg, '*Acinetobacter baumannii* phenylacetic acid metabolism influences infection outcome through a direct effect on neutrophil chemotaxis', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 9599–9604.
- [24] Z. Rozmer, P. Perjési, 'Naturally occurring chalcones and their biological activities', *Phytochem. Rev.* **2016**, *15*, 87–120.
- [25] D. I. Batovska, I. T. Todorova, 'Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones', *Curr. Clin. Pharmacol.* **2010**, *5*, 1–29.
- [26] P. Singh, A. Anand, V. Kumar, 'Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review', *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *85*, 758–777.
- [27] D. K. Mahapatra, S. K. Bharti, V. Asati, 'Chalcone scaffolds as anti-infective agents: structural and molecular target perspectives', *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 496–524.
- [28] M. J. Matos, S. Vazquez-Rodriguez, E. Uriarte, L. Santana, 'Potential pharmacological uses of chalcones: a patent review (from June 2011–2014)', *Expert Opin. Ther. Pat.* **2015**, *25*, 351–366.
- [29] L. G. Sarbu, L. G. Bahrin, C. Babii, M. Stefan, M. L. Birsa, 'Synthetic flavonoids with antimicrobial activity: a review', *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *127*, 1282–1290.
- [30] D. Ušjak, B. Ivković, D. D. Božić, L. Bošković, M. Milenković, 'Antimicrobial activity of novel chalcones and modulation of virulence factors in hospital strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*', *Microb. Pathog.* **2019**, *131*, 186–196.
- [31] M. Xu, P. Wu, F. Shen, J. Ji, K. P. Rakesh, 'Chalcone derivatives and their antibacterial activities: Current development', *Bioorg. Chem.* **2019**, *91*, 103133.
- [32] A. T. Mbaveng, B. Ngameni, V. Kuete, I. K. Simo, P. Ambassa, R. Roy, M. Bezabih, F. X. Etoa, B. T. Ngadjui, B. M. Abegaz, J. J. Meyer, N. Lall, V. P. Beng, 'Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae)', *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *116*, 483–489.
- [33] W. C. Chu, P. Y. Bai, Z. Q. Yang, D. Y. Cui, Y. G. Hua, Y. Yang, Q. Q. Yang, E. Zhang, S. Qin, 'Synthesis and antibacterial evaluation of novel cationic chalcone derivatives possessing broad spectrum antibacterial activity', *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 905–921.
- [34] D. D. Bozic, M. Milenkovic, B. Ivkovic, I. Cirkovic, 'Newly-synthesized chalcones-inhibition of adherence and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*', *Braz. J. Microbiol.* **2014**, *45*, 263–270.

- [35] D. Kunthalert, S. Baothong, P. Khetkam, S. Chokchaisiri, A. Suksamrarn, 'A chalcone with potent inhibiting activity against biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*', *Microbiol. Immunol.* **2014**, *58*, 581–589.
- [36] A. J. Martín-Rodríguez, J. C. Ticona, I. A. Jiménez, N. Flores, J. J. Fernández, I. L. Bazzocchi, 'Flavonoids from *Piper delinatum* modulate quorum-sensing-regulated phenotypes in *Vibrio harveyi*', *Phytochemistry* **2015**, *117*, 98–106.
- [37] L. Wang, R. Yang, B. Yuan, Y. Liu, C. Liu, 'The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb', *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, *5*, 310–315.
- [38] T. D. Tran, T. H. Do, N. C. Tran, T. D. Ngo, T. N. Huynh, C. D. Tran, K. M. Thai, 'Synthesis and anti Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity of substituted chalcones alone and in combination with non-beta-lactam antibiotics', *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4555–4560.
- [39] J. G. Holler, S. B. Christensen, H. C. Slotved, H. B. Rasmussen, A. Gúzman, C. E. Olsen, B. Petersen, P. Mølgaard, 'Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from *Persea lingue* Nees', *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 1138–1144.
- [40] L. K. Omosa, J. O. Midiwo, A. T. Mbaveng, S. B. Tankeo, J. A. Seukep, I. K. Voukeng, J. K. Dzutam, J. Isemeki, S. Derese, R. A. Omolle, T. Efferth, V. Kuete, 'Antibacterial activities and structure-activity relationships of a panel of 48 compounds from Kenyan plants against multidrug resistant phenotypes', *Springerplus* **2016**, *5*, 901.
- [41] A. M. S. Kumari, A. Routray, D. Yadav, R. Madhavan, 'Imipenem resistance and biofilm production in *Acinetobacter*', *Drug Invent. Today* **2013**, *5*, 256–258.
- [42] P. Bocanegra-Ibarias, C. Peña-López, A. Camacho-Ortiz, J. Llaca-Díaz, J. Silva-Sánchez, H. Barrios, U. Garza-Ramos, A. M. Rodríguez-Flores, E. Garza-González, 'Genetic characterisation of drug resistance and clonal dynamics of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting in Mexico', *Int. J. Antimicrob. Agents* **2015**, *45*, 309–313.
- [43] H. A. Kim, S. Y. Ryu, I. Seo, S. I. Suh, M. H. Suh, W. K. Baek, 'Biofilm Formation and Colistin Susceptibility of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Korean Nosocomial Samples', *Microb. Drug Resist.* **2015**, *21*, 452–457.
- [44] A. de Breijl, L. Dijkshoorn, E. Lagendijk, J. van der Meer, A. Koster, G. Bloemberg, R. Wolterbeek, P. van den Broek, P. Nibbering, 'Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*', *PLoS One* **2010**, *5*, e10732.
- [45] J. J. Richards, C. S. Reed, C. Melander, 'Effects of *N*-pyrrole substitution on the anti-biofilm activities of oroidin derivatives against *Acinetobacter baumannii*', *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4325–4327.
- [46] S. Andjouh, Y. Blache, 'Click-based synthesis of bromotyrosine alkaloid analogs as potential anti-biofilm leads for SAR studies', *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 5762–5766.
- [47] V. Sánchez-Encinales, R. Álvarez-Marín, M. E. Pachón-Ibáñez, F. Fernández-Cuenca, A. Pascual, J. Garnacho-Montero, L. Martínez-Martínez, J. Vila, M. M. Tomás, J. M. Cisneros, G. Bou, J. Rodríguez-Baño, J. Pachón, Y. Smani, 'Overproduction of Outer Membrane Protein A by *Acinetobacter baumannii* as a Risk Factor for Nosocomial Pneumonia, Bacteremia, and Mortality Rate Increase', *J. Infect. Dis.* **2017**, *215*, 966–974.
- [48] S. Kõljalg, J. Vuopio-Varkila, O. Lyytikäinen, M. Mikelsaar, T. Wadström, 'Cell surface properties of *Acinetobacter baumannii*', *APMIS* **1996**, *104*, 659–665.
- [49] X. Vila-Farrés, R. Parra-Millán, V. Sánchez-Encinales, M. Varese, R. Ayerbe-Algaba, N. Bayó, S. Guardiola, M. E. Pachón-Ibáñez, M. Kotev, J. García, M. Teixidó, J. Vila, J. Pachón, E. Giral, Y. Smani, 'Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition', *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14683.
- [50] B. A. Eijkelkamp, U. H. Stroehrer, K. A. Hassan, L. D. Elbourne, I. T. Paulsen, M. H. Brown, 'H₂NS plays a role in expression of *Acinetobacter baumannii* virulence features', *Infect. Immun.* **2013**, *81*, 2574–2583.
- [51] M. Pérez-Varela, J. Corral, J. A. Vallejo, S. Rumbo-Feal, G. Bou, J. Aranda, J. Barbé, 'Mutations in the β -Subunit of the RNA Polymerase Impair the Surface-Associated Motility and Virulence of *Acinetobacter baumannii*', *Infect. Immun.* **2017**, *85*, e00327–17.
- [52] C. N. McQueary, L. A. Actis, '*Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties', *J. Microbiol.* **2011**, *49*, 243–250.
- [53] S. K. Khadke, J. H. Lee, J. T. Woo, J. Lee, 'Inhibitory Effects of Honokiol and Magnolol on Biofilm Formation by *Acinetobacter baumannii*', *Biotechnol. Bioproc. E.* **2019**, *24*, 359–365.
- [54] C. J. Raorane, J. H. Lee, Y. G. Kim, S. K. Rajasekharan, R. García-Contreras, J. Lee, 'Antibiofilm and Antivirulence Efficacies of Flavonoids and Curcumin against *Acinetobacter baumannii*', *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 990.
- [55] N. Bhargava, S. P. Singh, A. Sharma, P. Sharma, N. Capalash, 'Attenuation of quorum sensing-mediated virulence of *Acinetobacter baumannii* by *Glycyrrhiza glabra* flavonoids', *Future Microbiol.* **2015**, *10*, 1953–1968.
- [56] T. Maeda, R. García-Contreras, M. Pu, L. Sheng, L. R. Garcia, M. Tomás, T. K. Wood, 'Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds', *ISME J.* **2012**, *6*, 493–501.
- [57] S. Stepanović, D. Vuković, V. Hola, G. Di Bonaventura, S. Djukic, I. Ćirković, F. Ruzicka, 'Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci', *APMIS* **2007**, *115*, 891–899.
- [58] K. Novović, S. Mihajlović, M. Dinić, M. Malešević, M. Miljković, M. Kojić, B. Jovčić, '*Acinetobacter* spp. porin Omp33-36: Classification and transcriptional response to carbapenems and host cells', *PLoS One* **2018**, *13*, e0201608.
- [59] K. J. Livak, T. D. Schmittgen, 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method', *Methods* **2001**, *25*, 402–408.
- [60] S. Coyne, N. Rosenfeld, T. Lambert, P. Courvalin, B. Périchon, 'Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*', *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4389–4393.
- [61] M. J. McConnell, A. Pérez-Ordóñez, P. Pérez-Romero, R. Valencia, J. A. Lepe, I. Vázquez-Barba, J. Pachón, 'Quantitative real-time PCR for detection of *Acinetobacter baumannii* colonization in the hospital environment', *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 1412–1414.

- [62] E. De Gregorio, E. Roscetto, V. D. Iula, M. Martinucci, R. Zarrilli, P. P. Di Nocera, M. R. Catania, 'Development of a real-time PCR assay for the rapid detection of *Acinetobacter baumannii* from whole blood samples', *New Microbiol.* **2015**, *38*, 251–257.
- [63] G. N. Selasi, A. Nicholas, H. Jeon, S. H. Na, H. I. Kwon, Y. J. Kim, S. T. Heo, M. H. Oh, J. C. Lee, 'Differences in Biofilm Mass, Expression of Biofilm-Associated Genes, and Resistance to Desiccation between Epidemic and Sporadic Clones of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 191', *PLoS One* **2016**, *11*, e0162576.
- [64] M. Malešević, Z. Vasiljević, A. Sovtić, B. Filipić, K. Novović, M. Kojić, B. Jovčić, 'Virulence traits associated with *Burkholderia cenocepacia* ST856 epidemic strain isolated from cystic fibrosis patients', *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2017**, *6*, 57.
- [65] C. M. Harding, E. N. Tracy, M. D. Carruthers, P. N. Rather, L. A. Actis, R. S. Munson Jr., '*Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility', *mBio* **2013**, *4*, e00360–13.
- [66] F. Modarresi, O. Azizi, M. R. Shakibaie, M. Motamedifar, E. Mosadegh, S. Mansouri, 'Iron limitation enhances acyl homoserine lactone (AHL) production and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*', *Virulence* **2015**, *6*, 152–161.

Received September 21, 2020
Accepted November 13, 2020

FULL PAPER



D. Ušjak, M. Dinić, K. Novović, B. Ivković, N. Filipović, M. Stevanović, M. T. Milenković^{*,*}

Methoxy-Substituted Hydroxychalcone Reduces Biofilm Production, Adhesion and Surface Motility of *Acinetobacter baumannii* by Inhibiting *ompA* Gene Expression



2-Methoxy substituted hydroxychalcone has a potential to prevent serious illness in *A. baumannii* infected patients through downregulation of *bap* and most notably *ompA* gene expression, by M. T. Milenković et al., @BelgradeUni

Share your work on social media! Chemistry&Biodiversity has added Twitter as a means to promote your article. Twitter is an online microblogging service that enables its users to send and read short messages and media, known as tweets. Please check the pre-written tweet in the galley proofs for accuracy. If you, your team, or institution have a Twitter account, please include its handle @username. Please use hashtags only for the most important keywords, such as #catalysis, #nanoparticles, or #proteindesign. The ToC picture and a link to your article will be added automatically, so the tweet text must not exceed 250 characters. This tweet will be posted on the journal's Twitter account (follow us @ChemBiodiv) upon publication of your article in its final form. We recommend you to re-tweet it to alert more researchers about your publication, or to point it out to your institution's social media team.

ORCID (Open Researcher and Contributor ID)

Please check that the ORCID identifiers listed below are correct. We encourage all authors to provide an ORCID identifier for each coauthor. ORCID is a registry that provides researchers with a unique digital identifier. Some funding agencies recommend or even require the inclusion of ORCID IDs in all published articles, and authors should consult their funding agency guidelines for details. Registration is easy and free; for further information, see <http://orcid.org/>.

Dušan Ušjak
Miroslav Dinić
Katarina Novović
Branka Ivković
Nenad Filipović
Magdalena Stevanović
Marina T. Milenković <http://orcid.org/0000-0002-6298-0599>