UNIVERZITET U NOVOM SADU

PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU

Acinetobacter baumannii specifični bakteriofagi iz familije *Inoviridae*

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
prof. dr Petar Knežević

Kandidat:
Msc Jelena Narančić

Novi Sad, 2024. godine

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА[1]

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Јелена Наранчић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција):	др Петар Кнежевић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
Наслов рада:	*Acinetobacter baumannii* специфични бактериофаги из фамилије *Inoviridae*
Језик и писмо рада:	Српски језик, латиница
Физички опис рада:	Унети број: Страница 131 Поглавља 9 Референци 200 Табела 10 Слика 20 Графикона 7 Прилога 1
Научна област:	Биологија

[1]Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:
5б – Изјава о ауторству;
5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и дозвола за објављивање личних података;
5г – Изјава о коришћењу.
Ове Изјаве се чувају у институцији у штампаном и електронском облику и не кориче се са радом.

Ужа научна област (научна дисциплина):	Микробиологија
Кључне речи / предметна одредница:	*Acinetobacter baumannii*, Бактериофаги, *Inoviridae*
Апстракт на језику рада:	Филаментозни бактериофаги Грам негативних бактеријских врста припадају реду *Tubulavirales* и фамилији *Inoviridae.* Ови фаги имају значајан утицај на вируленцију бактерија домаћина и најчешће се налази у виду профага интегрисани у геном бактерије. *A. baumannii* је клинички доминантна врста Грам негативних бактерија, са израженом тенденцијом изазивања нозокомијалних инфекција. Ова бактерија је често мултипло резистентна на антибиотике, а некада и пан резистентна. Због свега овога је од велике важности установити све утицаје на бројне факторе вируленције и карактеристике које поседује и уз помоћ којих брзо развија резистенцију. *A. baumannii* специфични филаментозни фаги први пут су у овој студији детектовани у форми профага у 15,3% секвенцираних сојева и у 23,8% сојева из лабораторијске колекције, а на основу филогенетских анализа установљено је постојање потенцијално 12 нових родова у оквиру фамилије *Inoviridae*. Из референтног соја ATCC 19606 изолован је и окарактерисан, генетички и морфолошки, први *Acinetobacter baumannii* специфични филаментозни бактериофаг за који се утврдило да поседује све заједничке особине са представницима фамилије *Inoviridae*. Такође, изолована су још два фага из сојева пореклом из природне средине и клиничког узорка. Након инфекције одабраних сојева *A. baumannii* овим фагима забележено је смањење кинетике раста бактерије, трзајуће покретљивости, значајно смањење способности формирања биофилма и значајно повећање осетљивости на одређене антибиотике у односу на неинфициране сојеве. Ови резултати истичу потенцијал и улогу изолованих фага у смањењу вируленције домаћина. Такође, као могући механизам ресензитизације сојева на антибиотике показао се систем ефлуксних пумпи чија експресија се значајно смањила након инфекције овим фагима.
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	16.09.2020.
Датум одбране: (Попуњаванакнадно	

институција)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	Председник: др Верица Алексић Сабо, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Члан: др Петар Кнежевић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Члан: др Гордана Ковачевић, виши научни сарадник, Институт за јавно здравље Војводине, Нови Сад
Напомена:	

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTYOF SCIENCE

KEY WORD DOCUMENTATION[2]

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Jelena Narančić
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Dr. Petar Knežević, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Thesis title in English:	*Acinetobacter baumannii* specific bacteriophages origin from *Inoviridae* family
Language and script:	Serbian, latin
Physical description:	Number of: Pages 131 Chapters 9 References 200 Tables 10 Illustrations 20 Graphs 7 Appendices 1
Scientific field:	Biology
Scientific subfield (scientific discipline):	Microbiology

[2]The author of the doctoral dissertation has signed the following Statements:
5б – Statement on the authorship,
5в – Statement that the printed and e-version of the doctoral dissertation are identical and authorization to use personal data,
5г – Copyright statement.
The paper and e-versions of Statements are held at the institution and are not included into the printed thesis.

Subject, Key words:	*Acinetobacter baumannii*, Bacteriophage, *Inoviridae*
Abstract in English:	Filamentous bacteriophages belonging to the order *Tubulavirales* and the family *Inoviridae* affect Gram-negative bacteria. These phages have a significant impact on the virulence of their hosts and they are most often found as prophages integrated into the bacterial genome. *A. baumannii* is a clinically dominant species of Gram-negative bacteria, with a pronounced tendency to cause nosocomial infections. This bacterium is often multi-resistant to antibiotics, and sometimes pan-resistant. According to this, there is significant importance to establish all the influences on the numerous virulence factors and the characteristics that *A. baumannii* possesses by means of which it quickly develops resistance. *A. baumannii* specific filamentous phages were detected for the first time in this study in the form of prophages in 15.3% of the sequenced strains and in 23.8% of the strains from the laboratory collection. Based on the phylogenetic analysis, the existence of potentially 12 new genera within the *Inoviridae* family was established. The first *Acinetobacter baumannii* specific filamentous bacteriophage was isolated and characterized, genetically and morphologically, from the reference strain ATCC 19606, which was found to have all common features with representatives of the *Inoviridae* family. Also, two more phages were isolated from strains originating from the natural environment and a clinical sample. After infection of selected strains of *A. baumannii* with these phages, a decrease in bacterial growth kinetics, twitching motility, a significant decrease in the ability to form biofilms and a significant increase in sensitivity to certain antibiotics compared to uninfected strains were recorded. These results highlight the potential and role of isolated phages in reducing host virulence. Also, the expression of efflux pump system was significantly decreased after infection with these phages, which shown to be a possible mechanism of resensitization of strains to antibiotics.
Date of endorsement by the scientific board:	16th September 2020
Date of defence: (Filled in by the institution)	
Thesis defence board: (title, first name, last name, position, institution)	Chair: Dr. Verica Aleksic Sabo, assistant professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Member: Dr. Petar Knežević, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

	Member: Dr. Gordana Kovacevic, senior research associate, Institute of Public Health of Vojvodina
Note:	

Zahvaljujem

Prirodno-matematičkom fakultetu i Departmanu za biologiju i ekologiju, koji su omogućili izradu ove disertacije u okviru projekta Ministarstva prosvete i nauke R. Srbije br. 172058 i programa naučno-istraživačkog rada Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija.

❖ Neizmernu zahvalnost upućujem prof. dr Petru Kneževiću, mentoru ove disertacije, istaknutom naučniku iz oblasti filamentoznih faga, mom profesionalnom i ličnom mentoru. Zahvaljujem se što mi je oslobodio put kroz doktorske studije, olakšao ga, obogatio svojim znanjem i veštinama, pružao podršku i bio mi prijatelj od prvog dana.

❖ Članovima komisije dr Gordani Kovačević i doc. dr Verici Aleksić Sabo na konstruktivnim, stručnim i tehničkim savetima.

❖ Zahvaljujem se posebno doc. dr Verici Aleksić Sabo koja je nesebično i sa velikim strpljenjem pružala podršku, savete i pomoć pri izradi ove disertacije i mom ličnom napretku u laboratoriji.

❖ Članovima Katedre za mikrobiologiju, cenjenim profesorima dr Draganu Radnoviću, dr Jelici Simeunović, dr Maji Karaman i uvaženim kolegama iz sobe 24, naročito Jovani, Dariji, Sonji, Jeleni, Isidori i Damiru zahvaljujem na kolegijalnosti, deljenom iskustvu, podršci, dobrom raspoloženju i sjajnoj radnoj atmosferi.

❖ Departmanu za biologiju i ekologiju upućujem zahvalnost na finansijskoj podršci koja je značajno doprinela izradi ove disertacije.

❖ Kolegama sa Katedre za hidrobiologiju zahvaljujem na pomoći u prikupljanju uzoraka za izolaciju sojeva *A. baumannii*.

❖ Prof. dr Roku Kostanjšeku sa Biotehničkog Univerziteta u Ljubljani upućujem zahvalnost za izuzetnu pomoć u izradi elektronskih mikrografija.

❖ Zahvaljujem se svojoj sestri Biljani koja mi je ukazala podršku i pomoć, kako pri samom izboru mog puta i odluke o doktorskim studijama, tako i tokom trajanja ovih studija.

❖ Za sve vidove podrške koja je na maksimalnom nivou kroz moje celokupno školovanje, samim tim i doktorskim studijama, duboko se zahvaljujem roditeljima Milki i Milanu Narančić. Hvala na svim nematerijalnim i materijalnim resursima koje ste uložili u mene, na veri, na utočištu i raširenom zagrljaju kroz sve izazove koje sam prevazišla uz vašu pomoć i razumevanje.

❖ Zahvaljujem se životnom saputniku, Slobodanu, na razumevanju, motivaciji, ljubavi i na održavanju osmeha na mom licu.

❖ Posebnu zahvalnost upućujem svom sinu Vasiliju kome posvećujem ovu disertaciju. Svaki dan tvog postojanja, svaki osmeh i zagrljaj su od neprocenljive vrednosti i jedinstvena svakodnevna motivacija.

Jelena Narančić

SADRŽAJ

Rezime **1**

Abstract **2**

1. UVOD **3**

2. PREGLED LITERATURE **4**

2.1. GENOMSKA VRSTA *Acinetobacter baumannii* **4**

2.1.1. TAKSONOMIJA 4

2.1.2. BIOLOGIJA 7

2.1.2.1. Fizičke i biohemijske karakteristike 8

2.1.2.2. Patogenost i virulencija 10

2.1.3. REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE 15

2.1.3.1. Mehanizmi rezistencije 16

2.2. FILAMENTOZNI BAKTERIOFAGI **19**

2.2.2. TAKSONOMIJA 20

2.2.3. MORFOLOGIJA 21

2.2.3.1. Fizičko-hemijske osobine 22

2.2.4. KARAKTERISTIKE GENOMA 23

2.2.5. PROTEINI 24

2.2.5.1. Mehanizam infekcije domaćina 28

2.2.6. ZNAČAJ FILAMENTOZNIH BAKTERIOFAGA 31

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA **34**

4. MATERIJAL I METODE **35**

4.1. SOJEVI *Acinetobacter baumannii* **35**

4.1.1. Izolacija i identifikacija *Acinetobacter baumannii* sojeva 35

4.2. FILAMENTOZNI BAKTERIOFAGI **37**

4.2.1. *In silico* utvrđivanje prevalence faga 37

4.2.2. *In vitro* utvrđivanje prevalence faga 38

4.3. IZOLACIJA BAKTERIOFAGA **39**

4.3.1. Propagacija faga 39

4.3.2. Precipitacija i purifikacija faga 40

4.4. ODREĐIVANJE BROJNOSTI FAGA U SUSPENZIJI 40

4.5. ODREĐIVANJE PROTEINSKOG PROFILA FAGA 41

4.6. MORFOLOGIJA ODABRANIH FAGA 42

4.7. KARAKTERIZACIJA GENOMA FAGA 42

4.7.1. Izolacija viralne DNK 42

4.7.2. Tretman genoma različitim nukleazama 43

4.8. INFEKCIJA ODABRANIH SOJEVA FAGIMA I UTICAJ NA FENOTIPSKE KARAKTERISTIKE DOMAĆINA 43

4.8.1. Infekcija odabranih sojeva *A. baumannii* specifičnim filamentoznim fagima 44

4.8.2. Uticaj *A. baumannii* specifičnih filamentoznih faga na fenotip domaćina 44

4.8.2.1. Kinetika rasta 45

4.8.2.2. Pokretljivost pilima 45

4.8.2.3. Produkcija ugljenih hidrata 45

4.8.2.4. Formiranje biofilma na polistirenskoj površini 46

4.8.2.5. Osetljivost na antibiotike 47

4.8.2.6. Ekspresija efluksnih pumpi 47

5. REZULTATI 49

5.1. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA *Acinetobacter baumannii* SOJEVA 49

5.2. IDENTIFIKACIJA I UTVRĐIVANJE PREVALENCE Af PROFAGA U *A. baumannii* SOJEVIMA 50

5.2.1. *In silico* analiza sekvenciranih sojeva 50

5.2.2. *In vitro* analiza sojeva iz kolekcije 71

5.3. IZOLACIJA Af FILAMENTOZNIH FAGA 73

5.4. BROJNOST Af FAGA U SUSPENZIJI 74

5.5. PROTEINSKI PROFIL FAGA 74

5.6. MORFOLOGIJA Af FAGA 75

5.7. KARAKTERIZACIJA GENOMA FAGA 76

5.7.1. Karakterizacija viralne DNK 78

5.7.2. Enzimska digestija 78

5.8. INFEKCIJA ODABRANIH SOJEVA FAGIMA I UTICAJ NA FENOTIPSKE KARAKTERISTIKE 79

5.8.1. Uticaj infekcije Af fagima na kinetiku rasta 80

5.8.2. Uticaj infekcije Af fagima na kretanje pilima, tj. trzajuću pokretljivost 81

5.8.3. Uticaj infekcije Af fagima na produkciju ugljenih hidrata 82

5.8.4. Uticaj infekcije Af fagima na produkciju biofilma 83

5.8.5. Uticaj infekcije Af fagima na osetljivost na antibiotike 83

5.8.6. Uticaj infekcije Af fagima na ekspresiju efluksnih pumpi 84

6. DISKUSIJA 86

7. ZAKLJUČAK 93

8. LITERATURA 95

9. PRILOZI 109

План третмана података .....

Rezime. Filamentozni bakteriofagi Gram negativnih bakterijskih vrstapripadaju redu *Tubulavirales* i familiji *Inoviridae.* Ovi fagi imaju značajan uticaj na virulenciju bakterija domaćina i najčešće se nalaze u vidu profaga integrisani u genom bakterije. *A. baumannii* je klinički dominantna vrsta Gram negativnih bakterija, sa izraženom tendencijom izazivanja nozokomijalnih infekcija. Ova bakterija ječesto multiplo rezistentna na antibiotike, a nekada i pan rezistentna. Zbog svega ovoga je od velike važnosti ustanoviti sve uticaje na brojne faktore virulencije i karakteristike koje poseduje i uz pomoć kojih brzo razvija rezistenciju. *A. baumannii* specifični filamentozni fagi prvi put su u ovoj studiji detektovani u formi profaga u 15,3% sekvenciranih sojeva i u 23,8% sojeva iz laboratorijske kolekcije, a na osnovu filogenetskih analiza ustanovljeno je postojanje potencijalno 12 novih rodova u okviru familije *Inoviridae*. Iz referentnog soja ATCC 19606 izolovan je i okarakterisan, genetički i morfološki, prvi *Acinetobacter baumannii* specifični filamentozni bakteriofag za koji se utvrdilo da poseduje sve zajedničke osobine sa predstavnicima familije *Inoviridae*. Takođe, izolovana su još dva faga iz sojeva poreklom iz prirodne sredine i kliničkog uzorka. Nakon infekcije odabranih sojeva *A. baumannii* ovim fagima zabeleženo je smanjenje kinetike rasta bakterije, trzajuće pokretljivosti, značajno smanjenje sposobnosti formiranja biofilma i značajno povećanje osetljivosti na određene antibiotike u odnosu na neinficirane sojeve. Ovi rezultati ističu potencijal i ulogu izolovanih faga u smanjenju virulencije domaćina. Takođe, kao mogući mehanizam resenzitivacije sojeva na antibiotike pokazao se sistem efluksnih pumpi čija ekspresija se značajno smanjila nakon infekcije ovim fagima.

Abstract. Filamentous bacteriophages belonging to the order *Tubulavirales* and the family *Inoviridae* affect Gram-negative bacteria. These phages have a significant impact on the virulence of their hosts and they are most often found as prophages integrated into the bacterial genome. *A. baumannii* is a clinically dominant species of Gram-negative bacteria, with a pronounced tendency to cause nosocomial infections. This bacterium is often multi-resistant to antibiotics, and sometimes pan-resistant. According to this, there is significant importance to establish all the influences on the numerous virulence factors and the characteristics that *A. baumannii* possesses by means of which it quickly develops resistance. *A. baumannii* specific filamentous phages were detected for the first time in this study in the form of prophages in 15.3% of the sequenced strains and in 23.8% of the strains from the laboratory collection. Based on the phylogenetic analysis, the existence of potentially 12 new genera within the *Inoviridae* family was established. The first *Acinetobacter baumannii* specific filamentous bacteriophage was isolated and characterized, genetically and morphologically, from the reference strain ATCC 19606, which was found to have all common features with representatives of the *Inoviridae* family. Also, two more phages were isolated from strains originating from the natural environment and a clinical sample. After infection of selected strains of *A. baumannii* with these phages, a decrease in bacterial growth kinetics, twitching motility, a significant decrease in the ability to form biofilms and a significant increase in sensitivity to certain antibiotics compared to uninfected strains were recorded. These results highlight the potential and role of isolated phages in reducing host virulence. Also, the expression of efflux pump system was significantly decreased after infection with these phages, which shown to be a possible mechanism of resensitization of strains to antibiotics.

1.UVOD

Genomska vrsta *Acinetobacter baumannii* pored svoje široke rasprostranjenosti u spoljašnjoj sredini poznata je i kao uzročnik različitih oboljenja. Klinički je dominantna vrsta sa izraženom tendencijom izazivanja nozokomijalnih infekcija. Uzročnik je bakteremija, pneumonija, infekcija urinarnog trakta, rana, kože i mekih tkiva, meningitisa i endokarditisa (Gandham i sar., 2012; Lockhart i sar, 2007). *A. baumannii* poseduje brojne faktore virulencije i karakteristike uz pomoć kojih brzo razvija rezistenciju na veliki broj antibiotika. Često je multiplo rezistentna (eng. multidrug-resistant, MDR), odnosno rezistentna na antibiotike iz dve ili tri klase, a sve češće i panrezistentna (eng. pandrug-resistant, PDR) tj. rezistentna na antibiotike svih grupa, što predstavlja veliki terapijski problem i značajno otežava eradikaciju. U porastu je učestalost bolničkih infekcija na hirurškim odeljenjima i u jedinicama intenzivne nege multiplo rezistentnim sojevima ove genomske vrste, a mortalitet pacijenata kod kojih je detektovana infekcija ovom bakterijom je visok i može biti do 75% (Smith i sar., 2007).

Poznato je da bakteriofagi (virusi bakterija) doprinose virulenciji bakterija putem lizogene konverzije, a mogu i prenositi gene za antibiotsku rezistenciju putem transdukcije. Uloga faga specifičnih za *Acinetobacter baumannii* u ovom fenomenu još uvek nije dovoljno poznata, s obzirom na to da su prvi fagi za ovu vrstu opisani tek pre nekoliko godina. Svi do sada opisani fagi specifični za *A. baumannii* su iz familija koje pripadaju klasi *Caudoviricetes,* dok su druge familije još uvek neotkrivene. Jedna od njih je i familija *Inoviridae,* iz reda *Tubulavirales,* čiji su domaćini Gram negativne bakterije u koje spada *A. baumannii*. Fagi iz ove familije su najčešće u vidu profaga integrisani u genom bakterije domaćina i kodiraju različite gene koji utiču na stepen virulencije, produkciju toksina, pokretljivost i brojne druge osobine vezane za fitnes domaćina i patogenost.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. GENOMSKA VRSTA *Acinetobacter baumannii*

Rod *Acinetobacter* se prvi put spominje 1954. godine prilikom diferencijacije roda *Achromobacter* na pokretne i nepokretne organizme (Brisou i Prevot, 1954). Kasnije, 1968. godine nakon objavljene studije sa izolacijom brojnih vrsta ovog roda od strane Baumann-a i njegovih saradnika, naziv i opis roda postaje utemeljen i opšteprihvaćen (Baumann i sar., 1968). Rod *Acinetobacter* podrazumeva grupu kokoidnih štapićastih bakterija koje sustriktno aerobne, nepokretne, nepigmentišuće, Gram negativne, oksidaza pozitivne i katalaza negativne. Rastu na mineralnim hranljivim medijumima koji sadrže nitratne ili amonijačne soli kao izvore azota i kao jedini izvor ugljenika laktat, piruvat ili acetat (Brenner i sar., 2005). Vrstu *A. baumannii* karakteriše ubikvitarnost, visok stepen virulencije i patogenosti, kao i veoma dobro razvijeni mehanizmi rezistencije na antimikrobne agense. *A. baumannii* je deklarisana od strane Svetske zdravstvene organizacije (SZO) kao jedan od članova ESCAPE grupe organizama (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* vrste), koji su vodeći u izazivanju nozokomijalnih infekcija širom sveta i većinom su multiplorezistentni, što spada u tri najveće pretnje globalnom javnom zdravlju (Boucher i sar., 2009). Takođe, SZO je svrstao *A. baumannii* na listu kritičnih patogenih vrsta sa velikom pretnjom po ljudsko zdravlje za koje je prioritetno i urgentno potrebno razviti nove antimikrobne agense (Moubareck i Halat, 2020).

2.1.1. TAKSONOMIJA

Od prve klasifikacije roda *Acinetobacter* 1968. godine, taksonomija se dosta puta modifikovala. Taksonomski izazov za ovaj rod predstavlja teško razlikovanje klastera sa tesno srodnim vrstama pomoću fenotipskih i biohemijskih metoda. Danas pojam vrste u mikrobiologiji podrazumeva grupu izolata koji na osnovu hibridizacije i sekvenciranja DNK, primenom različitih genetičkih metoda pokazuju visok stepen sličnosti i dele specifične konzervisane gene. Genomske vrste se razlikuju po svojim fenotipskim i ekološkim karakteristikama prema kojima su ranije svrstavane u jednu vrstu. Usled velikih razlika u osetljivosti na antibiotike i kliničkog značaja različitih genomskih vrsta, za identifikaciju vrsta *Acinetobacter* roda neophodne su molekularne metode (Lin i Lan, 2014). Trenutni taksonomski položaj vrsta *Acinetobacter* (Brenner i sar., 2005) je sledeći:

Regnum (Carstvo): Procariotae

Phylum (Razdeo): Proteobacteria

Classis (Klasa): Gammaproteobacteria

Ordo (Red): Moraxellales

Familia (Familija): Moraxellaceae

Genus (Rod): *Acinetobacter*.

Brojne molekularne metode se predlažu u identifikacijii tipizaciji vrsta roda *Acinetobacter*, a među najzastupljenijima su DNK-DNK hibridizacija (DDH), analiza DNK sekvenci i restrikciona digestija DNK fragmenata amplifikovanih (umnoženih) lančanom polimeraza reakcijom (PCR), takozvani polimorfizam dužine restrikcionih fragmenta PCR reakcije (eng. PCR-*restriction fragment length polymorphism*, PCR-RFLP) (Vijayakumar i sar., 2019). Molekularna identifikacija *Acinetobacter baumannii* na nivou vrste uključuje i brojne tehnike poput tehnike "otiska prsta" zasnovane na polimeraza lančanim reakcijama (eng. *PCR based fingerprinting techniques*), analiza polimorfizama dužine restrikcionih fragmenta (eng. *amplified fragment lengthpolymorphism*, AFLP), polimeraza lančana reakcija zasnovana na repetitivnim ekstragenskim palindromskim sekvencama (eng. *rep-PCR*) (Koelman i sar., 1998; Bou i sar., 2000) itd.

DNK-DNK hibridizacija (DDH) je već pola veka veoma zastupljena i adekvatna metoda, međutim od kada je sekvenciranje celog genoma zastupljeno razvijene su digitalne metode upoređivanja sekvenci koje oponašaju DDH (Kim i sar., 2014). Ove metode uključuju prosečnu identičnost nukleotida (eng. *average nucleotide identity*, ANI) (Konstantinidis i sar., 2006), indeks maksimalnog jedinstvenog podudaranja (eng. *maximal unique matches index,* MUMi) (Deloger i sar., 2009), i BLAST filogenetska udaljenost genoma (eng. *genome BLAST distance phylogeny* GBDP) (Henz i sar., 2005). Analize DNK sekvenci podrazumevaju utvrđivanje srodnosti na osnovu sličnosti njihove DNK sekvence, kao što su 16S rRNK, *rpoB* i 16S-23S ITS regiona. 16S rRNK je široko prihvaćena kao polimorfna sekvenca za identifikaciju brojnih rodova, ali za razlikovanje *Acinetobacter* vrsta nije tako efikasno, zbog njegove niske polimorfnosti. Dok su analize 16S rRNK sekvence veoma pouzdan marker na nivou roda, *rpoB* geni su veoma varijabilni između *Acinetobacter* vrsta, te su prihvaćene kao odgovarajući marker za identifikaciju vrsta (Wang i sar., 2014). La Scola i sar. (2006) su prvi izveli studiju identifikacije izolata *Acinetobacter* na nivou vrste pomoću analize *rpoB* sekvence. Naime, geni *rpoB, recA* i *gyrB* mnogo brže evoluiraju pa su proučeni kao dijagnostički biomarkeri. PCR-

RFLP metod uključuje amplifikaciju konzervisanih sekvenci nakon koje sledi digestija korišćenjem različitih restrikcionih enzima (Dijkshoorn i Nemec, 2008). Nekoliko sekvenci gena kao što su 16S rRNA, 16S–23S ITS i *recA* su najzastupljenije (Ahmed i Alp, 2015). Metodom restrikcione analize amplifikovanih fragmenata rDNK (eng. *amplified rDNA restriction analysis*, ARDRA) amplifikacija 16SrRNK gena praćena RFLP uz korišćenje različitih restrikcionih enzima omogućila je identifikaciju svih *A. baumannii* vrsta izuzev *A. haemolyticus* (genovrste 4) i *A. johnsonii* (genovrste 7) (Vaneechoutte i sar., 1995). Međutim, multipleks PCR metoda koja cilja *recA* i 16S rRNK i koja je praćena RFLP tehnikom doprinela je pouzdanoj identifikaciji *Acinetobacter* genovrsta 5, 7, 10 uključujući i vrste blisko srodne Acb kompleksu (Nowak i Kur, 1996). Soo i sar. su 2013. godine razvili metodu izotermne amplifikacije (LAMP) posredovane petljom za identifikaciju *A. baumannii* koristeći ITS region 16S–23S rRNA. Utvrđeno je da je osetljivost LAMP testa stotinu puta bolja od jednostavne multipleks PCR metode u identifikaciji vrsta *Acinetobacter* roda, ali je glavni nedostatak što LAMP metoda nije proučavana na različitim kliničkim izolatima. Još jedan marker pouzdan za identifikaciju *A. baumannii* genovrsta je gen sličan *bla*$_{\text{OXA-51}}$ (eng. *bla*$_{OXA}$*-51-like gene*). Turton i saradnici su 2006. godine opisali ulogu D klase *bla*$_{\text{OXA-51}}$ kao esencijalnog gena i pouzdanog biomarkera za identifikaciju *A. baumannii* na nivou vrste. Benefiti PCR reakcije specifične za gen *bla*$_{\text{OXA-51}}$ predstavljeni su na 106 izolata *A. baumannii* i 23 različita *Acinetobacter* spp, koji su prethodno identifikovani metodom ARDRA. Svih 106 kliničkih izolata *A. baumannii*, uključujući i soj ATCC 19606, bili su pozitivni na gen sličan *bla*$_{\text{OXA-51}}$, dok su izolati koji su bili negativni označeni kao druga vrsta *Acinetobacter*. Do sada je opisano 95 varijanti gena sličnog *bla*$_{\text{OXA-51}}$, ali moguće ograničenje ove metode može biti zbog nemogućnosti otkrivanja svih opisanih varijanti gena *bla*$_{\text{OXA-51}}$ (Turton i sar., 2006; Evans i Amyes, 2014). Multipleks PCR metode zasnovane na genima specifičnim za vrstu se smatraju brzim, jednostavnim i pouzdanim metodama, međutim, iako su različiti ciljni regioni poput gena *recA* i *gyrB* pogodni za identifikaciju vrsta unutar Acb kompleksa, ni jedan nije validan za nove vrste *A. seifertii* i *A. dijkshoorniae* što se smatra glavnim nedostatkom (Vijayakumar i sar., 2019). Dakle, molekularna karakterizacija putem PCR metode ciljajući gen sličnan *bla*$_{\text{OXA-51}}$ zajedno sa sekvenciranjem *rpoB* gena za sada u velikoj meri diskriminiše konvencionalne metode za identifikaciju vrsta *Acinetobacter*, naročito unutar Acb kompleksa.

Rod *Acinetobacter* je prvobitno imao samo jednu vrstu *A. calcocaeticus* (Bouvet i Grimont, 1986). Na osnovu DNK hibridizacije trenutno postoji 80 DNK-DNK homologih grupa, odnosno genomskih vrsta ovog roda (Nemec, 2011., poslednja revizija 2023). Acb kompleks (*A. calcocaeticus-A. baumannii*) čine genomska vrsta 1 (*A. calcocaeticus*), genomska vrsta 2 (*A. baumannii*), *A. pittii* koja je ranije označavana kao genomska vrsta 3 i *A. nosocomialis* ranije

označavana kao 13TU (Gerner-Smidt i sar., 1991; Nemec i sar., 2011 rev.2023). Još dve nove genomske vrste su dodate ovom kompleksu *A. seifertii*, ranije označena kao genomska vrsta bliska 13TU i *A. dijkshoorniae* bliska sa *A. pittii* (Nemec i sar., 2015; Cosgaya i sar., 2016; Nguyen i Joshi, 2021). U tabeli 1 prikazani su najzastupljeniji targetni geni i molekularne tehnike pri identifikaciji *Acinetobacter* vrsta.

Tabela 1. Targetni geni za PCR u identifikaciji *Acinetobacter* spp. (Vijaykumar i sar., 2019)

Targetni gen	Molekularna tehnika	Stopa preciznosti	Literatura
16S rRNA i *rpoB*	PCR i sekvenciranje	• 98.2% za *rpoB* 93.4% za 16S rRNA sekvenciranje na nivou vrste	Lee i sar., 2014
	PCR–RFLP i sekvenciranje	• Simultane analize 16S rRNA i *rpoB* su omogućile identifikaciju *Acinetobacter* do nivoa genomske vrste	Khosravi i sar., 2015
16S-23S rRNA ITS i *recA*	PCR i sekvenciranje (16S–23S ITS region)	• Stopa identifikacije – 96.2% • Pouzdan alat za identifikaciju vrsta unutar Acb kompleksa	Chang i sar., 2005
	PCR (16S–23S ITS i *recA*)	• Sve *Acinetobacter* vrste su pozitivne na *recA* gen • Samo *A. baumannii* vrste pozitivne na 16S–23S ITS gen	Chen i sar., 2007
	LAMP (16S–23S ITS region)	• 100% tačnost u identifikaciji izolata osetljiviji od konvencionalnog PCR-a • Pogodan za detekciju *A. baumannii* iz kliničkih uzoraka i uzoraka iz prirodne sredine	Soo i sar., 2013
	Multipleks real time PCR (16S-23S ITS i *recA*)	• 100% podudaranje rezultata sa konvencionalnim PCR-om • Visoka osetljivost i stopa specifičnosti (100%) u odnosu na konvencionalni PCR	Yang i sar., 2016
gyrB	PCR i sekvenciranje (*gyrB*)	• 77.2 i 100% stopa tačnosti i podudaranja na nivou vrste	Lee i sar., 2014
	PCR	• 100% tačnost za razlikovanje *A. baumannii* i *A. nosocomialis*	Higgins i sar., 2007
***bla*OXA-51$_{like}$**	PCR (*bla*OXA-51$_{like}$)	• 141 izolata je bilo pozitivno na ovaj gen, potvrđeni su izolati kao vrsta *A. baumannii* i ustanovljeno je odsustvo gena u ne-*baumannii* izolatima	Turton i sar., 2006

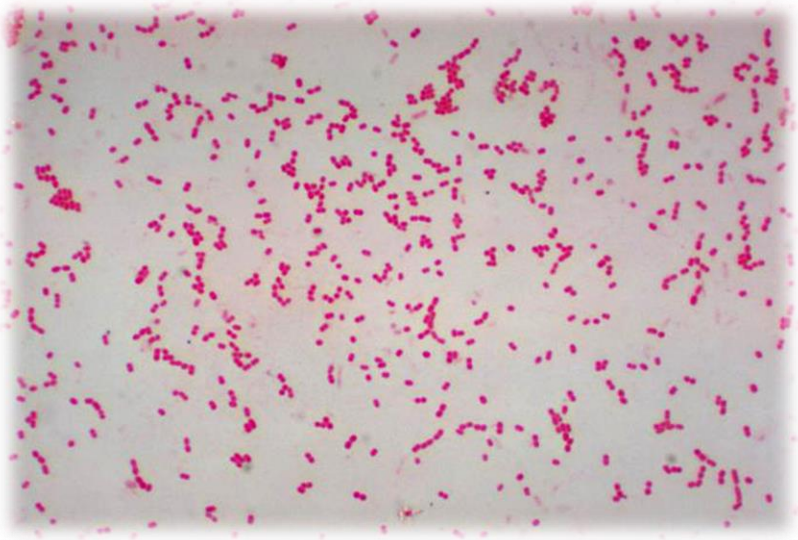
2.1.2. BIOLOGIJA

Acinetobacter baumannii je obligatno aerobna, saprofitna vrsta, sveprisutna u ljudskom okruženju u različitim sredinama (voda, zemljište, sveži i smrznuti proizvodi od ribe, mesa, povrća, zatim u mleku i siru). Takođe, može se izolovati sa medicinskog pribora, a i redovan je mikrobiont kože i disajnih organa kod ljudi (Brenner i sar., 2005). *A. baumannii* je jedan od najuspešnijih oportunističkih patogenih vrsta bakterija koje su uzrok nozokomijalnih infekcija u savremenom zdravstvenom sistemu. Zbog multiple rezistencije na antibiotike, mnogobrojne lekove i dezinficijense, fenotipske heterogenosti unutar populacije klonova i veoma dobro

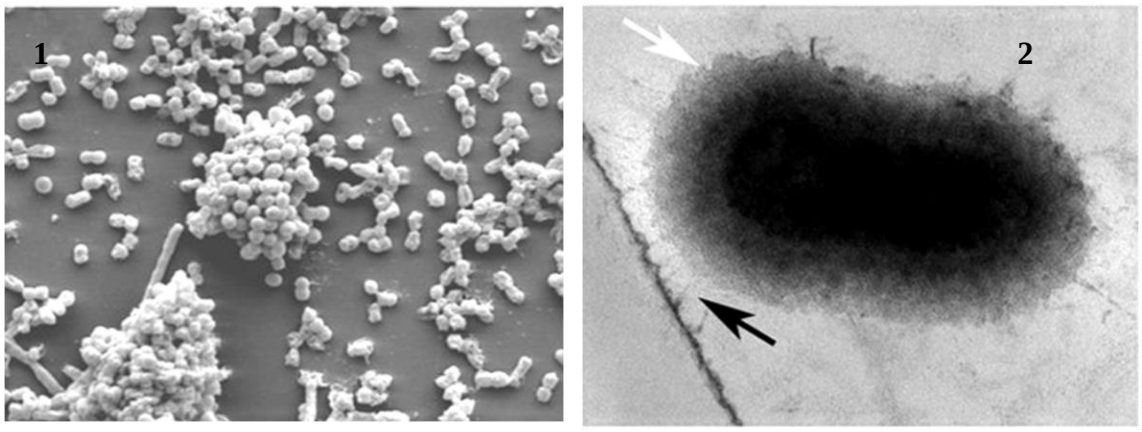
razvijenih mehanizama odbrane i virulencije, ovaj oportunistički patogen ima širok spektar mesta infekcije kao što su koža, meka tkiva, urinarni, digestivni i respiratorni trakt, krvotok i centralni nervni sistem.

2.1.2.1.Fizičke i biohemijske karakteristike

Genomska vrsta *Acinetobacter baumannii* je Gram negativna, štapićasta bakterija koja u stacionarnoj fazi menja oblik u zaobljen i kokoidan. Zabeležene veličine su od 0,9-1,6 do 1,5-2,5 μm, a u mikrobiološkom preparatu se uočava pojedinačno, ređe u paru ili kraćim lancima (slika 1). Ove bakterije ne obrazuju spore, ne poseduju flagele, ali poseduju fimbrije ili pile i mogu posedovati kapsulu (Kurcik-Trajkovska, 2009). Na slici 2 prikazani su snimci dobijeni skenirajućomi i transmisionom elektronskom mikroskopijom (SEM i TEM) *A. baumannii* soja koji ima sposobnost formiranja biofilma. Na ovim snimcima se jasno uočavaju opisana morfologija ove genomske vrste, ali i ćelijske strukture poput pila i sloja egzopolisaharida koji imaju ključnu ulogu u procesu formiranja biofilma, što će detaljnije biti opisano u narednom podpoglavlju.



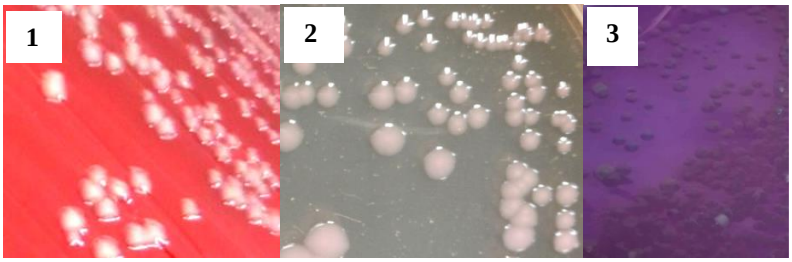
Slika1. *A. baumannii*, bojenje po Gram-uzabeleženo svetlosnim mikroskopom (preuzeto iz: Public Health Image Library-PHIL)



Slika 2.1. SEM *A. baumannii* ćelija; **2.** TEM *A. baumannii* ćelije na kojoj se uočavaju pili i sloj egzopolisaharida (preuzeto iz: Roca i sar., 2012).

Kultiviše se na različitim hranljivim neselektivnim podlogama kao što su krvni agar (slika 3.1), Muller Hinton (MH) i Luria Bertani agar (LBA), na kojima formira glatke, sjajne, ispupčene i često sluzave kolonije krem boje (slika 3.2). Za izolaciju ove vrste koriste se diferencijalne i selektivne podloge kao što je Herella agar (Mendel, 1964) koji sadrži maltozu i laktozu, pepton, pankreasni hidrolizat kazeina, natrijum hlorid, žučne soli i bromkrezol ljubičasto. Na ovom agaru *A. baumannii* formira kolonije bledo ljubičaste boje, pa se lako razlikuje od fermentišućih enterobakterija (slika 3.3). Takođe, u upotrebi je i selektivna podloga po Holtonu u kojoj indikator fenol red menja bromkrezol ljubičasto, a laktoza je zamenjena manitolom, fruktozom i fenilalaninom. Na selektivnoj podlozi Eozin Methilen Blue agar *A. baumannii* formira glatke kolonije krem boje kao što su na neselektivnim podlogama, dok pri kultivaciji na MacConkey agaru formira kolonije bledo-roze boje. Bakterije ove vrste su otporne na isušivanje, preživljavaju nekoliko dana na nutritivno siromašnim podlogama, do 10 dana na česticama prašine i oko 4 meseca na površinama poput medicinske opreme, gume i keramike (Espinal i sar., 2012). *Acinetobacter baumannii* ima visok stepen tolerancije na promene pH vrednosti, vlažnosti i saliniteta i raste na većini izvora hranljivih materija.

Biohemijski testovi ukazuju da je ova vrsta bez sposobnosti fermentacije, dok procesom oksidacije proizvodi kiseline iz različitih izvora šećera (glukoza, laktoza, galaktoza, manoza, ramnoza i ksiloza). Usvaja citrate, međutim ne redukuje nitrate, ne hidrolizuje eskulin i negativna je na metil-red i Voges-Proskauer test. Optimum za rast joj je blago kisela sredina i temperature između 20 °C i 37 °C. Za razliku od većine članova Acb kompleksa, ima sposobnost rasta na 44 °C (Brenner i sar., 2005).



Slika 3. Izgled kolonija *A. baumannii*: **1.** na krvnom agaru; **2.** na neselektivnoj hranljivoj podlozi; **3.** na selektivnoj podlozi Herella agar

2.1.2.2.Patogenost i virulencija

Poslednjih godina, genetičke, fenotipske i analize uspostavljanja infekcije su dosta doprinele u identifikaciji faktora virulencije važnih za patogenost, odnosno sposobnost izazivanja infekcije genomske vrste *A. baumannii*. Identifikovano je oko 16 genskih ostrva uključenih u virulenciju, što znači da ovaj organizam ima značajan deo svojih gena posvećenih patogenezi (Smith i sar., 2007). Iako nije identifikovan specifičan faktor virulencije koji je odgovoran za klinički uspeh *A. baumannii*, ta karakteristika naglašava snažan adaptivni potencijal kao rezultat patogenih strategija i prilagođavanja različitim mestima ljudskog tela, što je poznato za druge bakterije kao što su *Escherichia coli* i *Legionella* (Sahl i sar., 2011). *A. baumannii* je razvio tri osnovna svojstva kako bi se savršeno prilagodio trenutnim zdravstvenim uslovima: sposobnost kolonizacije kože, sluzokože i medicinskih uređaja i sposobnost preživljavanja u bolničkom okruženju; zatim, sposobnost izražavanja višestrukih karakteristika virulencije; i ekstenzivnu rezistenciju na antimikrobne agense kroz enzimsku modifikaciju antibiotika, mutaciju ciljnog gena za antibiotike, promenjenu permeabilnost spoljašnje membrane i pojačanu aktivnost efluksnih pumpi za više lekova. Sa brzim porastom studija koje se bave svim faktorima virulencije i otpornosti ove bakterije, postepeno se otkrivaju njeni kompleksni uticaji na ljudsko zdravlje (Moubareck i Halat, 2020).

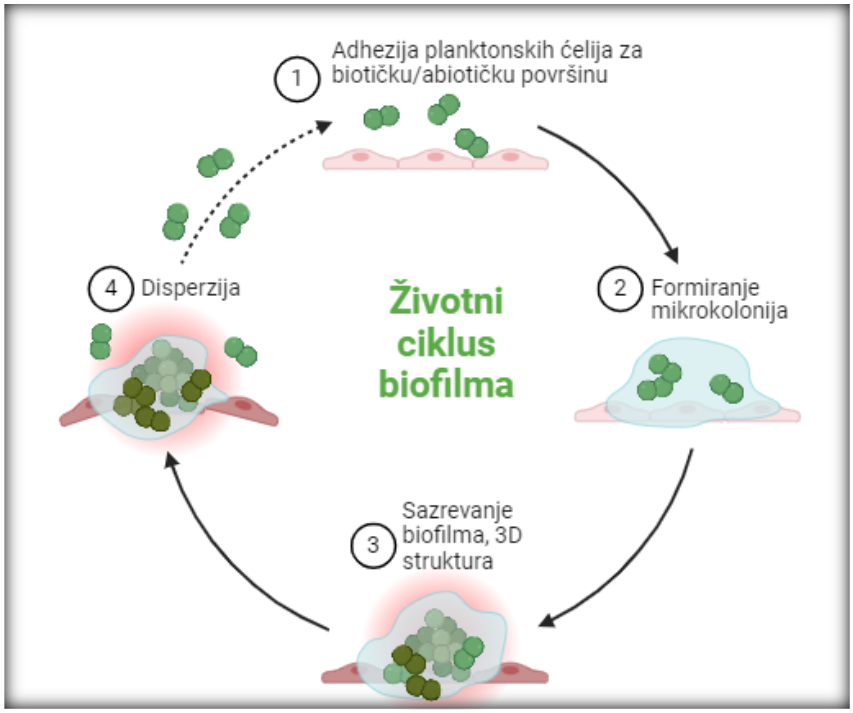
Osobine koje povećavaju virulenciju *A. baumannii*, a međusobno su povezane biohemijskim procesima koji su i sami po sebi važan faktor virulencije su prisustvo polisaharidne kapsule, lipopolisaharida (LPS) i lipooligosaharida (LOS), porina i pila, proteinskog sistema sekrecije, sposobnost formiranja biofilma, produkcija vezikula na spoljašnjoj membrani, kao i različitih enzima i siderofora (Bergogne-Berezin i Towner, 1996; Lee i sar., 2017). Glavni faktori virulencije sa ulogama u patogenezi su predstavljeni u tabeli 2.

Tabela 2. Glavni faktori virulencije *Acinetobacter baumannii* (Ahuatzin-Flores i sar., 2024).

Faktori virulencije	Uloga u patogenezi
Proteini spoljašnje membrane: (OmpA, Omp 33–36, Omp 22)	Adherencija i invazija, indukcija apoptoze, formiranje biofilma, perzistencija, rezistencija na ljudski serum
Lipopolisaharidi (LPS)	Rezistencija na ljudski serum, preživljavanje tokom infekcije tkiva, izbegavanje odgovora imunskog sistema
Sistem za usvajanje mikronutrijenata (gvožđe, mangan, cink)	Kompeticija i preživljavanje
Polisaharidi kapsule	Rezistencija na ljudski serum, preživljavanje tokom infekcije tkiva, izbegavanje antimikrobnog dejstva
Fosfolipaze (PLC and PLD)	Rezistencija na ljudski serum, citolitička aktivnost, invazija i *in vivo* preživljavanje
Sistem sekrecije tip II, V i VI	Adherencija i kolonizacija, *in vivo* preživljavanje, kompeticija, formiranje biofilma
Biofilm	Adherencija, preživljavanje u različitim uslovima sredine, rezistencija na antibiotike
Quorum sensing	Formiranje biofilma
Pili tip IV	Pokretljivost, adherencija, formiranje biofilma
Vezikule spoljašnje membrane	Oslobađanje faktora virulencije, horizontalni transfer gena za antibiotsku rezistenciju

Veoma važan faktor virulencije ove genomske vrste, faktor preživljavanja u različitim uslovima sredine, kao i faktor rezistencije je sposobnost formiranja biofilma. Biofilm predstavlja dinamičnu zajednicu bakterijskih ćelija vezanih za neku površinu, uronjenih u matriks. U sastav matriksa biofilma ulaze polimerne supstance bakterijskih ćelija koje čine biofilm, kao što su egzopolisaharidi, proteini i ekstracelularna DNK. Osnovna razlika između ćelija koje čine biofilm i planktonskih bakterijskih ćelija je metaboličkoj aktivnosti koja je smanjena u ćelijama biofilma i uzrokuje veću rezistenciju, smanjenu i izmenjenu ekspresiju gena što uzrokuje brojne razlike u fenotipskim osobinama i fiziološkim procesima. Proces formiranja biofilma je do danas veoma dobro proučen, a tesno je povezan sa pomenutim pilima, porinima i kapsularnim polisaharidima. Naime, pili i polisaharidi kapsule obezbeđuju *A. baumannii* adheziju za ćelije domaćina, kao i za međusobno povezivanje ćelija prilikom stvaranja biofilma na biotičkim i abiotičkim površinama (Tomaras i sar., 2003, 2008). Tri ključna mehanizma za uspostavljanje biofilma su komunikacija i interakcija između ćelija, zatim adheriranje za površinu i sekrecija makromolekula. Proces formiranja biofilma prikazan je na slici 4. Prvi stadijum predstavlja inicijalno pričvršćivanje planktonskih bakterijskih ćelija za podlogu, reverzibilnim i ireverzibilnim vezivanjem. Ovaj proces zavisi od fizičko-hemijskih uslova sredine i pokretljivosti bakterijske ćelije flagelama, dok kod *A. baumannii* zbog odsustva flagela ovu ulogu nose pili tip IV pomoću kojih se ostvaruje trzajuće kretanje. Pili zajedno sa egzopolisaharidima (EPS) učestvuju u formiranju ćelijskih mikrokolonija u kojima se bakterijske ćelije intenzivno razmnožavaju. Doprinos pila tipa IV i egzopolisaharida u formiranju

mikrokolonija kod *A. baumannii* demonstriran je elektronskom i fluorescentnom mikroskopijom (Tomaras i sar., 2003). U formiranim mikrokolonijama dolazi do ekspresije gena odgovornih za biofilm i neophodnih za lučenje i održavanje EPS kao glavne strukture biofilma koja štiti ćelije unutar mikrokolonije (Rickard i sar., 2004). Prema Espinal i sar. (2012), klinički izolati *A. baumannii* koji formiraju biofilm mogu duže da prežive na suvim površinama nego oni izolati koji ne razvijaju biofilm, jer su egzopolisaharidi visoko hidrirani i sprečavaju isušivanje ćelija unutar biofilma. Sledeći stadijum procesa formiranja biofilma je sazrevanje, odnosno maturacija biofilma u kome su bakterijske ćelije uronjene u ekstracelularni matriks. Sam matriks biofilma se sastoji od ekstracelularne DNK (eDNK), različitih EPS poreklom od ćelija koje formiraju biofilm (Mhamedi i sar., 2014). Pored ove dve komponente ekstracelularni matriks sadrži I proteine, enzime, eRNK, mrtve ćelije i vodu (Lu i Collins, 2007). Kroz matriks se formiraju pore i kanali ispunjeni vodom, koji služe za transport hranljivih i otpadnih materija unutar biofilma (Parsek i Sigh, 2003). Nakon toga dolazi do formiranja trodimenzionalne strukture biofilma, disperzije i odvajanja ćelija od biofilma, što im omogućava brže razmnožavanje i širenje (Tomaras i sar., 2003). Odvajanje planktonskih ćelija od biofilma je prirodan proces u kome bakterije više ne produkuju egzopolisaride nego produkuju biosurfaktante, a nekada se odvajaju i usled mehaničkog stresa.



Slika 4. Proces formiranja biofilma. **1.** Inicijalno i ireverzibilno vezivanje planktonskih ćelija za biotičku/abiotičku podlogu; **2.** Proliferacija i sekrecija makromolekula, formiranje mikrokolonija; **3.** Sazrevanje biofilma, razvijanje strukture biofilma u kome su ćelije uronjene u formiran matriks biofilma; **4.** Disperzija biofilma i odvajanje ćelija (www.biorender.com).

Kompletan proces stvaranja i funkcionisanja biofilma, kao i regulacija ekspresije gena regulisani su hemijskim procesom nazvanim *quorum-sensing* (QS), koji podrazumeva komunikaciju između ćelija produktima, tzv. autoinducerima koji difunduju kroz biofilm iz ćelije u ćeliju (Roca i sar., 2012). Autoinduceri regulišu pored biofilma i brojne fiziološke procese bakterijske ćelije, a najznačajniju ulogu imaju u disperziji ćelija iz biofilma. Biofilm omogućava veći protok gena između bakterijskih ćelija, što obezbeđuje ćelijama unutar biofilma veću antibiotsku rezistenciju i otpornost na antimikrobne agense. *A. baumannii* veoma često izaziva infekcije povezane sa biofilmom, posebno pneumoniju (putem respiratora) i infekcije izazvane kateterom (Tomaras i sar., 2003). Opisani su brojni proteini *A. baumannii* koji su važni u procesu formiranja biofilma kao što su BAP proteini, OMP porini, adhezini, lektini, alginat, fimbrije (kao izduženi nastavci lektina), itd. BAP protein i lektini koji se nalaze na površini bakterijske ćelije, velike su molekulske mase, a uloga im se ogleda u adherenciji bakterijske ćelije za površine i pri kolonizaciji domaćina, u međusobnoj adheziji ćelija, kao i u sazrevanju biofilma i virulenciji (Prashanth i sar., 2012). BAP proteini takođe povećavaju hidrofobnost ćelije, što dovodi do povećanog stepena autoagregacije ćelija, a samim tim i produkcije biofilma (Romeo, 2008; Prashanth i sar., 2012). Lektini su proteini koji poseduju dva i više mesta za vezivanje ugljenih hidrata, imaju mogućnost hemaglutinacije, a glavna uloga im je adherencija bakterijske ćelije i izazivanje infekcije (Prashanth i sar., 2012).

Sposobnost adheriranja pomoću pila i kapsule, pored uloge u procesu formiranja biofilma, predstavlja i prvi korak pri uspostavljanju infekcije. OmpA porin poboljšava preživljavanje i postojanost *A. baumannii* i svojom interakcijom sa fibrinonektinom obezbeđuje invaziju i adherenciju za epitelijalne ćelije (Smani i sar., 2012), a tako učestvuje i u formiranju biofilma na biotičkim površinama (Clemmer i sar., 2011). Tokom normalnog rasta i *in vivo* infekcije, OmpA se prvenstveno koncentriše u vezikulama spoljašnje membrane (eng. OMVs) (Moon i sar., 2012). Interakcija OmpA sa eukariotskim ćelijama indukuje citotoksičnost, vezivanjem i adhezijom za receptore apoptoze na površini eukariotske ćelije (Ahmad i sar., 2016). OmpA reguliše biogenezu vezikula spoljašnje membrane, učestvuje u ekskreciji antibiotika iz periplazmatskog prostora kroz spoljašnju membranu, pa je deo efluksnog sistema, a kako je i imunogen kod zdravih osoba predložen je kao dobar kanditat za razvijanje vakcine protiv *A. baumannii* (Fajardo Bonin i sar., 2014; Hassan i sar., 2016). Poslednjih godina analize su proširile poznavanje drugih OMP koji doprinose patogenezi *A. baumannii*. Slično OmpA, Omp34 (u literaturi nazvan i Omp33-36) indukuje apoptozu u eukariotskim ćelijama putem mehanizama inhibicije autofagije, promovišući bakterijsku perzistentnost u autofagozomu (Moris i sar., 2019). Takođe je pokazalno da Omp34 vezuje fibronektin i omogućava invaziju (Smani i sar., 2012). Drugi Omp proteini i CarO protein takođe imaju ulogu u virulenciji ove

bakterije, rezistenciji na karbapeneme, indukuju apoptozu ćelija i omogućavaju preživljavanje (Ahuatzin-Flores i sar., 2024; Maubareck i Halat, 2020). Slično svim komponentama spoljašnje membrane, lipopolisaharidi, lipooligosaharidi i polisaharidi kapsule se sintetišu u citoplazmi i translociraju na površinu spoljašnjeg omotača putem proteinskog sistema sekrecije. Kapsula formira zaštitni sloj ekstracelularno, na površini bakterijske ćelije, obezbeđujući otpornost na katjonske antimikrobne peptide i serum, čime se povećava preživljavanje *in vivo* (Geisinger i Isberg, 2015). Polisaharidi kapsule učestvuju u adherenciji za humane ćelije, u produkciji biofilma i omogućavaju preživljavanje bakterije u tkivima nakon uspostavljanja infekcije. Takođe, uključeni su u proces rezistencije na antimikrobne agense, te u prisustvu antibiotika dolazi do hiperprodukcije kapsularnih polisaharida. Naime, proizvodnja kapsula je negativno regulisana BfmRS dvokomponentnim regulatornim sistemom (TCS) kao odgovor na stimulanse iz okoline, uključujući antibiotike hloramfenikol i eritromicin, što dovodi do povećane ekspresije i otpornosti na antimikrobne lekove (Geisinger and Isberg, 2015). Ponavljajuće, tesno upakovane jedinice šećera u kapsuli stvaraju barijeru protiv potencijalno štetnih uslova sredine kao što su suša i dezinfekcija, reakcija imunskog sistema kao što je fagocitoza, a takođe štite od nekih antimikrobnih sredstava (Singh i sar., 2018). Lipopolisaharidi (LPS) i lipooligosaharidi (LOS) su sastavni deo ćelijskog zida svih Gram-negativnih bakterija i njihova uloga u virulenciji se ogleda u toksičnosti za ćelije domaćina, pa predstavljaju tzv. endotoksine. LPS se sastoje od tri komponente: lipid A, glikozilovan oligosaharidima jezgra, za koje je vezan O-antigen. Nasuprot tome, LOS ne sadrži O-antigen i umesto toga ima prošireno jezgro oligosaharida. O-antigen LPS-a, zajedno sa pilima, podstiče adheziju na ćelije domaćina kao prvi korak kolonizacije. LPS i LOS su ključni u obezbeđivanju permeabilnosti spoljašnje membrane, asimetričnost spoljašnje membrane usled građe LPS/LOS obezbeđuje odgovore na antimikrobne supstance i različite stresne uslove sredine (Ahuatzin-Flores i sar., 2024; Nikaido, 2003). Međutim, pokazano je da *A. baumannii* preživljava i u njihovom odsustvu (Powers i Trent, 2018; Simpson i sar., 2021) i ta osobina je od strane SZO proglašena kao važna u razvoju novih antibiotika (WHO, 2017).

Ekspresija visoko specifičnih sistema za usvajanje gvožđa, cinka i mangana su takođe važni faktori virulencije. Sistem za usvajanje gvožđa se sastoji od siderofora koji konvertuju polimerne feri oksi-hidrokside, koji su slabe rastvorljivosti, u rastvorljive helate gvožđa. Ovi siderofori se sintetišu u sojevima *A. baumannii* koji rastu pri uslovima sa deficijencijom gvožđa (eng. *iron limiting conditions*) (Neilands, 1995). Na virulenciju *A. baumannii* utiču i vezikule spoljašnje membrane (eng. OMVs) koje su nakon sekrecije u interakciji sa ćelijama domaćina i noseći u sebi OmpA, fosfolipaze i proteaze imaju citotoksičan efekat (Jin i sar., 2011; Kwon i sar., 2009). Takođe, u virulenciji ove bakterije učestvuju i sistemi za sekreciju proteina, *Acinetobacter* kodira različite sisteme sekrecije: tip I, II, tip IV, tip V, tip VI (Weber i sar.,

2015a; Lee i sar., 2017). Sistem sekrecije tipa IV (T4SS) odgovoran je za konjugativni transfer DNK, plazmida i drugih mobilnih genetičkih elemenata. Iako je od velike važnosti u prenosu genetičkog materijala, posebno za otpornost na antibiotike, uloga ovog sistema u interakcijama domaćin-patogen tek treba da bude detaljnije razjašnjena. Tip VI (T6SS) cilja i eukariotske i prokariotske ćelije, iako u *Acinetobacter baumannii* T6SS cilja isključivo druge bakterije lučeći niz toksina, uključujući peptidoglikanske hidrolaze, nukleaze i enzime koji deluju na ćelijske membrane (Moris i sar., 2019). Efektorni proteini sistema tipa II (T2SS) uključuju enzime kao što su lipaza, elastaza, alkalna fosfataza i fosfolipaze, ključne za virulenciju *A. baumannii*. Sistem sekrecije tipa V (T5SS), takozvani autotransporteri, je najjednostavniji i najzastupljeniji sistem sekrecije kod Gram-negativnih bakterija, identifikovano je pet grupa ove porodice pod nazivom Tip Va-Ve, međutim, *Acinetobacter* kodira samo dva, tip Vb (AbFhaB/C i CdiA/B) i tip Vc (Ata) (Moris i sar., 2019). Povećanju virulencije *A. baumannii* doprinose i enzimi fosfolipaze. To su lipolitički enzimi na spoljašnjoj membrani bakterijske ćelije koji su ključni u metobolizmu fosfolipida i predstavljaju faktore virulencije brojnih bakterijskih vrsta. Od tri klase definisane na osnovu mesta hidrolize, fosfolipaza A (PLA), fosfolipaza C (PLC) i fosfolipaza D (PLD), dve su identifikovane kao faktori virulencije *A. baumannii*, PLC i PLD (Ahuatzin-Flores i sar., 2024; Camarena i sar., 2010; Jacobs i sar., 2010; Stahl i sar., 2015). Razgradnja fosfolipida utiče na stabilnost membrane ćelije domaćina, a hidroliza fosforilisane glavne grupe fosfolipida fosfolipazom C, može ometati ćelijsku signalizaciju, što dovodi do promena u odgovoru imunskog sistema domaćina (Songer, 1997; Flores-Diaz i sar., 2016).

2.1.3. REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE

Acinetobacter baumannii veoma brzo razvija rezistenciju na veliki broj antibiotika, uključujući većinu β-laktamskih antibiotika i aminoglikozida (Towner, 2006), a neki sojevi su rezistentni na većinu svih klinički dostupnih antibiotika (Lin i Lan, 2014) i time je jedan od najuspešnijih patogenih mikroorganizama. Bolničke infekcije uzrokovane ovom vrstom na hiruškim odeljenjima i u jedinicama intenzivne nege su u porastu. Kako postoje dva tipa rezistencije – konstitutivna (urođena) i indukovana (stečena), antibiotska rezistencija genomske vrste *A. baumannii* podrazumeva oba tipa. Urođena razistencija podrazumeva odsustvo targetne komponente u bakterijskoj ćeliji na koju deluje antibiotik, dok je za razvoj stečene rezistencije neophodan kontakt bakterijske ćelije sa antibiotikom. Stečena rezistencija podrazumeva fenotipsku i genotipsku rezistenciju. Fenotipska rezistencija je u sprezi sa metaboličkom aktivnošću bakterije, jer antibiotici ne deluju na ćelije u stanju anabioze, a takođe pojedini antibiotici mogu delovati na ćeliju dok je u jednoj fazi rasta, i gube svoje dejstvo u drugoj fazi

rasta bakterijske ćelije. Genotipska rezistencija podrazumeva niz mutacija koje obezbeđuju otpornost bakterijske ćelije ili se stiče i prenosi horizontalnim i vertikalnim transferom gena (Knežević, 2012). Ovaj patogen je evolutivno razvio niz mehanizama fenotipske i genotipske rezistencije uključujući efluksne pumpe, β-laktamaze, regulaciju permeabilnosti membrane i ćelijskog zida i modifikaciju targetnih molekula za antibiotik (Lee i sar., 2017). Kod *A. baumannii* su registrovana i sva tri modela horizontalnog transfera gena (konjugacija, transformacija i transdukcija), međutim za sada je dokazano da samo proces konjugacije učestvuje u transferu gena antibiotske rezistencije (Bergogne-Bérézin i Towner, 1996). Tako se u genomu jedne bakterijske ćelije može naći veći broj gena odgovornih za rezistenciju na brojne antibiotike, pa se kao posledica javlja multipla rezistencija. Kako je ranije spomenuto, multipla rezistencija predstavlja otpornost bakterije na najmanje dva hemijski različita antibiotika na koje je prirodno osetljiva, ali je usled česte interakcije sa antibioticima favorizovan razvoj mehanizama razistencije (Knežević, 2005; Knežević i Petrović, 2008a; Knežević, 2012). Udruživanje više pomenutih mehanizama rezistencije *A. baumannii* dovelo je do pada broja dostupnih klasa antibiotika za lečenje infekcija izazvanih ovom vrstom. Pored multiple rezistencije, sojevi *A. baumannii* se karakterišu i pan-rezistencijom, odnosno, mogu biti otporni na sve antibiotike koji se koriste u terapiji protiv *A. baumannii* sojeva, što znači da su rezistentni na sve β-laktame (uključujući i karbapeneme i sulbaktam), fluorohinolone i aminoglikozide (Peleg i sar., 2008). Prema ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) sojevi *Acinetobacter* spp. se klasifikuju u tri grupe: MDR (rezistentan ili umereno osetljiv na 1 ili više agenasa u 3 ili više kategorija), XDR (rezistentan ili umereno osetljiv na 1 ili više agenasa u 8 ili više kategorija) i PDR (rezistentan ili umereno osetljiv na sve antimikrobne agense iz 10 navedenih antimikrobnih kategorija) (Magiorakos i sar., 2012; Aleksić, 2016).

2.1.3.1.Mehanizmi rezistencije

Glavni mehanizam odbrane od antibiotika kod sojeva *A. baumannii* je enzimska aktivnost β-laktamaza, odnosno inaktivacija β-laktama. Definisane su četiri grupe ovih enzima A, B, C i D (Jeon i sar., 2015) i sve četiri grupe su zabeležene kod *A. baumannii*. Takođe, ova bakterijska vrsta poseduje enzimsku aktivnost koja se ogleda u odbrani od aminoglikozida i hloramfenikola, dok beta laktamaze proširenog spektra delovanja (eng. *Extended-Spectrum-β-Lactamases* - ESBLs) utiču na rezistenciju sojeva na peniciline i cefalosporine prve, druge i treće generacije (Aleksić, 2016). Cefalosporinaze AmpC tipa (eng. *Acinetobacter-Derived Cephalosporinases* - ADCs) su najzastupljenije i obezbeđuju urođenu antibiotsku rezistenciju sojeva *A. baumannii* (Hujer i sar., 2005; Hujer i sar., 2006; Ruiz i sar., 2007). Geni koji se nalaze u okviru integrona, geni za efluksne pumpe (*cmlA*) i *cat* gen koji kodira hloramfenikol-modifikujuće enzime su odgovrni za rezistenciju *A. baumannii* na hloramfenikol (Poirel i sar., 2011). Posredstvom

aminoglikozidaza aminoglikozidni antibiotici se inaktiviraju prenošenjem acetilne, fosfatne i adenilil grupe sa supstrata na antibiotike (Lambert, 2002), a kod *A. baumannii* su detektovane sve tri grupe aminoglikozidaza (acetilaze- AAC, adenilaze- ANT i fosfotransferaze- APH) (Vila i Pachon, 2008). *A. baumannii* ima prirodnu sposobnost inkorporacije egzogene DNK i ustanovljena je visoka frekvencija strane DNK u njenom genomu ukazujući na veoma zastupljen horizontalni transfer gena, a albumin, glavni protein u krvi, poboljšava pomenutu prirodnu sposobnost ovog patogena (Traglia i sar., 2014; Traglia i sar., 2016).

Sistem efluksnih pumpi igra ključnu ulogu u odstranjivanju potencijalno štetnih hemijskih jedinjenja po bakterijsku ćeliju. Ove pumpe su transmembranske proteinske strukture i opisane su četri različite kategorije, odnosno superfamilije:

- superfamilija RND (eng. *Resistance-nodulation-cell division family*) sa dva efluksna sistema AdeABC i AdeIJK

- superfamilija MFS (eng. *Major-Facilitator Superfamily*) sa dva efluksna sistema TetA i TetB

- superfamilija MATE (eng. *Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) sa abeM sistemom

- superfamilija SMR (eng. *Smal Multidrug Resistance Family*) (Lin i Lan, 2014).

Sve navedene vrste efluksnih sistema prisutne su kod *A. baumannii* i odgovorne za određene vrste hemijskih struktura antibiotika. AdeABC sistem ekskretuje iz ćelije aminoglikozide, β-lakatame, cefotaksim, eritomicin, karbapenem, hloramfenikol, tetracikline, fluorohinolone, trimetoprim i etidijum bromid (Higgins i sar., 2004; Heritier i sar., 2005; Peleg i sar., 2008;Hu i sar., 2018). Supstrat za AdeIJK sistem su amfifilna jedinjenja, a učestvuje i sa AdeABC sistemom u izbacivanju tigeciklina (Damier-Piolle i sar., 2008). TetA i TetB pumpe su odgovorne za ekskreciju tetraciklina, minociklina i doksiciklina (Marti i sar., 2006). AbeM pumpa obezbeđuje rezistentnost na hinolone, hloramfenikol, kanamicin, gentamicin i trimetoprim (Su i sar., 2005), a AbeS iz SMRT familije obezbeđuje rezistentnost na hinolone i hloramfenikol (Srinivasan i sar., 2009).

Regulacija permeabilnosti membrane i ćelijskog zida odvija se pomoću porina, proteina koji formiraju transportne kanale za transport molekula kroz fosfolipidni dvosloj. Promenom u proteinskoj strukturi porina ili gubitkom nekog proteina spoljašnje membrane (eng. *Outer Membrane Proteins*- OMPs) menja se i propustljivost same membrane za određene molekule. Antibiotici se transportuju kroz porine do antibiotik-vezujućih proteina. Kod *A. baumannii* zabeleženo je da promena u strukturi porina i promena u afinitetu i ekspresiji penicilin vezujućeg proteina 2 (PBP-2) dovodi do rezistencije na β-lakatme i karbapeneme (Limansky i sar., 2002;

Fernandez-Cuenca i sar., 2003; Heritier i sar., 2005). Tako, redukovana ekspresija nekih porina kao što su CarO, Omp 22-33, Omp 33-36, Omp 37, Omp 43, Omp 44, Omp 47 dovodi do otpornosti na karbapeneme (Smani i sar., 2013; Jin i sar., 2011; Bou i sar., 2000a; Hood i sar., 2010; Quale i sar., 2003; Dupont i sar., 2005). Takođe, gubitak Omp29 dovodi do produkcije OXA-23 i OXA-52 karbapenemaza koje povećavaju otpornost na imipenem, dok pri interakciji OXA-23 karbapenemaze sa OmpA i CarO povećava rezistencija na imipenem, meropenem, aztreonam, hloramfenikol i nalidiksičnu kiselinu (Limansky i sar, 2002; Smani i sar., 2014; Wu i sar., 2016). Sojevi *A. baumannii* koji su sa nedostatkom ovih proteina imaju smanjenu stopu rasta i značajno smanjenu sposobnost adherencije, invazije i citotoksičnosti, što ukazuje na njihovu važnu ulogu u fitnesu i virulenciji *A. baumannii* (Smani i sar., 2013).

Modifikacija targetnih molekula za antibiotike dovodi do indukucije rezistencije *A. baumannii*. Takođe, modifikacijom enzima DNK giraza i topoizomeraza IV, odnosno mutacijom njihovih gena *girA* i *parC*, menja se afinitet ovih enzima za njihov specifični supstrat– hinolone (Vila i sar.,1995; Higgins i sar., 2004). Mutacijama u 30S subjedinici, metilacijom 16S RNK indukuje se otpornost na aminoglikozide, a mutacijom *pmrA* i *pmrB* gena otpornost na polimiksine (Hasani i sar., 2016). Modifikacijom lipopolisaharidnog dvosloja povećava se rezistencija na klinički važne antibiotike kao što je kolistin (Lee i sar., 2017).

Sposobnost formiranja biofilma *A. baumannii* sojeva se pored uloge u virulenciji ogleda i u postizanju antibiotske rezistencije. Većina antibiotika deluje na planktonske ćelije, međutim bakterije u prirodnoj sredini i nakon uspostavljanja infekcije žive u formi biofilma i to imobezbeđuje dodatnu otpornost na dostupne antimikrobne agense. Prema Nacionalnom zdravstvenom institutu (eng. *National Institutes of Health*- NIH) oko 65% svih bakterijskih infekcija i 80% svih hroničnih infekcija je povezano sa biofilmom. Biofilm, koji je detaljnije opisan u potpoglavlju 2.1.2.2., predstavlja bakterijsku zajednicu koja se ponaša kao jedan organizam, adheriran za neku površinu (abiotičku ili za ćelije tkiva) u kome su ćelije uronjene u matriks i sa dobro razvijenom interćelijskom komunikacijom (Roca i sar., 2012). Ovakva forma obezbeđuje bakteriji visok stepen održivosti, preživljavanja i otpornosti na različite uslove sredine kao i otpornosti na dejstvo antimikrobnih agenasa. Bakterije u biofilmu su manje dostupne antibioticima i imunskom sistemu čoveka. Formiranje biofilma je složen i dinamičan proces, kod *A. baumannii* povezan je sa regulacijom gena poput plazmida, transpozona, integrona i ekspresijom proteina spoljašnje membrane (Monem i sar., 2020). Mehanizme rezistencije biofilma predstavljaju brojne osobine, struktura i funkcionisanja samog biofilma, bez obzira na prethodni kontakt sa antibioticima. Tako, postojanje ćelija smanjene metaboličke aktivnosti, odnosno perzistera, kao i ograničena propustljivost matriksa i mogućnost inaktivacije

antibiotika ekstracelularnim matriksom omogućavaju veću rezistenciju na antimikrobne agense. Perzisteri su specijalizovane ćelije biofilma koje ne rastu, tj. nisu metabolički aktivne, pa tako nisu osetljive ni na dejstvo baktericidnih sredstava i po prestanku delovanja agensa obnavljaju biofilm (Lewis, 2008). Ove ćelije žive u dubljim slojevima biofilma, a otpornije su na uticaj antibiotika zbog smanjene dostupnosti nutrijenata i kiseonika, pa imaju sporiji metabolizam i rast (Aquawi i sar., 2020). Ekstracelularni matriks predstavlja zaštitu ćelijama biofilma, negativno je naelektrisan zbog čega antibiotici poput pozitivno naelektrisanih aminoglikozida ne mogu proći ovu barijeru (Shree i sar., 2023). Takođe, onemogućava dublji prodor agenasa svojom smanjenom propustljivošću, a ima i sposobnost neutralizacije određenih agenasa produkcijom određenih enzima. Ekstracelularni matriks olakšava razmenu genetičkog materijala, što dovodi do većeg protoka gena između bakterija u formiranom biofilmu. Kao posledica transfera gena za rezistenciju na antibiotike, bakterije u ovakvoj strukturi mogu biti do 1000 puta rezistentnije na antimikrobne agense.Velika gustina bakterija u biofilmu povećava frekvenciju mutacija i brzinu horizantalnog transfera gena, pa se povećava i šansa da u kontaktu sa antibioticima budu bakterijske ćelije otporne na dati antibiotik (Richter i sar., 2020). I *quorum-sensing* u biofilmu učestvuje u mehanizmima rezistencije tako što aktivira važne gene i molekule koji obezbeđuju virulenciju. Kod Gram negativnih bakterija ovi molekuli su N-acil-L-homoserin laktoni. Takođe, QS reguliše sintezu ćelijskih molekula lizina, na primer, ramnolipida, i formiranje ekstracelularnih enzima koji funkcionišu kao zaštitni omotač protiv fagocitoze i veoma su važni u patogenezi (Shree i sar., 2023).

2.2. FILAMENTOZNI BAKTERIOFAGI

Filamentozni bakteriofagi pripadaju redu *Tubulavirales*, a karakterišu se spiralnom simetrijom, rigidni su ili fleksibilni i poseduju cirkularnu jednolančanu DNK (eng. *single stranded DNA*- ssDNA). Najveća familija ovog reda je familija *Inoviridae*, a domaćini za fage iz ove familije su Gram negativne bakterije (*Pseudomonas, Xanthomonas, Vibrio, Ralstonia, Escherichia, Salmonella, Stenotrophomonas* itd.) u koje spada i *Acinetobacter baumannii*. Ovi fagi nisu tipični obligatno litički ili umereni fagi, jer ne ulaze ni u litički, ni lizogeni ciklus. Imaju sposobnost da kontinuirano proizvode nove virione, bez izazivanja smrti domaćina i to je jedna od najznačajih karakteristika filamentoznih faga, koja ih razlikuje od svih ostalih. Na osnovu životnog ciklusa, postoje dve vrste filamentoznih faga: integrativni, koji postaju deo genoma domaćina i neintegrativni, koje se replikuju isključivo ekstrahromozomalno, odnosno epizomalno (Knežević i sar., 2021). Dakle, inovirusi se vezuju za bakterijske pile i nakon infekcije isporučuju svoju DNK u ćeliju domaćina, te mogu postojati u obliku profaga integrisani

u bakterijski genom, ili perzistirati epizomalno, slično plazmidima. Za replikaciju koriste mehanizam kotrljajućeg kruga (eng. *rolling circle mechanism*) ili transpoziciju i virioni se formiraju na ćelijskoj membrani, ekstrudirajući kroz ćelijski zid bakterije. Ekstruzija faga iz ćelije podrazumeva usklađen mehanizam sklapanja čestica viriona i njihovog istiskivanja iz ćelije kroz membrane, pri čemu se izbegava oštećenje ćelija i bakterijska liza, a filamentozni fagi uspostavljaju hronične produktivne infekcije, kontinuirano oslobađajući nove virione. Inovirusi predstavljaju značajnu grupu bakteriofaga zbog njihovog potencijalnog uticaja na virulenciju bakterija, a ulogu u virulenciji bakterije domaćina *Inoviridae* ostvaruju i putem lizogene konverzije fagom.

2.2.2. TAKSONOMIJA

Svi do sada opisani filamentozni bakteriofagi pripadaju redu *Tubulavirales*. Familija *Inoviridae*, sa familijama *Plectroviridae* i *Paulinoviridae* svrstava se u red *Tubulavirales* (Knežević i sar., 2021). Do skoro je u taksonomiji virusa najviša sistematska kategorija bila red, a najvažnija familija, koja je uzimala u obzir karakteristike koje su iste za sve njene predstavnike, kao što su građa nukleokapsida/viriona i tip nukleinske kiseline. Dve ili više familija činile su red. U poslednjoj deceniji je uvedeno puno novina u taksonomiju virusa, uključujući sve sistematske kategorije i binominalnu nomenklaturu. Trenutni taksonomski položaj ovih virusa je sledeći (www.ictv.global/taxonomy):

Realm: *Monodnaviria*

Kingdom (Carstvo): *Loebvirae*

Phylum (Razdeo): *Hofneiviricota*

Class (Klasa): *Faserviricetes*

Order (Red): *Tubulavirales*

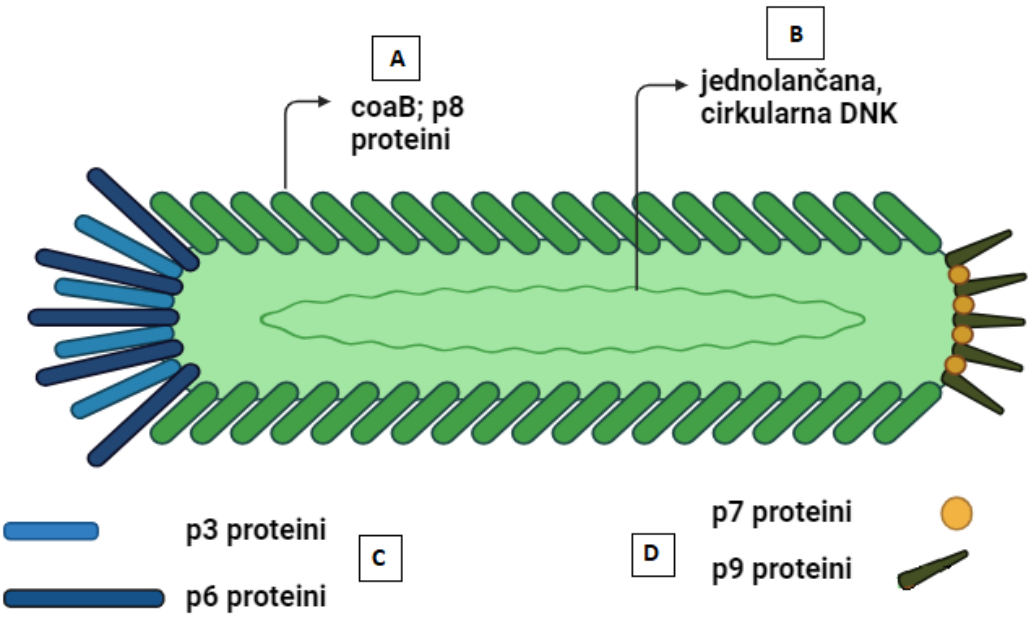
Family (Familija): *Inoviridae*

Familija *Inoviridae* obuhvata 25 rodova, od kojih većina imaju samo jednu vrstu, izuzev rodova *Inovirus*, *Fibrovirus*, *Saetivirus*, *Lineavirus* i *Habenivirus* (www.ictv.global/report). Ipak, analize bakterijskih genoma ukazuju na mnogo veću raznovtsnost i prevalencu ovih profaga u bakterijama (Knežević i sar., 2015; Rouk i sar., 2019; Knežević i sar., 2021). Fagi koji pripadaju familiji *Inoviridae* imaju virione sa fleksibilnim filamentima, bez omotača, dimenzija 600-2.500 × 6-10 nm. Genom ovih faga čini kružna, jednolančana DNK veličine 5.5-10.6 kb,

koji kodiraju 7−15 proteina. Inficiraju Gram-negativne bakterije adsorpcijom za bakterijske pile, replikaciju DNK vrše mehanizmom kotrljajućeg kruga (koji će biti detaljnije opisan u potpoglavlju 2.2.5.1. Mehanizmi infekcije), a novoformirani virioni se oslobađaju iz ćelije ekstruzijom bez oštećenja i lize ćelije domaćina. Kao što je rečeno, DNK ovih faga može da perzistira u ćeliji domaćina ekstrahromozomski ili da se integriše u bakterijski genom (Knežević i sar., 2021).

2.2.3. MORFOLOGIJA

Filamentozni fagi familije *Inoviridae* imaju slične dimenzije kao bakterijski pili, izuzetno su dugački, mogu biti dužine i do 2.500 nm, što zavisi od veličine genoma, ali im je širina mala i konstantna i kreće se od 6 do 10 nm (Knežević i sar., 2021). Pošto je dužina viriona zavisna od veličine genoma može doći do promena usled insercije, delecije ili mutacija koje dovode do promene u proteinima kapsida (Fauquet i sar., 2015). Vizualizuju se pomoću transmisionog elektronskog mikroskopa (TEM). Spiralna simetrija nukleokapsida je veoma jednostavna, predstavljena je cirkularnom, pozitivnom, jednolančanom DNK obavijenom sa više hiljada kopija glavnog proteina kapsida (eng. *major coat protein*), CoaB ili p8 i sa po pet kopija malih protein kapsida (eng. *minor coat protein*) koji učestvuju u adheziji faga za ćeliju domaćina i morfogenezi viriona pri oslobađanju iz ćelije. Mali proteini kapsida, p7 i p9, se nalaze na zaobljenom kraju filamenta, dok se na ravnom kraju nalaze p3 (CoaA) i p6. N-terminalni deo ovih protein je odgovoran za vezivanje za pile, a C-terminalni deo odgovoran u završetku formiranja viriona. Najznačajniji je CoaA, koji stupa u interakciju sa receptorima na bakterijskoj ćeliji. Virioni ne poseduju lipide i ugljene hidrate (Specthire i sar., 1992; Lopez i Webster, 1983). Do danas je iz familije *Inoviridae* najviše proučen kolifag M13 i koristi se kao tipičan predstavnik (slika 5).



Slika5. A. Strukturni proteini p8 u 2700 kopija koji formira kapsid obavijajući nukleinski material; **B.** Centralno postavljena pozitivna, jednolančana, kružna DNK faga; **C.** Strukturni proteini p3 i p6 u po pet kopija; **D.** Strukturni proteini p7 i p9 na zaobljenom kraju filamenta u po pet kopija koji prvi izlaze iz ćelije domaćina pri ekstruziji (www.biorender.com).

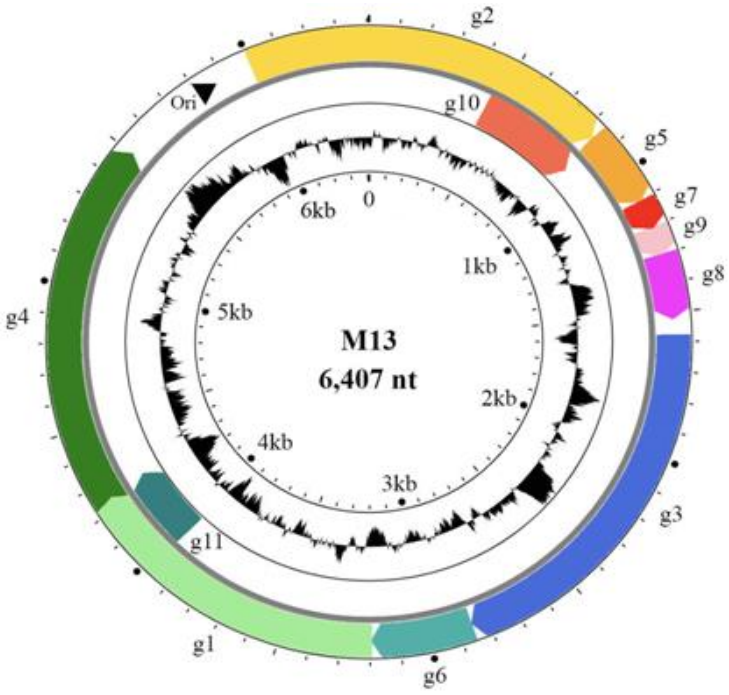
2.2.3.1.Fizičko-hemijske osobine

Relativna molekulska masa viriona filamentoznih faga iznosi od 10 MDa do 60 MDa, dok je sedimentacioni koeficijent 41S (40-45S) i opisuje brzinu sedimentacije pri ultracentrifugiranju. Sedimentacija je uslovljena odnosom mase i dužine viriona te je zato različita za različite fage (Fauquet i sar., 2005). *Inoviridae* se precipitiraju nižim koncentracijama polietilen glikola (PEG) i uglavnom se prečiste u rastvoru cezijum hlorida (CsCl) u kome im je flotaciona gustina od 1.28 mg mL^{-1} do 1.39 mg mL^{-1}. Ovi fagi su osetljivi na hloroform i druge organske rastvarače uzimajući u obzir da nemaju lipide u svom sastavu. Osetljivost na metanol, aceton i dietil etar varira od vrste do vrste, na primer, Pf1 fag *P. aeruginosa* se 50% inaktiviše u ovim rastvorima na sobnoj temperaturi tokom 10 minuta, dok fd fag enterobakterija zadržava punu infektivnost u navedenim rastvorima izuzev u hloroformu (Amako and Yasunaka, 1997). Interakcija viriona sa hloroform-voda rastvorom može dovesti i do morfoloških promena, kao što kod M13 faga ova interakcija skraćuje filament, a zatim ga menja u sferoidne partikule (Oh i sar., 1999). Inaktivacija filamentoznih faga metanolom, etanolom i 1-propanolom je obrnuto zavisna od hidrofobnosti alkohola (Olofsson i sar., 2001). Veoma su otporni na isušivanje, variranje pH i visoke temperature (Branston i sar., 2013). M13 fag u uslovima suše ima poluživot do 120 dana, stabilan je na pH3-11, ali se inaktiviše jakim kiselinama i bazama. Pri inkubaciji na 80 ^{o}Ctokom 60 minuta titar ovog faga opada za manje od 1 log, međutim do potpune inaktivacije

dolazi na temperaturi od 95 ^{o}C tokom 50 minuta i na temperaturi 99 ^{o}C tokom 20 minuta. Osetljivost na dezinfekciona sredstva i deterdžente je veoma varijabilna (Branston i sar, 2013).

2.2.4. KARAKTERISTIKE GENOMA

Genom predstavnika familije *Inoviridae* sačinjen je od jednolančane, pozitivne, cirkularne DNK koja kodira od 7 do 15 proteina. Veličina genoma se kreće od 5.5 kb do 10.6 kb. Genom je kod faga M13 (slika 6) i drgih faga koji perzistiraju slično plazmidima organizovan u tri modula: geni za replikaciju (g2, g5 i g10), strukturni geni (g7, g9, g8, g3 i g6) i geni za morfogenezu (g1, g4 i g11). Geni su postavljeni blizu, a neki se i preklapaju povećavajući kodirajući potencijal, ili su deo većih gena sa unutrašnjim start kodonima. Na primer kod faga M13 geni g11 i g10 se preklapaju sa genima g1 i g2 i mogu imati iste ili različite aminokiseline zavisno od okvira čitanja, ako se pomeri za samo jedan bazni par ne eksprimira se ista aminokiselina. Genomi faga koji se integrišu u bakterijski hromozom sadrže i sekvence integracije i/ili regulacije genske ekspresije (Russel i Model, 2006).



Slika 6. Shematski prikaz genoma M13 faga. Geni grupisani po funkciji proteina koje kodiraju: geni označeni g2, g5 i g10 pripadaju regionu za replikaciju DNK. Geni označeni g3, g6, g7, g8, i g9 pripadaju regionu strukturnih gena, a geni označeni g1, g4 i g11 pripadaju regionu za morfogenezu i ekstruziju viriona. Unutrašnji krug predstavlja GC sadržaj (preuzeto iz: Knežević i sar., 2021).

Proces integracije je omogućen integrazama ili transpozazama, međutim neki fagi se integrišu u domaćinov genom i bez enzima za integraciju, u tom slučaju enzimi domaćina imaju

tu ulogu. Na primer, XerC/D rekombinaza *Vibrio cholerae* odgovorna je za integraciju faga na *dif* mestima. Pored predstavnika koji imaju sposobnost integracije genoma u genom domaćina, postoje i predstavnici koji nemaju tu mogućnost. Ovi fagi perzistiraju u ćeliji u vidu cirkularne ekstrahromozomske forme, u vidu plazmida, koji se replikuju paralelno sa replikacijom domaćina (Huber i Waldor, 2002; Lobocka i sar., 2004; McLeod i sar., 2005). Na veoma dobro proučenom i dokumentovanom primeru M13 faga može se sagledati mehanizam infekcije filamentoznih bakteriofaga, od adhezije za ćelije domaćina, multiplikacije genetičkog materijala do morfogeneze i oslobađanja zrelih viriona. Pored osnovnih gena, ovi fagi u svom genomu imaju i pomoćne gene (Mai-Prochnow i sar., 2015). Unutar intergenskih regiona filamentoznih faga nalaze se i signal početka replikacije, signal sklapanja viriona i promoteri (Knežević i sar., 2021). U slučaju integrativnih filamentoznih faga, prisutne su sekvence za inserciju i proteini za regulaciju latentnog stadijuma (represori). Neki od pomoćnih gena filamentoznih faga su toksin-antitoksin sistem, ATPaza transportera ABC i reverzna transkriptaza, opisane u strukturi faga Pf4 (Mai-Prochnow i sar., 2015; Rice i sar., 2009).

2.2.5. PROTEINI

Filamentozni fagi imaju tri funkcionalne grupe proteina:

- proteini replikacije (p2, p5, p10),

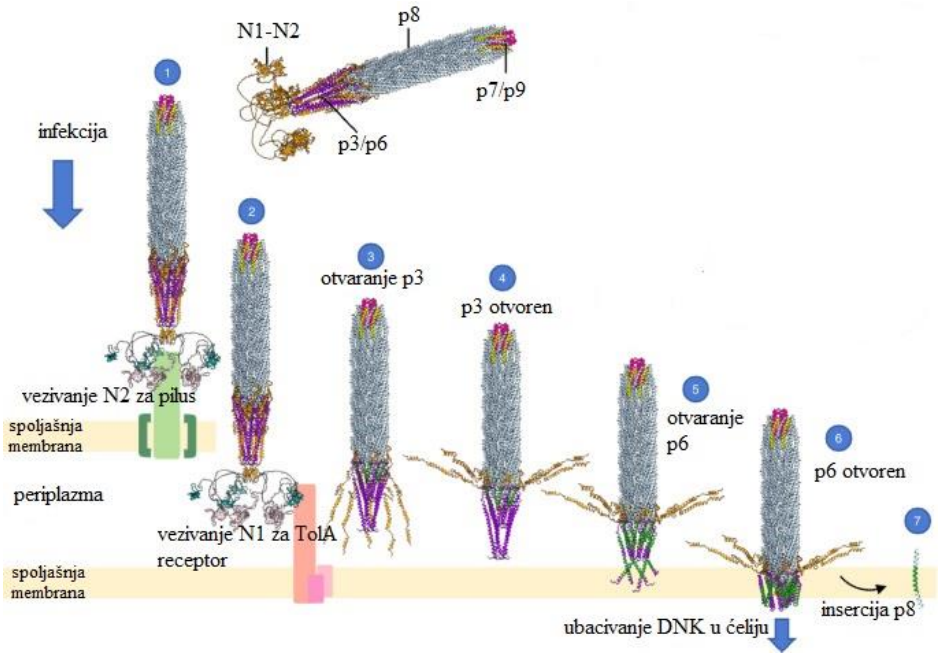
- strukturni proteini (p3, p6, p7, p9, p8).

- proteini morfogeneze viriona i sekrecije (p1, p4, p11).

Protein p2 ima endonukleaznu aktivnost i zasecanjem dsDNK lanca inicira proces replikacije, dok kod *Xanthomonas* faga ΦLf spaja krajeve jednolančane DNK u cirkularnu formu spremnu za ugrađivanje u virion (Mai-Prochnow i sar., 2015). Protein p5 se vezuje za jednolančanu DNK i sprečava njenu konverziju u dvolančanu replikativnu formu, a tokom sinteze viriona biva zamenjen proteinom p8 (CoaB) na unutrašnjoj memebrani bakterijske ćelije. Uloga p10 proteina je vezivanje za dvolančanu formu DNK čime se sprečava njena hidroliza nukleazama domaćina, a u interakciji sa p5 proteinom sprečava replikaciju jednolančane DNK.

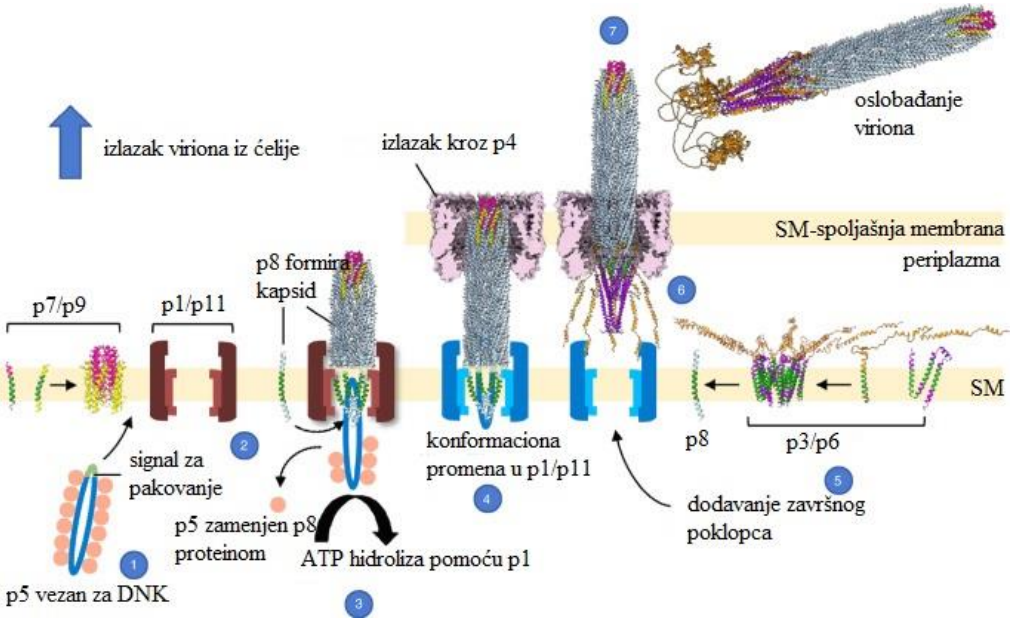
Strukturni proteini sa njihovom ulogom prilikom infekcije prikazani su na slici 7. Protein p8 (CoaB) je glavni protein kapsida koji formira filamentozno telo faga i sintetiše se u više hiljada kopija. Ovaj protein u potpunosti obavija nukleinsku kiselinu faga. Svi proteini kapsida faga se sintetišu kao integralni membranski proteini, a signal za pakovanje DNK je ukosnica, koja stupa u interakciju sa C-terminalnim ostacima proteina p6 i p9 na vrhu kako bi omogućila

da se DNK ugradi u nove virione. Zatim se dodaje glavni protein omotača p8, dok se ceo genom ne pokrije. Proteini p3 i p6 se zatim dodaju na kraju viriona i fag se oslobađa. Fag se tada nalazi u obrnutoj orijentaciji, pri čemu proteini vrha p7 i p9 formiraju vodeći kraj filamenta koji izlazi, a proteini vrha p3 i p6 formiraju zadnji kraj. Svi proteini su raspoređeni sa svojim pozitivno naelektrisanim C-terminalnim domenima orijentisanim prema DNK i unutrašnjosti faga, a N-terminalnim domenima okrenutim ka spoljašnjosti. Na zaobljenom kraju filamenta, 5 C-terminalnih argininskih ostataka p7 proteina i 5 ostataka arginina p9 proteina formiraju pozitivno naelektrisani prsten koji se nalazi do vrha DNK gde se nalazi ukosnica za pakovanje. Pozitivno naelektrisani lumen viriona sastoji se uglavnom od ostataka lizina sa C-terminalnih krajeva p8 proteina, čime im se omogućava interakcija sa negativno naelektrisanim molekulom DNK. Četiri lizinska ostatka iz svakog p8 monomera okružuju DNK šupljinu. Vrhovi filamenta su formirani od manjih kapsidnih proteina koji se javljaju u parovima, p3 i p6 formiraju vodeći kraj inficirajućeg faga koji stupa u interakciju sa receptorima domaćina da bi pokrenuo ulazak, dok p7 i p9 formiraju zadnji kraj filamenta (Conners i sar., 2023). Najveći protein kapsida filamentoznih faga je p3 (CoaA) čija je glavna uloga adsorpcija za bakterijsku ćeliju i oslobađanje iz nje, odnosno prolazak kroz membranu. CoaA svojim N1-N2 domenom omogućava adsorpciju faga za pile koji su primarni receptori, ali i za TolA protein koji je sekundarni receptor prilikom uspostavljanja infekcije. Protein p6 učestvuje u oslobađanju viriona iz ćelije, a formira sa p3 proteinom kompleks koji je ključan u završetku sinteze, odnosno sklapanja viriona faga. Proteini p3 i p6 se poslednji ugrađuju u virion pri izlasku iz ćelije. Proteini p7 i p9 su mali hidrofobni proteini, deluju zajedno tako što iniciraju istovremeno procese formiranja i ekstruzije viriona, vezujući se za DNK svojim karboksilnim krajevima (Conners i sar ., 2023).



Slika 7. Model faga Ff (M13), strukturni proteini prilikom infekcije. p7 je prikazan roze bojom, p9 žutom, p3 narandžastom, p6 ljubičastom i p8 svetlo plavom bojom. **1.** N2 domen p3 se vezuje za F-pilus i razvija N1-N2 šarku da bi otkrio mesto vezivanja receptora TolA na N1 domenu. **2.** Oslobođeni N1 domen p3 se vezuje za receptor. **3.** C1 i C2 domeni p3 počinju da se udaljavaju od tela faga. p3 transmembranski heliks je obojen zeleno. **4.** Potpuno otvaranje C domena p3 otkriva hidrofobni p6 pentamer. **5.** Izloženi hidrofobni regioni p6 se ubacuju u membranu (transmembranski domeni obojeni zeleno). **6.** Pore koje formiraju pentamer p3 i pentamer p6 omogućavaju injektiranje DNK u citoplazmu. **7.** Prvi sloj p8 je izložen gubitku šiljastog vrha, a proteini se pomeraju bočno u dvosloj zbog suprotnog naelektrisanja na N i C-kraju, otkriva se drugi sloj p8 i proces se nastavlja (Conners i sar., 2023).

Proteini morfogeneze i ekstruzije viriona, zajedno sa strukturnim proteinima koji učestvuju u ovom procesu, prikazani su na slici 8. Protein koji formira kanal za oslobađanje faga kroz spoljašnju membranu domaćina je p4 i u interakciji je sa proteinom p1 koji se integriše u unutrašnju membranu domaćina pa čini deo sistema morfogeneze i sekrecije. p11 je proizvod translacije unutrašnjeg start kodona u okviru g1 gena i ima ulogu u sprečavanju delovanja endogenih proteaza na p1 protein. p1/p11 kompleks vrši hidrolizu ATP-a što omogućava vezivanje p8 proteina oko DNK i izgradnju filamenta. U tabeli 3. prikazani su proteini i njihove funkcije opisane kod M13 filamentoznog faga.



Slika 8. Model faga Ff (M13), proteini prilikom sklapanja viriona i ekstruzije. **1.** ssDNK se pakuje pomoću p5, ostavljajući otvorenu signalnu ukosnicu za pakovanje koja je prikazana zelenom bojom. **2.** p5 cilja kompleks DNK-protein na pI/p11, gde se p5 zamenjenjuje okruglim vrhom pV7/p9 kompleksa. Pomeranje p5 omogućava p8 da difunduje bočno oko DNK. **3.** Hidroliza ATP-a pomoću p1/p11 pokreće rast filamenta uz kontinuirano dodavanje p8. **4.** Kada DNK dođe do kraja, p1/p11 prolazi kroz konformacionu promenu koja povećava afinitet za p3/p6 vrh. **5.** p3/p6 vrh formira kompleks vezan za membranu. **6.** C domen p3 se savija preko hidrofobnih spirala p6 da bi odvojio fag od citoplazmatske membrane. **7.** Fag prolazi kroz p4 kompleks za sekreciju na spoljašnjoj membrani prikazan svetlo ljubičastom bojom i oslobađa se (Conners i sar., 2023).

Tabela 3. Proteini filamentoznog faga M13 i njihove funkcije (Mai-Prochnow i sar., 2015)

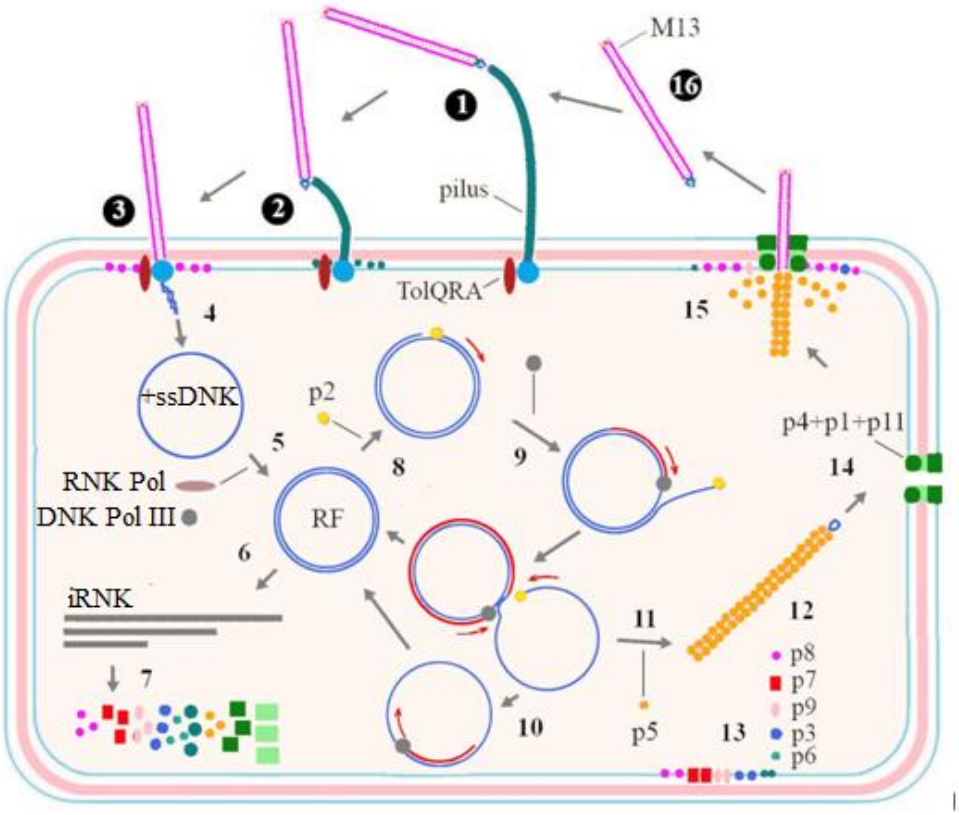
Protein	Funkcija
p1	**Morfogeneza i oslobađanje viriona**
	• Integriše se u unutrašnju membranu domaćina.
	• Interakcijom sa p4 i p10 čini transmembranski sistem za formiranje i ekstruziju viriona iz ćelije.
p2	**Replikacija**
	• Replikacija viralne DNK, sinteza pozitivnog lanca.
	• Vezuje se za krajeve lanca i obrazuje cirkularnu formu jednolančane DNK koja se pakuje u virion.
p3	**Strukturni protein, CoaA, adsorpcija**
	• Ulazak viriona u ćeliju domaćina adsorpcijom za primarni i sekundarni receptor.
	• C-terminalnim domenom omogućava oslobađanje viriona sa membrane domaćina.
p4	**Morfogeneza i oslobađanje viriona**
	• Formira kanal u unutrašnjoj membrane za izlazak viriona iz ćelije.
	• Interakcija sa p1 proteinom.
p5	**Replikacija**
	• Vezuje se za jednolančanu DNK i sprečava konverziju u dvolančanu replikativnu formu.
	• Tokom formiranja viriona zamenjuje se proteinom p8 na unutrašnjoj membrane ćelije

	domaćina.
p6	**Strukturni protein**
	• Oslobađanje viriona sa membrane domaćina.
	• Formiranje kompleksa sa p3 proteinom čime se omogućava završetak formiranja viriona.
p7	**Strukturni protein**
	• Inicijacija procesa formiranja i ekstruzije viriona, u interakciji sa p9 proteinom.
p8	**Strukturni protein, CoaB, glavni protein kapsida**
	• Gradi kapsid helikalne, filamentozne forme, obavija viralni nukleinski materijal.
p9	**Strukturni protein**
	• Inicijacija procesa formiranja i ekstruzije viriona, u interakciji sa p7 proteinom.
p10	**Replikacija**
	• Sprečava hidrolitičko delovanje nukleaza domaćina na dvolančanu DNK vezujući se za nju.
	• Inhibira replikaciju DNK p5 proteinom.
p11	**Morfogeneza i oslobađanje viriona**
	• Deo transmembranskog sistema sa p1 i p4 proteinima i štiti p1 protein od delovanja endogenih proteaza.

2.2.5.1. Mehanizam infekcije domaćina

Prvi stadijum infekcije podrazumeva adheziju faga za pile bakterijske ćelije. Infekcija počinje interakcijom CoaA (p3) proteina sa pilima na površini bakterijske ćelije (slika 9.1), što izaziva retrakciju pilusa i time se fag približava površini ćelije u blizini TolQRA komleksa sekundarnog receptora na unutrašnjoj membrani (Click i Webster, 1997; Heilpern i Waldor, 2000) (slika 9.2). Dva N-terminalna domena ovog proteina se vezuju za primarne i sekundarne receptore, dok C-terminalni domen služi za uklanjanje omotača viriona i ulazak DNK u citoplazmu ćelije domaćina (Reichmann i Holliger, 1997; Deng i Perham, 2002; Bennet i Rakonjac, 2006). Cirkularna +ssDNK faga penetrira u citoplazmu bakterijske ćelije i tu se zaodene SSB proteinima domaćina (eng. *single strand binding protein*) (slika 9.3). Oko 60 nukleotida sa CoaA proteinima formira ukosnicu i time se štiti DNK od razgradnje, a RNK polimeraza domaćina prepoznaje ukosnicu i generiše kratake RNK prajmere na osnovu kojih DNK polimeraza III domaćina sintetiše -ssDNK lanac (slika 9.5). DNK polimeraza I ima egzonukleaznu aktivnost, iseca prajmere i popunjava lanac u pravcu 5´ ka 3´. Nakon toga, ligaza domaćina kovalentno vezuje lance diestarskim vezama i nastaje dvolančana cirkularna DNK, takozvana replikativna forma (RF). Nakon toga sledi proces umnožavanja virusa u ćeliji domaćina, po principu mehanizma kotrljajućeg kruga, jedan po jedan lanac. U zavisnosti od životnog ciklusa, replikacija započinje ulazeći u ćeliju domaćina ili integracijom u hromozom domaćina. Dok RNK polimeraza pokreće sintezu novog lanca, XerC rekombinaza se koristi za integraciju. U oba slučaja nastaje lokalno dvolančano mesto za vezivanje za određene proteine

RNK polimeraze ili *dif* mesta za specifičnu XerC/D rekombinazu (Higashitani i sar., 1997; Val i sar., 2005). Na slici 8. predstavljenoj je umnožavanje M13 faga koji se replikuje epizomalno i u svom genomu nema sekvence za integraciju niti za regulaciju genske ekspresije (Russel i Model, 2006; Endemann i Model,1995; Marciano i sar., 1999; Rapoza i Webster, 1995). Replikacija njegove DNK započinje kada p2 svojom endonukleaznom aktivnošću zaseca (+) lanac novonastale dvolančane DNK (slika 9.8) na specifičnom mestu i inicira replikaciju DNK (slika 9.9, 9.10). Naime, u ćeliji se formira oko 100 kopija replikativnih formi jer se konstantno sintetiše novi (-) lanac ssDNK i dsDNK replikativnom mašinerijom domaćina. Dok se vrši replikacija DNK, istovremeno se sintetiše informaciona RNK (slika 10.6) i vrši translacija proteina (slika 9.7), takođe posredstvom replikativne mašinerije domaćina, RNK polimerazom. Protein p5 ima afinitet prema +ssDNK lancu i kada se akumulira u dovoljnoj količini vezuje se kao homodimer za novosintetisane lance +ssDNK (slika 9.11) i sprečava da se dalje koriste za replikaciju, odnosno sintezu RF i ovi lanci se zatim cirkularizuju i bivaju odenuti ovim proteinima (slika 9.12) (Michel i Zinder, 1989).



Slika 9. Infekcija fagom i replikacija putem mehanizma kotrljajućeg kruga. **1.** Adhezija faga za pilus bakterije; **2.** Kontrakcija pilusa za ubacivanje virusne nukleinske kiseline u ćeliju; **3.** Vezivanje SBB proteina za DNK; **4.** Penetracija jednolančane DNK u ćeliju; **5.** RNK polimeraza sintetiše prajmere, a DNK polimeraza III sintetiše negativan DNK lanac i tako nastaje RF; **6.** Sinteza informacione RNK; **7.** Translacija proteina; **8.** p2 zaseca lanac novonastale dvolančane DNK i započinje replikacija po mehanizmu kotrljajućeg kruga; **9.** DNK Pol III sintetiše još jedan negativan lanac na postojeći koji je p2 počeo da odmotava; **10.** Ako nije dovoljno sintetisano p5 proteina

odvija se sintetisanje novih RF i translacija proteina; **11.** Akumulirani proteini p5 su signal za prekid replikacije i vezivanje za novosintetisane lance DNK; **12.** Cirkularizovana DNK i obavijena p5 proteinima koji sprečavaju dalju replikaciju; **13.** Integracija sintetisanih proteina u ćelijsku membranu; **14.** p4, p11 i p1 proteini formiraju poru u membrani kroz koju će se vršiti ekstruzija; **15.** Proteini p5 obavijeni oko nukleinske kiseline se zamenjuju p8 proteinima kapsida i vrši se ektruzija kroz ćelijsku membranu i oslobađanje novih viriona (preuzeto iz Knežević i sar., 2021).

Poslednji stadijum infekcije podrazumeva morfogenezu virusnih čestica i ekstruziju zrelih viriona kroz membranu ćelije domaćina. Sklapanjem virusnih partikula formiraju se zrele infektivne čestice, odnosno virioni i taj proces se naziva morfogeneza. Nakon translacije, strukturni proteini p8, p7, p6, p3 i p9 integrišu se u citoplazmatsku membranu (slika 9.13), kao i 14-merni protein p4, priključen sa p1 i p11 koji zajedno formiraju mašineriju za morfogenezu i ekstruziju. Proces se odvija tako što se glavni proteini kapsida p8 ugrađuju u membranu, a virusna +ssDNK obavijena vezujućim proteinima p5 intereaguje sa membranom preko kompleksa proteina p4, p 1 i p11 (Feng i sar., 1999). Protein p4 formira poru (slika 9.14) kroz membrane kada se spoje svih 14 njegovih subjedinica i preostala dva proteina mašinerije p1 (protein unutrašnje membrane) i p11 (protein spoljašnje membrane) (Feng i sar., 1999;Marciano i sar., 1999). Kao što se uočava na slici 9, ekstruzija se odvija tako što se p5 zamenjuje glavnim proteinom p8 iz membrane (Rakonjac i sar., 1999; Rakonjac i Model, 1998) (slika 9.15), a da bi se to odigralo neophodna je posebna signalna sekvenca za pakovanje na DNK i p7 i p9 koji se prvi sekretuju. Na kraju procesa se virionu dodaju p3 i p6 i oslobađaju se novi virioni iz ćelije. U odsustvu p3 i p6, partikule faga ostaju povezane sa bakterijskom membranom. Procesom ekstruzije ne dolazi do liziranja ćelija domaćina, bakterija raste i umnožava se, samo obično sporije u odnosu na neinficirane (Lopez i Webster, 1983).

Kako je ranije navedeno, određeni filamentozni fagi se replikuju nakon integracije u hromozom domaćina koristeći specifičnu XerC/D rekombinazu, kao što su *Vibrio* fagi CTXϕ i VGJφ, *Xanthomonas* fag XacF1 i dr. Na primer, CTXϕ fag takođe inicira infekciju vezivanjem za specifične receptore na površini ćelije domaćina i pripada grupi integrativnih bakteriofaga za razliku od opisanog M13 faga *E. coli*. Receptor na domaćinu je TcpA, glavna subjedinica TCP sistema toksin-koregulatora pilusa ne samo da čini *V. cholerae* patogenijim nego služi i kao receptor za ove fage (Tacket i sar., 1998; Waldor i Mekalanos, 1996). Jednom kada je receptor uspešno vezan, CTXϕ ubacuje svoju ssDNK u ćeliju i sintetiše komplementarni lanac koristeći polimerazu domaćina, rezultujući replikativnom formom, odnosno dsDNK (RF), kao i epizomalno replikujući fagi (Kuinones i sar., 2005; Kamruzzaman i sar., 2014). Rekombinaza XerC/D koja se vezuje za *dif* specifično mesto, ima ulogu u razdvajanju hromozomskih dimera, što je od suštinskog značaja za proces integracije faga (Huber i Waldor, 2002). Dvolančano

XerC/D vezujuće mesto (sekvenca) u ssDNK se rekonstituiše sa dva invertovana ponovka *dif* mesta u genomu faga, koji zajedno stvaraju strukturu račvaste petlje (Val et al., 2005). U ovoj strukturi aktivnošću XerC/D rekombinaze dolazi do ubacivanja genoma faga u hromozom procesom rekombinacije specifične za mesto, a kada u genomu domaćina odsustvuje mesto integracije CTXϕ faga, DNK perzistira u formi plazmida (Fan i Kan, 2015). Takođe, integraze mogu da koriste i drugi filamentozni bakteriofagi za integraciju u bakterijski hromozom (Kawasaki i sar., 2007). Prvi put je identifikovana integraza u fagu *Ralstonia* ϕRSM1, a zatim pronađena u drugim fagima koji inficiraju *Ralstonia pickettii, Ralstonia solanacearum, Burkholderia pseudomallei* i *P. aeruginosa* (Webb i sar., 2004; Mooij i sar., Askora, 2009). Većina faga sa integrazom koristi tRNK gen domaćina kao mesto integracije (*attB* mesto) (Campbell, 1962), a sekvenca u genomu faga (*attP* mesto) je ista kao i *attB* sekvenca na mestu gde dolazi do rekombinacije. Međutim, opisani su i drugačiji načini integracije filamentoznih faga. Na primer, profagi bakterijske vrste *Neisseria* se ugrađuju kodiranjem sopstvenih transpozaza (Bille i sar., 2005).

2.2.6. ZNAČAJ FILAMENTOZNIH BAKTERIOFAGA

Inovirusi predstavljaju značajnu grupu bakteriofaga zbog njihovog potencijalnog uticaja na virulenciju bakterija. U većini slučajeva infekcija fagom povećava sposobnost domaćina da se bori protiv raznih nepovoljnih abiotičkih i biotičkih faktora, da kolonizuje nova staništa i da učestvuje u razvoju mikrobnih zajednica. Međutim, postoje slučajevi kada infekcija fagom smanjuje pomenute sposobnosti i fitnes domaćina, što takođe može biti korisno za bakteriofage ako je bakterija domaćin patogen (Oh i sar., 2019; Wendling i sar., 2021). Bakteriofagi iz porodice *Inoviridae* mogu da nose dodatne, bakterijske gene i mogu promeniti njihovu specifičnost adsorpcije za nove domaćine (Knežević i sar., 2015). Pokazalo se da ovi virusi utiču na brzinu rasta njihovih bakterijskih domaćina, a pretpostavlja se da zbog izuzetno visoke proizvodnje ovih faga može doći do prevelike količine kopija glavnog proteina omotača na površini bakterijskih ćelija što potencijalno uzrokuje ovaj fenomen. Pored toga, akumulacija filamentoznih faga na površini bakterijskih ćelija može značajno uticati na agregaciju (Addy i sar., 2012) i hidrofobnost ćelija (Chen i sar., 2009). U određenim slučajevima primećene su promene u pokretljivosti bakterija nakon infekcije filamentoznim fagima. U različitim studijama je pokazano da filamentozni fagi inhibiraju kretanje bakterija plivanjem i rojenjem (Wang i sar., 2013; Ahmad i sar., 2014; Ahmad i sar., 2017), kao i trzajuću pokretljivost pilima koju takođe često inhibiraju filamentozni fagi (Ahmad i sar., 2014; Ahmad i sar., 2017; Secor i sar., 2016). Navedene fenotipske promene na kraju utiču na početne faze razvoja biofilma, te samim tim

filamentozni fagi utiču i na sposobnost njegovog formiranja. Međutim, među najzanimljivijim bakteriofagima iz ove porodice su oni koji dovode do promene postojećih i pojave novih osobina patogenih sojeva. Najpoznatiji primer je CTXϕ fag bakterije *V. cholerae*, koji joj omogućava ekspresiju niza toksina (Faruque i Mekalanos, 2012). Pored toga, postoji nekoliko drugih filamentoznih bakteriofaga za koje je potvrđeno, ili se pretpostavlja, da su uključeni u povećanje virulencije bakterija kao što su *P. aeruginosa* (Webb i sar., 2003; Webb i sar., 2004; Rice i sar., 2009), *E. coli* O18:K1:H7, *Yersinia pestis* biovar Orientalis (Gonzalez i sar., 2002), *Ralstonia solanaccearum* (Yamada, 2013) i *Neisseria meningitidis* (Bille i sar., 2005). U brojnim sojevima patogenih bakterija, filamentozni fagi su široko rasprostranjeni i javljaju se u formi sličnoj plazmidu, ili u formi profaga. Ovi fagi mogu izazvati brzu evoluciju i doprinose širenju novih gena među svojim domaćinima (Fortier i Sekulović, 2013; Knežević i sar., 2022). Stoga je vrlo verovatno da filamentozni fagi igraju važnu ulogu u evoluciji bakterijskih vrsta kroz uticaj na ekološku adaptaciju i patogenost njihovih domaćina. Što se tiče oportunističkog patogena *Acinetobacter baumannii* do sada nije opisan ni jedan filamentozni fag, te su informacije o uticaju ovih faga na njenu virulenciju i ekološku adaptaciju od velikog značaja.

Filamentozni fagi se zbog svoje specifične morfologije i jednostavnog genoma odavno koriste kao fagemidi, nosači različitih lekova, kao vektori za kloniranje pri sekvenciranju DNK, u tehnologiji displeja faga (eng. *phage display*), kao i u procesima bio i nanotehnologije (Bradbury i Marks, 2004; Nam i sar., 2008; Henry i sar., 2015; Ju i Sun, 2017) .

Takođe, utiču na virulenciju domaćina na različite načine. Poseduju visoko konzervisane proteine kao što su glavni protein kapsida CoaB, mali protein kapsida CoaA i protein morfogeneze Zot (eng. *zonula occludens toxin*). Zot protein ima funkciju ATPaze u konzervisanom delu, a u brojnim slučajevima je uključen upravo u virulenciju patogenih bakterija domaćina. Dobro su dokumentovana istraživanja CTXϕ faga *Vibrio cholerae* koji kodira tri toksina neophodna za razvoj oboljenja kolere, to su CT- cholera toxin, Zot- zonula occludens toxin i Ace- accessory cholera toxin (Fasano i sar., 1991; Truckis i sar., 1993; Waldor i Mekalanos, 1996; Faruque i Mekalanos, 2012). Zatim, *Vibrio* fag VFJ nema sposobnost integracije genoma u bakterijski, ali je dokazano da inficirane bakterijske ćelije ovim fagom imaju srednji stepen rezistencije na ampicilin, visoku rezistenciju na kanamicin i gube flagele (Wang i sar., 2013), dok *Vibrio* fag fs2 redukuje ekspresiju pila (Nguyen i sar., 2008). Takođe, fag Pf4 dobrinosi adaptaciji *Pseudomans aeruginosa* u biofilmu, povezan je sa disperzijom i ćelijskom smrti (Rice i sar. 2009), arhitekturom biofilma (Whiteley i sar., 2001), produkcijom malih varijanti kolonija (eng. *small colony variants*- SCV) i većom virulencijom *in vivo* (Rice i sar., 2009), a ustanovljen je i uticaj na pokretljivost pilima vezujući se za njih, smanjuju njihovu

produkciju te sprečavaju superinfekciju (Ahmad i sar., 2017; Gavrić i Knežević, 2022b). Filamentozni fagi *P.aeruginosa* takođe povećavaju osetljivost na florohinolone, beta laktame i aminoglikozide (Gavrić i Knežević, 2022b). Pojedini fagi kao što je RSM1 *Ralstonia solanacearum* smanjuju virulenciju domaćina smanjenjem rasta, pokretljivosti, produkcije ekstracelularnih polisaharida i ekspresije phcA gena za virulenciju *R. solanacearum* (Addy i sar., 2012a). Uloga inovirusa u patogenosti domaćina uočava se i kod meningokoka (Billeetal i sar., 2005), *E.coli* O18:K1:H7 i O157:H7, *Yersinia pestis* (Gonzales i sar., 2002) i drugih bakterija, dok inovirusi nekih važnih patogena, kao što je oportunistički patogen *Acinetobacter baumannii,* do sada nisu istraživani. Takođe, veoma je važna činjenica da se ovi bakteriofagi smatraju veoma rasprostranjenim među bakterijama. Studija o diverzitetu i rasprostranjenosti univerzalnih i specifičnih profaga Pf1 u sojevima *Pseudomonas aeruginosa* je ukazala na prisustvo najmanje jednog genetičkog elementa Pf1 faga u više od 60% sojeva ove bakterije (Knežević i sar., 2015), što ukazuje na to činjenicu da ovi fagi igraju ulogu u evoluciji i varijabilnosti bakterijskih vrsta.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je otkrivanje bakteriofaga iz familije *Inoviridae*, specifičnih za *A. baumannii*, utvrđivanje njihove prevalence među sojevima *A. baumannii,* njihova karakterizacija i utvđivanje efekata faga na osobine odgovorne za virulenciju domaćina.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. SOJEVI *Acinetobacter baumannii*

Prilikom istraživanja korišćena su 63 soja bakterijske vrste *Acinetobacter baumannii* iz kolekcije PK laboratorije na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Od ovog broja, 31 soj čini postojeću kolekciju (Aleksić Sabo i sar., 2022; Aleksić, 2014), dok su 32 izolovana za potrebe ove studije. Tri soja su referentna, dok su ostali izolovani iz različitih uzoraka kao što su patološki materijal humanog porekla i akvatični ekosistemi. Referentni sojevi ATCC 19606 i ATCC BAA 747 su iz American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), a soj NCTC 13423 iz National Collection of Type Cultures (Public Haelth England, UK).

4.1.1. Izolacija i identifikacija *Acinetobacter baumannii* sojeva

Izolacija *A. baumannii* sojeva izvršena je primenom metode obogaćenja (Baumann, 1968). Uzorci sa 81 lokaliteta uzeti su periodu od juna 2021. godine do avgusta 2023. godine. Uzorci su zasejavani u Baumann-ove tečne podloge za obogaćenje (CH_3COONa x H_2O, KNO_3, $MgSO_4$ x $7H_2O$ rastvoreno u 0,04M KH_2PO_4/Na_2HPO_4 puferu pH6,0). Podloge su pripremane kao dvostruko koncentrovane u koje je dodat uzorak (1:1, v/v), a finalna zapremina je iznosila 100 mL. Podloge su inkubirane 24h i 48h na 37°C uz agitaciju od 200 rpm/min na orbitalnom šejkeru (ES-20/60 BioSan, Litvanija). Nakon inkubacije zasejavano je 10 µL uzorka iz podloge za obogaćenje na Herella agar, metodom iscrpljivanja. Ploče su inkubirane 24h na 37°C. Uočene bledo ljubičaste kolonije su presejane na neselektivnu hranljivu podlogu i inkubirane na 44°C 24h.

Identifikacija sojeva izvršena je biohemijskim testovima, koji su potvrđeni molekularno-genetičkim metodama. Biohemijski testovi upotrebljeni za preliminarnu identifikaciju su katalaza i oksidaza testovi, oksidativno-fermentativni (O/F) testo i test dokazivanja denitrifikacije. Test prisustva enzima katalaze, koji je za predstavnike Acb kompleksa pozitivan (Brown, 2007), je izveden upotrebom 3% vodonik peroksida koji je apliciran na površinu bakterijskog rasta na hranljivoj podlozi. U slučaju da bakterija poseduje enzim katalazu dolazi do pojave mehurića s obzirom da ovaj enzim razgrađuje vodonik peroksid na molekulski kiseonik i vodu. Oksidaza test, odnosno ispitivanje prisustva enzima citohrom c oksidaze je ispitano apliciranjem filter hartije preko bakterijskog rasta i prelivanjem oksidaza reagensa (komplekson III 1 g L^{-1} , natrijum tiosulfat 0,5 g L^{-1}, tetrametil-p-fenildiamin-hidrohlorid 2 g L^{-1}) preko

hartije. Reagens postaje ljubičaste boje u oksidovanom obliku, odnosno u prisustvu enzima citohrom c oksidaze. Pripadnici Acb kompleksa nemaju ovaj enzim te je očekivano odsustvo promene boje. O/F test je izveden na podlozi sa glukozom kao supstratom za oksidaciju ili fermentaciju i indikatorom brom-timol plavo (tripton 2 g L^{-1}, natrijum hlorid 5 g L^{-1}, glukoza 10 g L^{-1}, brom timol plavo 0,03 g L^{-1}, kalijum hidrogen fosfat 0,3 g L^{-1} i agar 3 g L^{-1}). Epruvete u paru sa polutečnom podlogom su zasejane bakterije ubodom, a jedna epruveta je zalivena parafinom nakon zasejavanja, čime se sprečava ulazak kiseonika i obezbeđuju uslovi fermentacije. One bakterije koje vrše fermentaciju glukoze iz podloge uzrokuju pojavu žute boje u epruveti koja je zalivena parafinom, dok one koje vrše oksidaciju glukoze dovode do pojave žute boje u epruveti sa kiseonikom, nezalivenoj parafinom. Bakterije koje vrše oba procesa, menjaju boju podloge u žuto u oba slučaja. Kako *A. baumannii* poseduje samo aerobni tip metabolizma očekuje se promena boje u epruveti sa kiseonikom. O/F testom se izdvaja *A. baumannii* od bakterija iz porodice Enterobacteriaceae, a i diferencira ovu vrstu od *A. lwoffii* i *A. venetianus* koje ne poseduju sposobnost oksidacije (Brenner i sar., 2005). Test sposobnosti denitrifikacije je izveden zasejavanjem i inkubacijom na podlozi za denitrifikatore (Torlak, Srbija) uz dodavanje reagensa za denitrifikatore nakon inkubacije. Nakon toga je dodata razređena sumporna kiselina 3:1 (v/v) usled čega se uočava plavo-crna boja ako bakterija vrši denitrifikaciju. Ni jedna vrsta koja pripada rodu *Acinetobacter* ne vrši denitrifikaciju. Nakon ovih testova, izvršeno je testiranje rasta na Endo agaru (Torlak, Srbija) i MacConkey agaru (Torlak, Srbija). Bakterije Acb kompleksa dobro rastu na ovim podlogama i time se izdvajaju od pripadnika rodova *Escherichia*, *Enterobacter* i *Klebsiella* (na Endo agaru), kao i od Gram negativnih nefermentišućih štapića poput vrsta roda *Moraxella* (na MacConkey agaru) (Brenner i sar., 2005).

Za potrebe dalje identifikacije molekularno-genetičkim metodama izolovana je bakterijska DNK po protokolu za izolaciju genomske DNK Gram negativnih bakterija pomoću komercijalnog kita GeneJET Genomic DNA Purification Columns (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litvanija). Za PCR metodu korišćena su dva para prajmera (Tabela 4). Prajmeri P-rA1 i P-rA2 kodiraju *recA* gen roda *Acinetobacter* spp. i daju produkt veličine 425 bp. Prajmeri P-Ab-ITSF i P-Ab-ITSR su specifični za region *ITS* gena *A. baumannii* vrste i daju produkt od 208 bp (Chen i sar., 2007). PCR amplifikacija je izvedena u uslovima inicijalne denaturacije u trajanju od 5 minuta na 94 °C, 30 reakcionih ciklusa (denaturacija na 94 °C 30 sekundi, vezivanje prajmera na 55°C 30 sekundi, ekstenzija na 72 °C 30 sekundi) i finalne ekstenzije na 72°C 7 minuta (Chen i sar., 2007). Analiza produkata izvršena je na 2% agaroznom gelu sa etidijum bromidom (EtBr), a gel je dokumentovan pomoću BioDocAnalyse System (Biometra, Gottingen, Nemačka). Sojevi su čuvani u 5% glicerola na temperaturi -80 °C, a kultivisani preko noći na

Mueller-Hinton agaru pri temperaturi od 37 °C. Dalji procesi kultivacije sojeva su u zavisnosti od koncepcije eksperimenta izvođeni na različitim podlogama kao što su Mueller-Hinton (MH) bujon, Lysogeny Broth (LB) u formi bujona i agarizovan sa različitim procentima agara i Brain hearth infusion (BHI) agar.

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za molekularnu potvrdu roda i vrste *Acinetobacter baumannii*

Targetno mesto	Oznaka prajmera	Sekvenca	Veličina produkta (bp)	Literatura
ITS	P-Ab-ITSF	CATTATCACGGTAATTAGTG	208	Chen i sar., 2007
	P-Ab-ITSR	AGAGCACTGTGCACTTAAG		
recA	P-rA-1	CCTGAATCTTCTGGTAAAAC	425	
	P-rA-2	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC		

4.2. FILAMENTOZNI BAKTERIOFAGI

4.2.1. *In silico* utvrđivanje prevalence faga

Dostupni genom referentnog soja ATCC 19606 (Genome Access. No.: NZ_CP059040.1/CP059040.1) je ispitan na prisustvo filamentoznog profaga pomoću BLAST algoritma i korišćenjem PHASTER platforme (PHAge Search Tool Enhanced Release) (Arndt i sar., 2016). PHASTER služi kao alat dizajniran za brzu identifikaciju i beleženje sekvenci profaga prisutnih u bakterijskim genomima. Koristeći ovu platformu, sekvenca slična filamentoznim fagima je pronađena u genomu ATCC19606 i sekvenca pofaga je analizirana da bi se odredila struktura genoma. Fag je označen kao Af1, dok su svi filamentni fagi specifični za *A. baumannii* u ovoj studiji označeni kao Af. Sekvence *zot*, *CoaA* i *CoaB* gena iz filamentoznog profaga soja ATCC 19606 korišćene su za traženje drugih Af profaga putem BLASTn (The Basic Local Alignment Search Tool) algoritma, u ukupno 541 sekvenci genoma *A. baumannii* sojeva koji su u potpunosti sekvencirani i deponovani u GenBank bazu NCBI (National Center for Biotechnology Information). Ove analize su omogućile utvrđivanje učestalosti infekcije *A. bumannii* filamentoznim profagima, kao i broj i raznovrsnost profaga u sojevima.

Na osnovu aminokiselinskih sekvenci Zot proteina, konstruisano je filogenetsko stablo. Ove aminokiselinske sekvence su obrađene u MEGA X programu (Kumar i sar., 2018), a evoluciona istorija je konstruisana metodom maksimalne sličnosti i modela zasnovanog na Jones–Taylor–Thornton (JTT) matrici (Jones i sar., 1992). Početno stablo(a) za heurističku pretragu dobijeno je automatski primenom algoritama Neighbor-Join i BioNJ na matricu rastojanja u paru procenjenih korišćenjem JTT modela, a zatim odabirom topologije sa

superiornom vrednošću log verovatnoće. Stablo je nacrtano u razmeri, sa dužinama grana merenim brojem zamena po mestu.

Na osnovu aminokiselinskih sekvenci Zot proteina, kao i nukleinskih sekvenci *zot* gena, formirane su grupe profaga označene slovima od A do J. U cilju detekcije ovih profaga u sojevima *A. baumannii* iz kolekcije PK laboratorije, kreirani su istoimeni prajmeri (tabela 5). Za kreiranje prajmera upotrebljen je OligoAnalyzer 3.1 (https://www.idtdna.com/calc/analizer), a istim alatom, zajedno sa PCR Primer Stats (http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html) je proveren kvalitet dizajniranih prajmera.

Identifikovani Zot i CoaB su analizirani u skladu sa preporukama ICTV-a, kako bi se utvrdili mogući rodovi (https://ictv.global/report/chapter/inoviridae/inoviridae/inovirus). Na osnovu ICTV kriterijuma za utvrđivanje novog roda razlike u aminokiselinskim sekvencama Zot i CoaB moraju biti >50%, dok za novu vrstu kompletni genomi moraju biti različiti ≥ 5% korišćenjem BLASTn algoritma.

4.2.2. *In vitro* utvrđivanje prevalence faga

Za utvrđivanje prisustva filamentoznih profaga u sojevima iz kolekcije kultura i njihovu primenu za izolaciju viriona, na osnovu *in silico* analiza kreirani su prajmeri za *zot* gen (tabela 5), gore pomenutim alatima. Bakterijska DNK je izolovana iz prekonoćnih kultura sojeva *A. baumannii* upotrebom komercijalnog GeneJET kompleta za prečišćavanje genomske DNK (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litvanija). Degenerisani prajmeri su dizajnirani za *zot* gen, ciljajući svaku grupu faga koja je prethodno definisana na osnovu specifičnosti aminokiselinske sekvence Zot. Upotrebljena su još dva para prajmera specifičnih za rod i vrstu *A. baumannii* (Chen i sar., 2007) (Tabela 1), kao pozitivna kontrola, a negativna kontrola je bila destilovana voda. Genomske DNK 63 soja *A. baumannii* koristile su kao matrica za PCR metodu, koja je dizajnirana tako da početni ciklus od 94 °C bude u trajanju od 5 minuta nakon čega sledi 35 ciklusa od 94 °C u trajanju od 30 s, aniling u trajanju od 2 s i temperaturi specifičnoj za svaki par prajmera (od 52.5 °C do 60 °C) i ekstenzija na 72 °C tokom 60 s, sa konačnom ekstenzijom u trajanju od 7 minuta na 72 °C. Dobijeni produkti su analizirani elektroforezom agaroznog gela sa EtBr i vizuelizacija je izvršena pod UV svetlom (BioDocAnalyse System, Biometra, Gottingen, Nemačka) sa 100 bp markerom (ThermoFisher Scientific, Vilnius, Litvanija).

Tabela 5. Prajmeri dizajnirani za PCR identifikaciju *zot* gena u kolekciji

Targetno mesto	Oznaka	Sekvenca	Veličina (bp)
zot	AAf1-F	GCAGACTTGTAGTAGCTGAACAG	123
	AAf1-R	GGCAAGTGTTTACTACTGGAGAT	
	BAf1-F	CTGGAGTRAGWCCAGCCA	759 ili 768
	BAf1-R	TAAGACTGCAATGATGATGGAAMT	
	CAf1-F	TGCTTTACGCATATGYACTTCATC	218
	CAf1-R	GTCAACCACGTAAYGGCAA	
	DAf1-F	ACATCCGGAGAARACTGGTT	555 ili 546
	DAf1-R	TATGTYTGGGCWAACTGTCG	
	EAf1-F	AGCGTCATATTCTTGAGTCTGG	500
	EAf1-R	AGCATCCGGTTAAGAATGAAAAC	
	FAf1-F	GTGCATTGATAAGGCAGTACCA	417, 420 ili 423
	FAf1-R	GGTTCTGGAAAAACACTTAAAGC	
	GAf1-F	TACATCCRSWMAAMACAGG	793 ili 766
	GAf1-R	CCTGAYGATTGGCGWGAR	
	HAf1-F	CATWGAKGTATGWGCYGATGC	281
	HAf1-R	AAGAGYTWTCRACWCATSGTCAT	
	IAf1-F	AATACGTTGCTGTTCTTCTTGC	602
	IAf1-R	GCCCWGATGGTTCGATTG	

4.3. IZOLACIJA BAKTERIOFAGA

Bakteriofagi su izolovani iz genoma sledećih sojeva *A. baumannii*: referentnog ATCC 19606, soja iz kliničkog uzorka Aba-4804 koji pripadaju A grupi na osnovu dizajniranih prajmera i soja iz prirodne sredine Aba-K koji prirpada C grupi. Izolovani fagi su imenovani Af1, Af4 (A grupa) i AfK (C grupa). Sojevi su izabrani na osnovu faga koji pripadaju najzastupljenijim grupama, A i C, kako u sekvenciranim sojevima, tako i u kolekciji. Izolacija viriona izvršena je stimulacijom originalnih sojeva da produkuju filamentozne fage, po metodi koju su opisali Gavrić i Knežević (2022a) što je opisano u daljem tekstu.

4.3.1. Propagacija faga

U cilju propagacije faga, svakim sojem *A. baumannii* su inokulisana po dva erlenmajera sa 600 mL tečne LB podloge i inkubirana na orbitacionom šejkeru na 37 °C uz agitaciju na 250 rpm/min u trajanju od dva dana. Nakon inkubacije, bakterijske ćelije su istaložene centrifugiranjem u kivetama volumena 50 mL, na 10.000 x g u trajanju od 10 minuta, na sobnoj temperaturi. Supernatant sa fagima je sakupljen u sterilan erlenmajer i dopunjen do 600 mL novim, sterilnim LB medijumom, inokulisan je prekonoćnom kulturom *A. baumannii* i inkubiran na orbitalnom šejkeru u prethodno pomenutim uslovima naredna dva dana. Ovaj postupak je

ponovljen i četvrtog dana, a šestog dana je nakon inkubacije primenjen samo korak centrifugiranja radi dobijanja suspenzije faga bez bakterijskih ćelija (Gavrić i Knežević, 2022a).

4.3.2. Precipitacija i purifikacija faga

Radi precipitacije, odnosno koncentrovanja faga, na 40 mL prečišćenog supernatanta je dodato 10 mL rastvora NaCl i polietilen glikola PEG8000 (0,5 M NaCl / 4% PEG-8000 (v/v)). Kivete su ostavljene u ledu na 4°C preko noći. Sledećeg dana su fagi istaloženi centrifugiranjem na 12.000 x g u trajanju od 15 minuta. Supernatant je odliven, a proces je ponovljen još dva puta da bi se osiguralo odsustvo bakterijskih ćelija. Talog sa fagima je resuspendovan u 1 mL SM pufera po svakoj kiveti (Knežević i Petrović, 2008). U ukupnoj zapremini od 6 mL suspenzija sa fagima je 100 puta koncentrovana u odnosu na početnu. Suspenzije faga su prečišćene u ekvilibrijumu CsCl-a (0,375 g CsCl / 1 mL suspenije faga) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SAD). Ovako pripremljeni fagi su centrifugirani u vakuumu na 135.000 x g (fiksni rotor, Ti50, Beckman Coulter, Brea, CA, SAD), u trajanju od 42 h na temperaturi od 4°C. Trake sa fagima su nakon centrifugiranja aspirirane pomoću šprica i igle. Kako bi se uklonio CsCl iz prečišćene suspenzije faga izvršena je dijaliza u SM puferu. Za dijalizu 1 mL suspenzije korišćeno je 2 litre pufera koji se zamenjivao novim na 24 h, tokom tri dana.

4.4. ODREĐIVANJE BROJNOSTI FAGA U SUSPENZIJI

U svrhe određivanja brojnosti faga korišćene su različite modifikacije SPOT metode sa jednim i sa dva sloja agara (Gavrić i Knežević, 2022a). Različite metode su upotrebljene zbog specifične prirode filamentoznih faga i njihove slabe sposobnosti da formiraju plake. Suspenzije faga su pripremljene u SM puferu u desetostrukim razblaženjima od 10^{-1} do 10^{-10} i 10 µL iz svakog razblaženja je dodato na konfluentan bakterijski rast svakog od 63 *A. baumannii* soja. Ploče su inkubirane na 37 °C tokom 24 sata. Primenjene su i standardne metode sa jednim slojem agara (eng. *single-layer method*) (Grabow, 1986) i sa dva sloja agara (eng. *double-layer method*) (Sambrook i Russel, 2001). Za metodu sa dva sloja agara 10 mL čvrste LB podloge sa 1,5% agara je prethodno razliveno u petrijeve ploče, a preko nje je razliveno 3 mL otopljene λ top podloge sa 0,65% agara inokulisane sa 100 µL bakterije domaćina i 10 µL različitog razređenja suspenzije virusa, ploče su inkubirane na 37 °C u trajanju do 24h. Za metodu sa jednim slojem agara je 10 mL inokulisanog λ top podloge sa 0,65% agara sa bakterijom razliveno u petrijeve ploče. Po 10 µL iz razređenja suspenzije faga je aplicirano na λ top i ploče su inkubirane na 37 °C do 24h. Nakon inkubacije od 6, 8, 12 i 24h, zabeleženo je prisustvo/odsustvo plaka.

U cilju izazivanja stresnih uslova za domaćina i eventualnog olakšavanja procesa produkcije faga, u λ top podlogu je dodavana 1/4 i 1/8 MIC sledećih antibiotika za svaki soj: ceftriakson, ciprofloksacin, hloramfenikol, kanamicin, gentamicin, tetraciklin i polimiksin B. Ploče su inkubirane i očitavane na prethodno opisan način.

4.5. ODREĐIVANJE PROTEINSKOG PROFILA FAGA

U cilju određivanja proteinskog profila faga primenjena je natrijumdodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE metoda, Laemmil, 1970). Ekstrakcija proteina iz prečišćene suspenzije faga je urađena metodom hloroform/metanol (Sambrook i Russel, 2001). Suspenzija faga, ledeni metanol i hloroform su pomešani u odnosu 1:1:0,75 (v/v/v) i smeša je centrifugirana na 18.000 xg, tokom 10 minuta, na 4°C. Gornja faza u kojoj su izdvojeni hloroform i pufer je uklonjena, a u ostatak smeše u kojoj su proteini i metanol dodat je metanol u istoj zapremini (1:1, v/v) i ponovljeno je centrifugiranje. Nakon toga je odliven metanol, a postupak tretmana metanolom i centrifugiranja je ponovljen, nakon čega su proteini dobijeni u vidu taloga.

Talog je resuspendovanu u 50 μL destilovane vode, a koncentracija proteina je kvantifikovana korišćenjem Bradfordovog proteinskog testa (Bradford, 1976). Proteini u željenoj koncentraciji su kombinovani sa 2x SDS-PAGE puferom za uzorke, zagrevani na 98 °C tokom 5 minuta, i odmah ohlađeni na ledu da bi se sprečila renaturacija proteina. Dobijeni uzorci proteina su naknadno podvrgnuti analizi korišćenjem SDS-PAGE. Uzorci su aplicirani na poliakrilamid gel, na 200 V u puferu (Tris-HCl 0,25 $molL^{-1}$; glicin 0,19 $molL^{-1}$; SDS 0,1 % v/v, pH 8,65). Deo gela za razdvajanje proteina je bio 15% v/v, a koncentrujući deo gela je bio sa nižom koncentracijom akrilamida (~ 4% v/v).

PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Litvanija) marker sa proteinima različitih molekulskih masa je upotrebljen radi određivanja molekulske mase proteina viriona. Nakon elektroforeze gel je fiksiran u rastvoru glutaraldehida 5% (v/v) da bi se sačuvali proteini male molekulske mase kakav je protein kapsida, a zatim u rastvoru metanola i glacijalne sirćetne kiseline (50% MeOH i 10% glacialne sirćetne kiseline). Nakon fiksiranja gel je obojen Coommassie Briliant Blue R bojom, zatim obezbojen i dokumentovan primenom BioDocAnalyze 2.2 sistema (Biometra, Gottingen, Nemačka). Da bi se predvidela veličina CoaA i CoaB proteina *in silico* SiglanIP-5 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/) je upotrebljen kako bi ukazao na mesto uklanjanja signalne sekvence proteina koje nisu deo viriona.

4.6. MORFOLOGIJA ODABRANIH FAGA

Morfološka karakterizacija faga određena je transmisionim elektronskim mikroskopom. Suspenzija faga je je naneta na bakarne mrežice obložene ugljenikom koje sadrže Formvar film, u trajanju od 5 minuta radi adsorpcije faga (Bozzola i Russell, 1998). Nakon toga su pričvršćene čestice viriona kontrastirane uranil-acetatom (0,5-1%) 1 minut i ostavljene na sušenje na vazduhu. Ovako pripremljeni uzorci su analizirani transmisionim elektronskim mikroskopom Philips CM 100 (Philips, Amsterdam, Holandija) pri naponu od 80 kV, a mikrografije su dobijene Gatan Bioscan CCD kamerom pomoću Digital Micrograph software 3.4 (Gatan Inc., Pleasanton, CA, SAD). Morfologija faga je izražena kao srednja vrednost deset merenja.

4.7. KARAKTERIZACIJA GENOMA FAGA

Da bi se okarakterisao genom izolovanog faga Af1, pristupilo se izolaciji viralne DNK koja je ispitana na prisustvo *ITS* i *recA* gena kako bi se potvrdilo odsustvo DNK domaćina. Viralna DNK je ispitana i na prisustvo *zot* gena, a tretirana je i različitim enzimima sa endonukleaznom aktivnošću koji svojim afinitetom prema specifičnom supstratu daju informaciju o osobinama izolovane DNK .

4.7.1. Izolacija viralne DNK

Izolacija je izvršena metodom fenol-hloroform (Sambrook i Russell, 2006). Da bi se uklonila rezidualna bakterijska DNK i RNK u suspenziji faga nakon dijalize, dodato je 5U mL^{-1} DNaze, 10 mg mL^{-1} RNaze i 1.5 mM mL^{-1} $MgCl_2$ pufera. Uzorci su inkubirani 24 h na 37°C. Posle inkubacije, DNaza i RNaza su inaktivirane inkubacijom na 65 °C tokom 1 sata, a zatim u cilju razaranja kapsida dodatkom 20 mM Na_2EDTA, 50 µL mL^{-1} proteinaze K i 0,5% SDS i smeša je inkubirana na 56 °C tokom 1 sata. DNK faga je ekstrahovana metodom fenol-hloroform, nakon čega je usledilo taloženje etanolom. Naime, nakon uklanjanja bakterijskih nukleinskih kiselina, smeša je tretirana hladnim ekvilibrisanim fenolom (1:1 v/v) i centrifugirana 5 minuta na sobnoj temperaturi na 3.000 x g, nakon čega je vodena faza preneta u nove kivete i tretirana smešom fenola i hloroforma (v/v). Kivete su centrifugirane na isti način nakon čega je vodena faza odvojena u nove kivete, tretirana hloroformom (1:1, v/v) i centrifugirana na opisan način. Ovako dobijena vodena faza je prebačena u nove kivete i DNK je precipitirana sa duplom zapreminom 96% ledenog etanola i 3 M natrijum-acetata (1:10 v/v). Smeša je inkubirana 20

minuta na -20 °C nakon čega je centrifugirana na 18.000 x g tokom 20 minuta na 4 °C radi taloženja DNK. Pelet je ispran sa 70% hladnog etanola i centrifugiran istom silom 5 minuta na 4 °C. Nakon uklanjanja supernatanta osušen pelet je resuspendovan u 30 µL pufera (Elution buffer, MiniPrep, 10 mM Tris–HCL, pH 8,5). Koncentracija DNK faga je izmerena pomoću aparata BioSpec-nano (Shimadzu Biotech, Japan), podešenog za određivanje koncentracije ssDNK.

Ovako izolovana DNK je testirana na prisustvo gena specifičnih za rod (*ITS*) i vrstu (*recA*) bakterije *A. baumannii* da bi se potvrdilo odsustvo bakterijske DNK u uzorku.

4.7.2. Tretman genoma različitim nukleazama

Izolovana virusna DNK je ispitivana na prisustvo *zot* gena, a karakterizacija virusne DNK i verifikacija njene kružne i jednolančane prirode urađena je tretmanom sledećih enzima: DNaza, TaqI, S1 nukleaza i egzonukleaza I (ExoI). U tabeli 6 predstavljene su nukleaze sa svojim specifičnim afinitetima. Potencijalni dsDNK fragmenti potencijalno prisutne RF nastali dejstvom enzima TaqI su predviđeni pomoću WebCutter alata (https://heimanlab.com/cut2.html).

Tabela 6. Upotrebljeni enzimi u tretmanima viralne DNK i njihovi supstrati

Naziv enzima	Vrsta DNK koju dati enzim zaseca
DNaza	Jednolančana i dvolančana, linearna i cirkularna DNK
TaqI	Linearna dvolančana DNK
ExoI	Linearna jednolančana DNK
S1	Linearna i cirkularna, jednolančana DNK

4.8. INFEKCIJA ODABRANIH SOJEVA FAGIMA I UTICAJ NA FENOTIPSKE KARAKTERISTIKE DOMAĆINA

Kako bi se ustanovile eventualne promene u fenotipskim osobinama bakterijske ćelije pod uticajem infekcije fagom, odabrani su *A. baumannii* sojevi bez Af specifičnih genetičkih elemenata, koji su inficirani Af1, Af4 i AfK fagima. Nakon toga je proverena uspešnost infekcije, a inficirani sojevi su uporedo sa svojim neinficiranim ekvivalentima podvrgnuti testiranju ključnih karakteristika koje obezbeđuju opstanak bakterijskih ćelija, patogenost i virulenciju. Za statističku obradu dobijenih rezultata upotrebljen je višestruki *t* test.

4.8.1. Infekcija odabranih sojeva *A. baumannii* specifičnim filamentoznim fagima

Filamentozni fagi Af1, Af4 i AfK izolovani iz sojeva ATCC 19606, Aba-4804 i Aba-K, korišćeni su za infekciju ukupno 43 različita *A. baumannii* soja. Af1 i Af4 pripadaju A grupi faga na osnovu konstruisanih prajmera i aminokiselinskih sekvenci Zot, dok AfK pripada C grupi. Odabrani sojevi za infekciju su bili oni koji su dali negativnu PCR na prisustvo *zot* gena, što ukazuje na odsustvo filamentoznih profaga specifičnih za *A. baumannii* u tim sojevima. Infekcija sojeva *A. baumannii* filamentoznim fagima izvedena je metodom koju su opisali Gavrić i Knežević (2022b) zasejavanjem tečne LB podloge prekonoćnom bakterijskom kulturom i nerazređenom suspenzijom bakteriofaga u odnosu 1:1:10 (v/v/v), nakon čega je usledila inkubacija preko noći na 37 °C. Nakon inkubacije bakterijske ćelije su centrifugirane na 6.000 x g tokom 2 minuta. Supernatant je odbačen, a pelet sa bakterijama resuspendovan u PBS puferu (Knežević i Petrović, 2008) i ponovljeno je centrifugiranje. Ovaj korak je urađen još jednom kako bi se odstranili potencijalno prisutni, slobodni, neadherirani fagi. Pelet je resuspendovan u MH bujonu i inkubiran na 37 °C preko noći. Nakon inkubacije ponovljeno je ispiranje i dodavanje svežeg medijuma dva puta da bi se osiguralo uklanjanje iz medijuma faga koji nisu inficirali domaćina. Resuspendovane bakterije u medijumu presejane su na MH agar i inkubirane na 37 °C preko noći. Subkultivacija na čvrstoj podlozi je ponovljena tri puta da bi se dobile stabilne kolonije. Prisustvo Af1, Af4 i AfK profaga u *A. baumannii* je potvrđen PCR metodom. Termalni ciklus reakcije je dizajniran tako da početni ciklus od 94 °C bude u trajanju od 5 minuta, zatim 35 ciklusa od 94 °C u trajanju od 30 s, aniling na 58 °C tokom 20 s, i ekstenzija na 72 °C tokom 60 s, sa konačnom ekstenzijom u trajanju od 7 minuta na 72 °C. Rezultati su posmatrani nakon elektroforeze na 2% agaroznom gelu obojenom sa etidijum bromidom, a dobijeni produkti su i sekvencirani.

4.8.2. Uticaj *A. baumannii* specifičnih filamentoznih faga na fenotip domaćina

Kako bi se ustanovio uticaj infekcije izolovanim filamentoznim fagima na fenotip *A. baumannii* i radi utvrđivanja značaja ovih faga u uspostavljanju infekcije testirane su eventualne promene osnovnih karakteristika ovog patogena koje obezbeđuju fitnes i virulenciju, kao što su rast, pokretljivost pilima, produkcija biofilma i ugljenih hidrata, osetljivost na antibiotike i ekspresija gena za efluksne pumpe koje su deo sistema za postizanje rezistencije na antibiotike. Određivanje razlike između fenotipskih osobina *A. baumannii* neinficiranih sojeva u odnosu na iste sojeve inficirane Af4 i AfK fagima je vršeno primenom višestrukog *t* testa u programu GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc., 2016), a razlike su smatrane statistički značajnim u slučaju kada je $p \leq 0{,}5$.

4.8.2.1.Kinetika rasta

Da bi se uporedio rast sojeva pre i nakon infekcije fagima, napravljene su bakterijske suspenzije optičke gustine 3 McFarland (~$9x10^8$ CFU mL^{-1}) korišćenjem prekonoćnih bakterijskih kultura i suspenzije su dalje razblažene u dvostruko koncentrovanom MH bujonu u odnosu 1:1 (v/v). Nakon toga suspenzije su razblažene u PBS puferu u odnosu 1:100 (v/v), a zatim u bunarčiće mikrotitar ploče dodato je 200 µL ovako inokulisanog medijuma u duplikatu. Tokom inkubacije u trajanju 24 h na 37 °C uz stalno agitaciju u čitaču mikrotitar ploča (Multiscan GO, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finska) svakih 30 minuta merena je apsorpcija na 600 nm, a prosečne vrednosti za inficirane sojeve su upoređene sa onima za neinficirane sojeve. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost od tri nezavisna ponavljanja eksperimenta.

4.8.2.2.Pokretljivost pilima

Kako pili predstavljaju receptore za filamentozne fage i važan factor virulencije, urađen je test trzajuće pokretljivosti pomoću pila *A. baumannii* sojeva pre i nakon infekcije fagima. Eksperiment je izveden zasejavanjem ubodom *A. baumannii* inficiranih i neinficiranih sojeva u LB hranljivu podlogu sa 1,5% agara. Posle 24h inkubacije na 37 °C, agar je uklonjen i 0,4% rastvor kristalviolet je primenjen na svaku Petrijevu posudu na mesto uboda ezom, pri čemu se kristalviolet rastvor vezuje za ćelije bakterije dok na mestima gde nije bilo rasta ostaje neobojena površina. Ovaj test je izveden u četiri nezavisna ponavljanja. Testirani *A. baumannii* sojevi su klasifikovani korišćenjem postojećih kriterijuma za pokretljivost pilima za ovu vrstu: <5 mm trzajuće negativan (nepokretan), 5-20 mm srednje pokretan, >20 mm visoko pokretan pilima (Vijaiakumar i sar., 2016).

4.8.2.3.Produkcija ugljenih hidrata

Kako bi se utvrdio efekat infekcije Af fagima na sposobnost produkcije kapsule, kvantifikovana je ukupna količina polisaharida u bakterijskim ćelijama, uključujući lipooligosaharide (LOS) i polisaharide kapsule. Šest bakterijskih sojeva, neinficiranih i inficiranih sa Af4 i AfK fagima, kultivisani su u 50 mL BHI bujona tokom pet dana pri temperaturi 37 °C, u cilju stimulacije proizvodnje ugljenih hidrata. Referentni soj ATCC 19606 pripada nekapsuliranim sojevima te je korišćen kao kontrola. Kulture su nakon isteka perioda inkubacije centrifugirane u trajanju od 5 minuta pri 14.000 × g. Proces ekstrakcije ugljenih hidrata je uključivao ispiranje ćelija sa 10 mL 50 mM NaCl, uz centrifugiranje tokom 5 min na 14.500× g, pet puta. Ćelije su zatim resuspendovane u 50 mM EDTA i normalizovane kako bi se OD_{600} ujednačio na 0.25. Normalizovane suspenzije su inkubirane 1 h na temperaturi od 37 °C da bi se omogućilo oslobađanje polisaharida iz ćelije. Centrifugiranje je ponovljeno pod istim

uslovima, a supernatant je sakupljen u novu kivetu. Nakon ekstrakcije polisaharida, 200 µL svakog uzorka je pipetirano u staklene epruvete. Takođe, u staklenim epruvetama napravljen je standard ugljenih hidrata kao serija koncentracija saharoze i fruktoze jednake zapremine u opsegu od 0-120 µg/mL. Koncentracije ugljenih hidrata su određene metodom sumporna kiselina/fenol, kojom se formiraju furfurali žute boje (Dubois i sar, 1956; Kon i sar., 2020). Napravljena je standardna kriva pomoću opsega poznatih koncentracija saharoze/fruktoze (1:1 v/v) (0–120 µg/mL) na osnovu koje su linearnom regresijom ustanovljene koncentracije ugljenih hidrata u uzorcima. Svim uzorcima zapremine 200 µL, standardu ugljenih hidrata i EDTA kao negativnoj kontroli, dodavano je 200 µL 5% fenola (u vodi) i 1 mL 93% sumporne kiseline nakon čega je usledila inkubacija na sobnoj temperaturi tokom 10 min uz povremeno mešanje staklenim štapićem. Dobijeni derivati furfurala su kvantifikovani korišćenjem spektrofotometra (Multiscan GO, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finska) merenjem optičke gustine na 490 nm za svaki bunarčić. Pomoću konstruisane standardne krive i interpolacionih vrednosti linearnom regresijom izračunata je ukupna količina ugljenih hidrata u svakom uzorku.

4.8.2.4.Formiranje biofilma na polistirenskoj površini

Da bi se sagledao uticaj *A. baumannii* specifičnih filamentoznih faga na formiranje biofilma, kao jednog od glavnih karakteristika virulencije ovog patogena, korišćena je metoda opisana od strane Knežević i Petrović (2008b). Bakterijske prekonoćne kulture inficiranih i neinficiranih sojeva u tečnom MH bujonu su centrifugirane na 6.000 x g tokom 2 min. Dobijeni supernatant je uklonjen, pelet je resuspendovan u 1 mL PBS pufera i ponovo centrifugiran. Ovi koraci su ponovljeni dva puta, a zatim su pripremljene bakterijske suspenzije optičke gustine 0,5 McFarland (~10^8 CFU mL^{-1}). Suspenzije su razblažene u PBS puferu u odnosu 1:100 (v/v), a zatim dalje razblažene u MH bujonu u odnosu 1:1 (v/v). Zapremina od 300 µL inokulisanog medijuma dodana je u bunarčiće mikrotitar ploče i inkubirana na 37°C tokom 24 h. Nakon inkubacije, medijum je pažljivo uklonjen, a bunarčići mikrotitar ploče su dva puta isprani sa 300 µL PBS-a. Apsolutni metanol je dodat za fiksaciju formiranog biofilma (300 µL po bunarčiću). Posle 15 minuta, metanol je uklonjen i ploča je ostavljena da se osuši 15 min na 44 °C. Dalje je biofilm obojen primenom 0.4% kristalviolet rastvora tokom 15 minuta nakon čega je mikrotitar ploča isprana pod mlazom vode iz vodovoda da bi se uklonio višak kristalno ljubičaste boje. Kada je završenosušenje ploče, dodato je 300 µL 33% sirćetne kiseline da bi se rastvorila fiksirana boja, a mikrotitar ploča je zatim držana na sobnoj temperaturi 20 minuta. Čitač mikrotitar ploča (Multiscan GO, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finska) je korišćen za merenje optičke gustine za svaki bunarčić na 595 nm. Koristeći ODc vrednost, izvršena je procena ćelijske adhezije. ODc pokazuje srednju optičku gustinu negativne kontrole (OD) za testiranu mikrotitar ploču i uvećanu za tri standardne devijacije dobijene za negativne kontrole.

Sledeći standardi su korišćeni za grupisanje sojeva *A. baumannii*: OD ≤ ODc = neadherentan; ODc< OD ≤ (2 × ODc) = slabo adherentan; (2 × ODc) < OD ≤ (4 × ODc) = umereno adherentan (4 × ODc) < OD = visoko adherentan (Fekrirad i sar., 2021). Upoređene su prosečne vrednosti inficiranih i neinficiranih sojeva. Ovaj test je izveden u tri nezavisna ponavljanja u triplikatu.

4.8.2.5.Osetljivost na antibiotike

Bakterijske suspenzije 0,5 McFarland (~10^8 CFU mL^{-1}) su pripremljene i razblažene u MH bujonu (1:100 v/v). Tri antibiotika iz različitih grupa korišćena u eksperimentu su tobramicin, ciprofloksacin i ceftriakson. Konačna koncentracija svakog antibiotika u mikrotitar pločama bila je u rasponu od 1.25 do 512 μg mL^{-1} i dodata je u bunarčiće mikrotitar ploče zajedno sa istom zapreminom inokulisanog medijuma. Brojnost bakterija u bunarčiću je iznosila ~1 × 10^6 CFU mL^{-1}. Ploče su zatim inkubirane tokom 18 h na 37 °C. Zatim je 10 μL 0.1% rastvora 2,3,5-trifeniltetrazolijum hlorida (TTC) dodato u svaki bunar mikrotitar ploče, gde je pretvoren u crveni formazan dehidrogenazama živih bakterijskih ćelija. Vrednost MIC (minimalne inhibitorne koncentracije) je za svaki antibiotik očitana nakon što su mikrotitar ploče inkubirane dodatna dva sata na 37 °C. MIC je definisana kao najniža koncentracija antibiotika potrebna da spreči konverziju TTC-a u crveni formazan. Referentni soj *Escherichia coli* ATCC 25922 je korišćen kao kontrola, a eksperiment je izveden u tri nezavisna ponavljanja u triplikatu. Prema standardnim kriterijumima za *A. baumannii,* inficirani i neinficirani sojevi su klasifikovani kao osetljivi, srednje osetljivi ili otporni na antibiotike (CLSI, 2018). Rezultati su prikazani kao geometrijska sredina, a statistički značajna promena je definisana kao dvostepeno smanjenje MIC vrednosti za inficirane sojeve ili promena kvalitativne osetljivosti (osetljiva, umereno osetljiva i rezistentna).

4.8.2.6.Ekspresija efluksnih pumpi

Zbog značajne uloge sistema efluksnih pumpi u rezistenciji bakterija na antibiotike, odabrane su pumpe odgovorne za grupe antibiotika na kojima se ispitivala promena u MIC vrednostima. qRT-PCR metodom proverena je promena u ekspresiji sledećih efluksnih pumpi: *adeA, adeB, adeC* i *abeMRT* kod *A. baumannii* sojeva nakon infekcije filamentoznim fagima. LB bujon u zapremini od 50 mL inokulisan je prekonoćnom kulturom inficiranih i neinficiranih sojeva u konačnoj brojnosti od ~10^6 CFU mL^{-1} i inkubiran na 37 °C uz orbitalnu agitaciju na 200 rpm/min tokom 6 h. Nakon inkubacije, 1 mL inokulisanog medijuma je korišćen za izolaciju RNK upotrebom GeneJET kompleta za prečišćavanje RNK (ThermoFisher Scientific, Vilnius, Litvanija). Koncentracija izolovane RNK iz svih uzoraka je ujednačenai zatim prečišćena 1 U DNazeI tokom 30 minuta na 37 °C. Nakon toga, DNazaI je inaktivirana sa 50 mM EDTA na 65 °C tokom 10 minuta. Prečišćeni uzorci RNK su prevedeni u cDNK upotrebom kompleta za

reverznu transkripciju cDNK visokog kapaciteta (Applied Biosistems, Bedford, MA, SAD) sa sledećim koracima: 10 minuta na 25 °C, zatim 120 minuta na 37 °C i konačno 5 minuta na 85 °C. Reakciona smeša je zatim ohlađena na 4 °C. Urađen je qRT-PCR sa SYBR-Green-om sa šest parova prajmera specifičnih za pomenute efluksne pumpe (Tabela 7). Da bi se podaci normalizovali, korišćen je par prajmera koji cilja visoko konzervisan *rpoB* gen *A. baumannii* (Tabela 7). Relativna ekspresija gena je utvrđena pomoću metode $2^{-\Delta\Delta CT^{\wedge}}$ sa graničnom RFC vrednošću <0,67 za nižu ekspresiju i >1,5 za povećanu ekspresiju (Livak i Schmittgen, 2001).

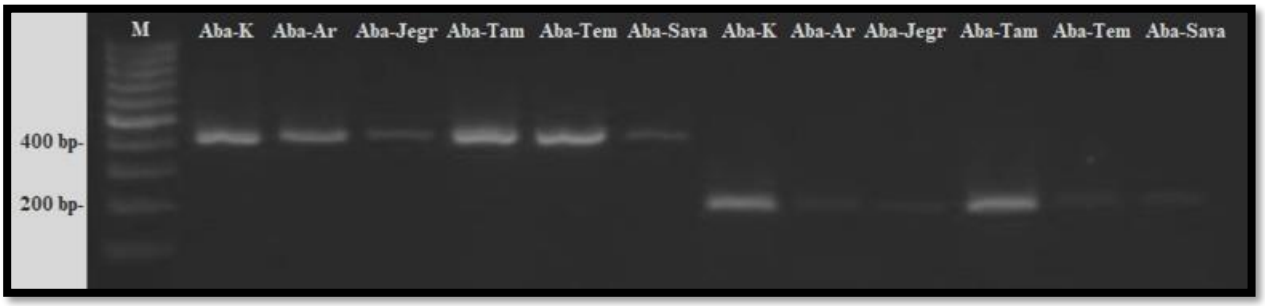
Tabela 7. Prajmeri korišćeni za qRT-PCR

Targetno mesto	Oznaka	Sekvenca (5′→3′)	Veličina (bp)	Referenca
RND sistem efluksnih pumpi	adeA For	ATCGCTAACAAAGGCTTGGAA	159	Coyne, et al. (2010)
	adeA Rev	CGCCCCCTCAGCTATAGAA		
	adeB For	CTTGCATTTACGTGTGGTGT	168	
	adeB Rev	GCTTTTCTACTGCACCCAAA		
	adeC For	TACACATGCGCATATTGGTG	117	
	adeC Rev	CGTAAAATAACTATCCACTCC		
MATE familija efluksnih pumpi	abeMRT F	CCAAAGCAGGTATTGGTCCT	119	
	abeMRT R	CTATTCCGAAGCATTAG		
Konzervisan gen *rpoB*	rpoB F	TCCGCACGTAAAGTAGGAAC	154	
	rpoB R	ATGCCGCCTGAAAAAGTAAC		

5. REZULTATI

5.1. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA *Acinetobacter baumannii* SOJEVA

U kolekciji PK laboratorije deponovano je 63 soja *A. baumannii,* 3 referentna soja ATCC 19606, ATCC BAA747 (Manassas, VA, SAD) i NCTC 13423 (Public Haelth England, UK), 28 sojeva ranije izolovanih (Aleksić Sabo i sar., 2021) i 32 soja izolovano za potrebe ove studije iz različitih vodenih ekosistema kao što su površinske, podzemne i otpadne vode. Pikirane bledoljubičaste kolonije na Herella agar selektivnoj su presejane i subkultivisane na neselektivnoj hranljivoj podlozi, nakon čega je biohemijskim i molekularno-genetičkim metodama izvršena identifikacija sojeva. Na osnovu primenjenih biohemijskih testova: katalaza tetst, oksidaza test, oksidativno-fermentativni test i test sposobnosti denitrifikacije utvrđeno je da pikirane kolonije pripadaju Acb kompleksu, odnosno da su katalaza pozitivne, oksidaza negativne, da imaju aerobni tip metabolizma i da ne vrše denitrifikaciju. Zatim, ustanovljen je i dobar rast izolata na podlogama MacConkey i Endo agar, što takođe ukazuje na pripadnost Acb kompleksu. Preciznijom identifikacijom na osnovu primenjene PCR metode potvrđeno je prisustvo *recA* gena i gena *ITS* regiona specifičnih za *A. baumannii* kod svih novoizolovanih sojeva. Na slici 10 je prikazano pristustvo očekivanog produkta *ITS* regiona od 208 bp koji ukazuje na pripadnost rodu *Acinetobacter* i produkta *recA* gena veličine 425 bp koji ukazuje na pripadnost vrsti *A. baumannii*. Ova metoda je predstavljena na prvih 6 izolovanih sojeva, a primenjivano je i na ostale sojeve deponovane u kolekciji PK Lab.

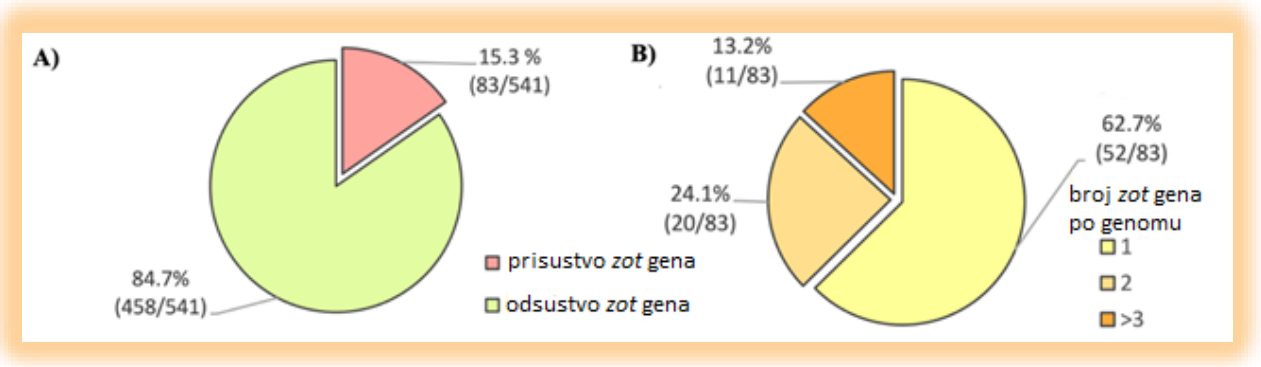


Slika 10. PCR reakcija sa specifičnim prajmerima za rod i vrstu *A. baumannii* na prvih šest izolovanih sojeva. M-marker 100 bp. Produkti veličine 425 bp potvrđuju pripadnost izolata rodu *Acinetobacter*, a produkti veličine 208 bp vrsti *A. baumannii*.

5.2. IDENTIFIKACIJA I UTVRĐIVANJE PREVALENCE Af PROFAGA U *A. baumannii* SOJEVIMA

5.2.1. *In silico* analiza sekvenciranih sojeva

Temeljna analiza sekvenciranog genoma soja ATCC 19606 otkrila je prisustvo filamentoznog profaga, označenog kao Af1. Sekvence njegovih ključnih gena, *zot*, *CoaA* i *CoaB*, ukazuju na relativno široku distribuciju filamentoznih profaga u genomima različitih sekvenciranih *A. baumannii* sojeva. Prisustvo *zot* gena je otkriveno u 83 od 541 soja(tabela 8), što čini približno 15,3% ukupno ispitivanih sojeva (Slika 11.A). Više od polovine sojeva imalo je jedan *zot* gen (62,2%), dva *zot* gena su detektovani u 24,4% i tri ili više u 13,4% sojeva u kojima je detektovano prisustvo *zot* gena (Slika11.B).



Slika 11. Prevalenca Af faga u *A. baumannii*: **A)** prevalenca profaga determinisana *in silico* izražena u procentima; **B)** prevalenca profaga u genomima pozitivnim na *zot*, sa različitim brojem *zot* gena u genomu.

Tabela 8. *In silico* analiza 541 soja *A. baumannii* deponovanih u NCBI bazi.

Br.	***A. baumannii* soj**	**Poreklo uzorka**	**Pristupni broj**	**Pristupni broj za Zot protein**	**Koordinate *zot* gena**	**Zot grupa**	**Genom**
1.	09A16CRGN0014	Humani izolat	NZ_CP034242.1/CP034242.1				
2.	09A16CRGN003B	Nozokomijalna infekcija	NZ_CP034243.1/CP034243.1				
3.	10_3	pacijent	NZ_CP059547.1/CP059547.1	UAB24888.1	1,863,174..1,864,454	H	flankovan
4.	10_4	zemljište	NZ_CP059546.1/CP059546.1	UAB21455.1 UAB21447.1	1,869,334..1,870,614 1,863,204..1,864,484	H H	flankovan flankovan
5.	10042	sekrecija	NZ_CP023026.1/CP023026.1				
6.	10324	Bronhijalna tečnost	NZ_CP023022.1/CP023022.1				
7.	11A1213CRGN008	Nozokomijalna infekcija	NZ_CP035186.1/CP035186.1				
8.	11A1213CRGN055	Nozokomijalna infekcija	NZ_CP035185.1/CP035185.1				
9.	11A1213CRGN064	Nozokomijalna infekcija	NZ_CP043419.1/CP043419.1				
10.	11A1314CRGN088	Nozokomijalna infekcija	NZ_CP035184.1/CP035184.1				
11.	11A1314CRGN089	Nozokomijalna infekcija	NZ_CP043418.1/CP043418.1				
12.	11A14CRGN003	Nozokomijalna infekcija	NZ_CP035183.1/CP035183.1				
13.	11W359501	Direktno pohranjivanje	CP041035.1	QDE16874.1	2,054,177..2,055,352 2074,055..2,075,300 2,062,895..2,064,174	E pseudo pseudo	flankovan
14.	1326359	životna sredina	CP107577.1				
15.	1326525-1	koža	CP107579.1				
16.	1326525-2	koža	CP107581.1				
17.	1326525-3	koža	CP107583.1				
18.	1326527-1	koža	CP107585.1				
19.	1326527-2	koža	CP107587.1				
20.	1326569	koža	CP107590.1				
21.	1326580	koža	CP107593.1				
22.	1326581-1	rana	CP107595.1				
23.	1326581-2	rana	CP107597.1				
24.	1326584	koža	CP107599.1				
25.	1326589	koža	CP107601.1				
26.	1326595	koža	CP107603.1				
27.	1326924-1	životna sredina	CP107605.1				
28.	1326924-2	životna sredina	CP107608.1				

29.	1326924-3	životna sredina	CP107610.1				
30.	1326927-1	životna sredina	CP107612.1				
31.	1326927-2	životna sredina	CP107614.1				
32.	1326932	životna sredina	CP107616.1				
33.	15A34	plućni	NZ_CP020590.1/CP020590.1		-		
34.	15A5	plućni	NZ_CP020574.1/CP020574.1				
35.	1656-2	Klinički izolat	NC_017162.1/CP001921.1		-		
36.	17-84	humani	NZ_CP059479.1/CP059479.1	QNB02254.1	2,631,785..2,632,945	F	Klasičan
37.	2008S11-069	Klinički izolat	CP033516.1		-		
38.	2014BJAB1	krv	NZ_CP059354.1/CP059354.1				
39.	2014LNAB1	krv	NZ_CP059352.1/CP059352.1				
40.	2014TJAB1	krv	NZ_CP059349.1/CP059349.1				
41.	2016BJAB1	sputum	NZ_CP059355.1/CP059355.1				
42.	2016GDAB1	bronchoalveolar lavage fluid	NZ_CP065051.1/CP065051.1				
43.	2016LNAB1	cerebrospinalna tečnost	NZ_CP059353.1/CP059353.1				
44.	2018BJAB1	sputum	NZ_CP059351.1/CP059351.1				
45.	2018BJAB2	bronhijalni	NZ_CP059350.1/CP059350.1				
46.	2018HBAB1	abdominalna tečnost	NZ_CP059356.1/CP059356.1				
47.	2018HLJAB1	gnoj	NZ_CP059358.1/CP059358.1				
48.	2018HLJAB2	abdominalna tečnost	NZ_CP059357.1/CP059357.1				
49.	2018TJAB1	krv	NZ_CP059359.1/CP059359.1				
50.	2021CK-01300	Rana apsces	NZ_CP104342.1/CP104342.1				
51.	2021CK-01332	rana/apsces	NZ_CP104347.1/CP104347.1				
52.	2021CK-01333	sputum	NZ_CP104350.1/CP104350.1				
53.	2021CK-01335	rana/apsces	NZ_CP104351.1/CP104351.1				
54.	2021CK-01407	sputum	NZ_CP104449.1/CP104449.1				
55.	2021CK-01408	krv	NZ_CP104335.1/CP104335.1				
56.	2021CK-01409	rana/apsces	NZ_CP104340.1/CP104340.1				
57.	2022CK-00337	sputum	CP115629.1				
58.	2022CK-00839	krv	CP117762.1				
59.	280820	krv	NZ_CP098791.1/CP098791.1	USI39205.1 USI37014.1 USI37022.1 USI37030.1	487,300..488,364 2,108,991..2,110,055 2,114,690..2,115,754 2122564-2123442	A A A I	transpozaza klasičan klasičan transpozaza
60.	29FS20	feces	CP044519.1/CP044519.1				
61.	31FS3-2	feces	NZ_CP044517.1/CP044517.1	QLF06782.1	1,984,690..1,985,904	G	flankovan
62.	3207	Bronhijalna tečnost	CP015364.1				
63.	36-1512	respiratornitrakt	NZ_CP059386.1/CP059386.1				
64.	37662	sputum	NZ_CP104751.1/CP104751.1				

65.	37662RM1	sputum	CP116803.1				
66.	37662RM2	sputum	NZ_CP116801.1/CP116801.1				
67.	40288	urin	NZ_CP077801.1/CP077801.1				
68.	5388	krv	NZ_CP096768.1/CP096768.1				
69.	5626	sputum	NZ_CP096766.1/CP096766.1				
70.	5634	sputum	NZ_CP096764.1/CP096764.1				
71.	5651	sputum	NZ_CP096762.1/CP096762.1				
72.	5653	sputum	NZ_CP096759.1/CP096759.1				
73.	5656	krv	NZ_CP096757.1/CP096757.1				
74.	5663	krv	NZ_CP096755.1/CP096755.1				
75.	5664	krv	NZ_CP096753.1/CP096753.1				
76.	5666	krv	NZ_CP096749.1/CP096749.1				
77.	5669	krv	NZ_CP096747.1/CP096747.1				
78.	5670	krv	NZ_CP096745.1/CP096745.1				
79.	5671	krv	NZ_CP096742.1/CP096742.1				
80.	5672	krv	NZ_CP096740.1/CP096740.1				
81.	5679	krv	NZ_CP096738.1/CP096738.1				
82.	5683	krv	NZ_CP096735.1/CP096735.1				
83.	5685	krv	NZ_CP096734.1/CP096734.1				
84.	5689	krv	NZ_CP096731.1/CP096731.1				
85.	5729	sekrecija	NZ_CP096729.1/CP096729.1				
86.	5732	sputum	NZ_CP096727.1/CP096727.1				
87.	5734	krv	NZ_CP096724.1/CP096724.1				
88.	5736	sputum	NZ_CP096722.1/CP096722.1				
89.	5740	sputum	NZ_CP096720.1/CP096720.1				
90.	5741	sputum	NZ_CP096717.1/CP096717.1				
91.	5745	Abdominalna tečnost	NZ_CP096714.1/CP096714.1				
92.	5759	bronchoalveolar lavage fluid	NZ_CP096710.1/CP096710.1				
93.	5760	sputum	NZ_CP096707.1/CP096707.1				
94.	5761	krv	NZ_CP096705.1/CP096705.1				
95.	5765	krv	NZ_CP096704.1/CP096704.1				
96.	5767	krv	NZ_CP096702.1/CP096702.1				
97.	5768	krv	NZ_CP096700.1/CP096700.1				
98.	5769	bronhijalni	NZ_CP096698.1/CP096698.1				
99.	5771	bronchoalveolar lavage fluid	NZ_CP096696.1/CP096696.1				
100.	5773	secretion	NZ_CP096693.1/CP096693.1				
101.	5779	sputum	NZ_CP096692.1/CP096692.1				
102.	5839	Širok geografski opseg Klinički izolat	NZ_CP096690.1/CP096690.1				
103.	5840	krv	NZ_CP096688.1/CP096688.1				

104.	5845	rana	NZ_CP023034.1/CP023034.1				
105.	5846	krv	NZ_CP096686.1/CP096686.1				
106.	5847	sputum	NZ_CP096684.1/CP096684.1				
107.	5955	tracheal aspirate	NZ_CP096682.1/CP096682.1				
108.	6080	krv	NZ_CP096681.1/CP096681.1	UQL19311.1	1,757,214..1,758,470	I	klasičan
109.	6200	Bodily fluid	CP010397.1	AJB68401.1	3,486,034..3,487,509	D	transpozaza
110.	6507	Nepoznato	NZ_CP045528.1/CP045528.1				
111.	7804	bronchoalveolar lavage fluid	CP022283.1	ASO71342.1	2,358,478..2,359,542	A	flankovan
112.	7835	tkivo	NZ_CP033243.1/CP033243.1				
113.	7847	krv	NZ_CP023031.1/CP023031.1				
114.	9102	Bronhijalna tečnost	NZ_CP023029.1/CP023029.1				
115.	810CP	feces	NZ_CP026338.1/CP026338.1	AXG85036.1	2,013,496..2,014,710	B	flankovan
116.	9201	krv	NZ_CP023020.1/CP023020.1				
117.	A1	Klinički, iz 22 države	NZ_CP010781.1/CP010781.1				
118.	A118	Krv culture	NZ_CP059039.1/CP059039.1				
		A118 DeltaH0N27_10825::kan	CP113070.1				
		A118 DeltaH0N27_10830::kan	CP113071.1				
		A118 DeltaH0N27_10820::kan H0N27_10830-K176N	CP113073.1				
		A118 DeltaH0N27_10820-30::kan	CP113072.1				
119.	A1296	sputum	NZ_CP018332.1/CP018332.1	ATI37470.1	457,231..458,295	A	transpozaza
120.	A1429	sekrecija	NZ_CP046898.1/CP046898.1	QLB36172.1	2,720,803..2,722,053	I	klasičan
121.	A320 (RUH134)	reference strain for global clone 2	NZ_CP032055.1/CP032055.1				
122.	A388	Variant ofglobal clone 1	NZ_CP024418.1/CP024418.1	ATP87138.1 ATP87121.1	1,988,818..1,989,882 1,978,284..1,979,528	A C	flankovan flankovan
123.	A52	sputum	NZ_CP034092.1/CP034092.1		-		
124.	A54	A54R	NZ_CP099857.1/CP099857.1				
		A54S	NZ_CP099858.1/CP099858.1				
125.	A85	sputum	CP021782.1	ASF77351.1 ASF77364.1	2,089,961..2,091,127 2,098,290..2,099,465	C E	flankovan flankovan
126.	Ab-3556	Sputum i krv	NZ_CP104786.1/CP104786.1				
127.	Ab-3557	Sputum i krv	NZ_CP104907.1/CP104907.1				
128.	Ab-B004d-c	sputum	CP051875.1	QJF35496.1 QJF35489.1	2,019,580..2,020,803 2,014,411..2,015,595	B F	flankovan klasičan
129.	Ab-C102	krv	NZ_CP051862.1/CP051862.1				
130.	Ab-C63	sputum	CP051866.1	QJF39179.1	1,866,099..1,867,313	B	flankovan
131.	Ab-D10a-a	cerebrospinalna tečnost	CP051869.1		3,344,073..3,345,298	pseudo	

				QJF32742.1 QJF32748.1	3,350,699..3,351,952 3,355,906..3,357,090	B F	nepotpun klasičan
133.	AB0057	krvstream isolate	CP001182.2	ACJ41387.1 ACJ41400.1 ACJ41408.1 ACJ41419.1 ACJ41435.1 ACJ41441.1	2,107,602..2,108,768 2,116,084..2,117,250 2,122,252..2,123,427 2,130,964..2,132,130 2,141,666..2,142,832 2,145,686..2,146,930	C C E C C C	flankovan klasičan flankovan flankovan flankovan klasičan
134.	AB030	bolnica	CP009257.1	AIL80789.1	3,918,472..3,919,686	B	Flankovanm
135.	AB031	bolnica	CP009256.1	AIL75680.1	2,291,172..2,292,347	E	Flankovan
136.	Ab04-mff	krv	NZ_CP012006.1/CP012006.1				
137.	AB043	generated in lab from ATCC 17979	NZ_CP043910.1/CP043910.1				
138.	AB105	nepoznato	NZ_CP103338.1/CP103338.1	UWZ62185.1	388,749..390,212	D	transpozaza
139.	AB14-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091376.1/CP091376.1				
140.	AB16-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091375.1/CP091375.1				
141.	AB167-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091368.1/CP091368.1				
142.	AB169-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091367.1/CP091367.1	UMN21410.1 UMN21420.1 UMN21397.1	997,270..998,334 1,005,254..1,006,429 988,551..989,270 1,011,375..1,012,551	A A E pseudo	flankovan flankovan flankovan
143.	AB171-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091366.1/CP091366.1				
144.	AB172-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091365.1/CP091365.1				
145.	AB173-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091364.1/CP091364.1				
146.	AB175-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091363.1/CP091363.1				
147.	AB176-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091362.1/CP091362.1				
148.	AB177-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091361.1/CP091361.1	UMN42652.1	406,847..407,911	A	flankovan
149.	AB179-VUB	sputum	NZ_CP091360.1/CP091360.1				
150.	AB180-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091359.1/CP091359.1				
151.	AB181-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091358.1/CP091358.1				
152.	AB183-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091357.1/CP091357.1				
	AB186-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091356.1/CP091356.1	UMN60612.1	3,567,519..3,568,583	A	Flankovan(pseudogen
	AB187-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091355.1/CP091355.1				
	AB188-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091354.1/CP091354.1				
	AB189-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091353.1/CP091353.1				
	AB193-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091352.1/CP091352.1				
	AB194-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091351.1/CP091351.1				
	AB20-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091374.1/CP091374.1				
	AB21-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091373.1/CP091373.1				

	AB212-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091350.1/CP091350.1				
	AB213-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091349.1/CP091349.1				
	AB214-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091348.1/CP091348.1				
	AB216-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091347.1/CP091347.1				
	AB217-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091346.1/CP091346.1				
	AB219-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091345.1/CP091345.1				
	AB220-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091344.1/CP091344.1				
	AB222-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091343.1/CP091343.1				
	AB224-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091342.1/CP091342.1				
	AB226-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091341.1/CP091341.1				
	AB227-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091340.1/CP091340.1				
	AB229-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091339.1/CP091339.1				
	AB231-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091338.1/CP091338.1				
	AB232-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091337.1/CP091337.1				
	AB2369	sputum	NZ_CP103413.1/CP103413.1				
	AB2877	sputum	NZ_CP092485.1/CP092485.1				
	AB3-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091378.1/CP091378.1				
	AB307-0294	Human krv	NZ_CP001172.1/CP001172.2		-		
	AB32-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091372.1/CP091372.1				
	AB322	krv	CP119232.1	WEI07792.1	1,374,211..1,375,455	C	flankovan
	AB329	sputum	NZ_CP091452.1/CP091452.1				
	AB34299	Direktno pohranjivanje	CP014291.1		-		
	AB36-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091371.1/CP091371.1				
	AB39-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091370.1/CP091370.1				
	AB3927	Bronchoalveolar lavage fluid	NZ_CP102831.1/CP102831.1				
	AB40-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091369.1/CP091369.1				
	AB43	sputum	NZ_CP083181.1/CP083181.1	UAS49025.1	1,923,886..1,925,052	C	flankovan
	AB44	sputm	CP107728.1				
	AB4451	sputum	NZ_CP095091.1/CP095091.1				
	AB4568	sputum	NZ_CP024613.1/CP024613.1				
	AB4653	sputum	NZ_CP024612.1/CP024612.1				
	Ab4977	sputum	NZ_CP024611.1/CP024611.1				
	AB5075-UW	tibia/osteomijelitis	NZ_CP008706.1/CP008706.1	AKA31733.1 AKA31743.1 AKA31754.1 AKA31722.1	1,999,414..2,000,658 2,005,890..2,007,134 2,012,367..2,013,611 1,994,157..1,995,317	C C C F	klasičan klasičan flankovan klasičan
	AB5075-VUB	osteomijelitis	NZ_CP070362.2/CP070362.2	QRY89980.1 QRY89988.1	1,536,145..1,537,389 1,542,617..1,543,861	C C	Klasičan Klasičan

				QRY89996.1 UEL55533.1 UEL55536.1 UEL55541.1 QRY90003.1	1,549,092..1,550,336 1,508,352..1,509,515 1,516,058..1,517,026 1,530,889..1,532,049 1,555,568..1,556,812	C F F F C	Flankovan Flankovan Klasičan Klasičan klasičan
	AB5075-VUB-itrA::ISAba13	Klinički izolat	NZ_CP070358.1/CP070358.2				
	AB5116	sputum	NZ_CP091173.1/CP091173.1				
	AB6870155	Humani sputum	NZ_CP114381.1/CP114381.1	WAU38677.1 WAU38701.1 WAU38687.1 WAU38715.1	1959681-1960847 1,975,300..1,976,475 1,965,939..1,967,105 1,984,219..1,985,385	C E C C	klasičan flankovan flankovan flankovan
	ab736	Direktno pohranjivanje	CP015121.1	ARN32238.1	3,446,367..3,447,482	A	transpozaza
	AB79	Sekrecija oka	NZ_CP054416.1/CP054416.1				
	AB9-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091377.1/CP091377.1				
	Aba	Klinički izolat	NZ_CP030083.1/CP030083.1				
	abA1	bronhijalni	NZ_CP060732.1/CP060732.1				
	AbCAN2	coccygeal isolate	NZ_CP045428.1/CP045428.1				
	ABCR01	sputum	NZ_CP042931.1/CP042931.1				
	AbCTX1	Uzorak iz grla	NZ_CP060029.1/CP060029.1		-		
	AbCTX13	peritoneal fluid	NZ_CP059729.1/CP059729.1				
	AbCTX5	kateter	NZ_CP060505.1/CP060505.1				
	AbCTX9	bronchoalveolar lavage	NZ_CP060504.1/CP060504.1				
	ABF9692	trachea	CP048827.1	QJP36502.1 QJP37779.1	548,202..549,266 2,024,695..2,025,947	A I	transpozaza klasičan
	AbH12O-A2	Nozokomijalne infekcije	NZ_CP009534.1/CP009534.1	AIS06532.1 AIS06539.1	1,918,721..1,919,944 1,924,506..1,925,666	B F	flankovan klasičan
	ABNIH28	Bolničko okruženje	NZ_CP026125.1/CP026125.1				
	AbPK1	sheep brocho-alveolar lavage	CP024576.1/CP024576.1				
	ABUH763	Direktno pohranjivanje	NZ_CP035051.1/CP035051.1				
	ABUH773	Direktno pohranjivanje	NZ_CP035049.1/CP035049.1				
	ABUH793	Direktno pohranjivanje	NZ_CP035045.1/CP035045.1				
	ABUH796	Direktno pohranjivanje	NZ_CP035043.1/CP035043.1				
	AC1633	krv	CP059300.1	QOJ60985.1 QOJ58826.1 QOJ60978.1	1,043,382..1,044,446 2,873,057..2,874,121 1,036,784..1,038,037	A A I	flankovan transpozaza flankovan
	AC29	endotracheal secretion	NZ_CP007535.2/CP007535.2				
	AC30	endotrachial secretion	CP007577.1		-		

	ACI713	Direktno pohranjivanje	NZ_CP086759.1/CP086759.1				
	ACICU	cerebrospinalna tečnost	NC_010611.1/CP000863.1		-		
			NC_010611.1/CP000863.1				
	ACN21	krv	CP038644.1	QBY88097.1	125,355..126,419	A	flankovan
	AF-401	smallcolon	CP018254.1				
	AF-673	sputum	NZ_CP018256.1/CP018256.1				
	AOR07-BL	krv	NZ_CP102762.1/CP102762.1				
	AR_0052	Direktno pohranjivanje	CP027183.1	AVI37409.1	1,489,528..1,490,751	B	flankovan
	AR_0056	Direktno pohranjivanje	NZ_CP026707.1/CP026707.1 NZ_CP027123.1/CP027123.1				
	AR_0056	Direktno pohranjivanje	NZ_CP027123.1/CP027123.1 NZ_CP026707.1/CP026707.1				
	AR_0063	Direktno pohranjivanje	CP026711.1				
	AR_0070	Direktno pohranjivanje	CP027178.1	AVI31830.1	1,805,197..1,806,420	B	flankovan
	AR_0078	Direktno pohranjivanje	NZ_CP026761.1/CP026761.1				
	AR_0083	Direktno pohranjivanje	CP027528.1	AVN24918.1	944,082..945,248	C	flankovan
	AR_0088	Direktno pohranjivanje	NZ_CP027530.1/CP027530.1				
	AR_0101	Direktno pohranjivanje	CP027611.1				
	AR_0102	Direktno pohranjivanje	NZ_CP027607.1/CP027607.1				
	ATCC 17961	krv	CP065432.1	QPP13769.1	3,474,160..3,475,275	A	transpozaza
	ATCC 17978	urin	NZ_CP099855.1/CP099855.1	USY45590.1	1,930,215..1,931,429	B	flankovan
			NZ_CP099856.1/CP099856.1	USY42031.1	1,940,608..1,941,822		
			CP000521.1		Ref		
			CP033108.1	UZK34645.1	1,940,550..1,941,764		
			CP033110.1	UZK38384.1	1,940,548..1,941,762		
			NZ_CP053098.1/CP053098.1				
			NZ_CP049363.1/CP049363.1				
			NZ_CP059041.1/CP059041.1				
			NZ_CP053098.1/CP053098.1				
			NZ_CP074710.1/CP074710.1				
		TnAraC-H0N27_12600	CP113074.1				
		ATCC 17978-mff	NZ_CP012004.1/CP012004.1				
		ATCC 17978-VU	NZ_CP018664.1/CP018664.1				
		substr. PMR-Low	NZ_CP039023.2/CP039023.2				
		substr. PMR-High	NZ_CP039025.2/CP039025.2				
		17978UN	NZ_CP079931.1/CP079931.1	QXZ49850.1	1940625..1941839		
		ATCC 17978-VUB	NZ_CP091335.1/CP091335.1	UMO36571.1	711,730..712,944		

		AB042 lab mutation of ATCC 17978	NZ_CP019034.1/CP019034.1				
	ATCC BAA1605	sputum	CP058625.1	QLG82246.1	376..1,621 4,022,320..4,023,495 4,028,494..4,029,659	pseudo E pseudo	Flankovan pseudo
	ATCC BAA-1790	sputum	CP042841.1	QEE57420.1	2,052,806..2,054,020	B	Flankovan
	ATCC 19606	Urin	NZ_CP059040.1/CP059040.1	QNT84578.1	3,446,331..3,447,446	A	transpozaza
			NZ_CP046654.1/CP046654.1	QGX50140.1	1,854,468..1,855,583		
			NZ_CP045110.1/CP045110.1	QFQ03982.1	551,050..552,165		
			NZ_CP074585.1/CP074585.1				
		ATCC19606-VUB	NZ_CP091334.1/CP091334.1	UMO38739.1	3,021,399..3,022,514		
		CIP 70.34=JCM 6841	NZ_CP058289.1/CP058289.1	QXV70862.1	3,166,544..3,167,659		
		PartI-Abaumannii-RM8376ATCC isolate	NZ_CP064375.1/CP064375.1	UON33098.1	1,666,796..1,667,911	A	
	Ax270	mačka	NZ_CP049240.1/CP049240.1				
	AYE	Pneumonia and urinary tract	CU459141.1	CAM86718.1 CAM86731.1	1,901,138..1,902,469 1,909,745..1,911,076	C C	flankovan flankovan
	AYP-A2	rana	NZ_CP024124.1/CP024124.1				
	B10	sputum	NZ_CP079942.1/CP079942.1				
	B8300	krv	CP021347.1	KMV25700.1	1,114,131..1,115,591	D	transpozaza
	B8342	krv	CP021342.1	KMV08265.1 KMV08135.1	1,933,645..1,935,132 3,573,316..3,574,482	D C	transpozaza flankovan
	B9	SeineRiver	NZ_CP059548.1/CP059548.1				
	BAL062	nepoznato	NZ_LT594095.1/LT594095.1				
	BJAB07104	klinički	NC_021726.1/CP003846.1		-		
	BJAB0715	klinički	NC_021733.1/CP003847.1	AGQ06650.1	2,098,155..2,099,225	F	nepotpun
	BJAB0868	klinički	NC_021729.1/CP003849.1		-		
	BM2333	Krvstream infections	NZ_CP091328.1/CP091328.1				
	C25	cerebrospinalna tečnost	NZ_CP032743.1/CP032743.1				
	C9	draining-matting conveyor	NZ_CP113442.1/CP113442.1				
	CA-17	Direktno pohranjivanje	NZ_CP012587.1/CP012587.1				
	CAb-65	fecal	NZ_CP060994.1/CP060994.1				
	CAM180-1	oralcavity	NZ_CP044356.1/CP044356.1				
	CBA7	sputum	NZ_CP020586.1/CP020586.1				
	CCBH31258	vrh katetera	CP101889.1				
	CFSAN093705	urin	NZ_CP061525.1/CP061525.1				
	CFSAN093706	krv	NZ_CP061523.1/CP061523.1				
	CFSAN093707	sterile body site	NZ_CP061522.1				
	CFSAN093708	rana	NZ_CP061519.1/CP061519.1				

	CFSAN093709	urin	NZ_CP061517.1/CP061517.1				
	CFSAN093710	sterile body site	NZ_CP061514.1/CP061514.1				
	CI300	tracheal aspiray	NZ_CP082952.1/CP082952.1	UBK06240.1	2,058,126..2,059,190	A	flankovan
	Cl415	krv	NZ_CP071763.1/CP071763.1				
	CIAT758	krv	NZ_CP038500.1/CP038500.1				
	CIP70.10	humana koža tkivo	LN865143.1	CRL93204.1 CRL94564.1	491,945..493,009 1965833-1967086	A I	transpozaza klasičan
	Cl107	urin	NZ_CP098521.1/CP098521.1				
	Cl415	krv	NZ_CP071763.1/CP071763.1		-		
	CMC-CR-MDR-Ab4	Bronchoalveolarlavage	NZ_CP016295.1/CP016295.1				
	CMC-CR-MDR-Ab66	Bolnica-aquired infections	NZ_CP016300.1/CP016300.1				
	CMC-MDR-Ab59	sputum	NZ_CP016298.1/CP016298.1				
	CUVET-MIC596	pseći urin	NZ_CP041148.1/CP041148.1				
	D1279779	klinički	NC_020547.2/CP003967.2		-		
	D36	rana	CP012952.1	ALJ87841.1 ALJ87858.1	1,995,421..1,996,665 2,006,581..2,007,825	C C	flankovan flankovan
	D4	rana	NZ_CP048849.1/CP048849.1		-		
	D46	mid stream urin	NZ_CP048131.1/CP048131.1				
	DA33098	Klinički izolat	NZ_CP029569.1/CP029569.1				
	DA33382	Tracheal secretion	CP030106.1	AXB14688.1	865,926..867,170 857,212..858,457	C pseudo	flankovan
	DB002	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087354.1/CP087354.1				
	DB003	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087351.1/CP087351.1				
	DB006	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087348.1/CP087348.1				
	DB007	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087344.1/CP087344.1				
	DB008	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087340.1/CP087340.1				
	DB053	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087335.1/CP087335.1				
	DD520	bolnica, Kina	NZ_CP075321.1/CP075321.1				
	DETAB-C9	sputum	CP104295.1				
	DETAB-E108	Bedside table_P53_BU18	NZ_CP077826.1/CP077826.1				
	DETAB-E155	Infusion stand_P63_BU16	NZ_CP077843.1/CP077843.1				
	DETAB-E159	Locker_P26_BU28	NZ_CP077837.1/CP077837.1				
	DETAB-E227	Direktno pohranjivanje	NZ_CP072526.1/CP072526.1				
	DETAB-E351	Ventilator shelf_P101_BU22	NZ_CP077828.1/CP077828.1				
	DETAB-E51	Bed controller_P22_BU23	NZ_CP077830.1/CP077830.1	UQY02819.1	2,279,265..2,280,521	I	Klasičan
	DETAB-P2	rectal swab	CP047973.1	QMS83345.1 QMS83424.1	3,376,853..3,377,917 3,459,528..3,460,991	A D	transpozaza transpozaza
	DETAB-P24	Nasogastric tube_P44_BU19	NZ_CP077846.1/CP077846.1				

	DETAB-P39	pacijent	NZ_CP073060.1/CP073060.1				
	DETAB-P43	Nasojejunal tube_P50_BU7	NZ_CP077832.1/CP077832.1	UQY10098.1	1,959,551..1,960,807	I	klasičan
	DETAB-P65	Rectal swab_P87_BU24	NZ_CP077835.1/CP077835.1				
	DETAB-P90	Rectal swab	NZ_CP077840.1/CP077840.1				
	DETAB-R21	pacijent	NZ_CP088895.1/CP088895.1				
	DS002	zemljište	CP027704.2				
	DSM30011-VUB	Mikrobiom biljaka	NZ_CP091333.1/CP091333.1	UMO44493.1 UMO44486.1 UMO44503.1	1435067-1436299 1428808-1430040 1,443,430..1,444,902	J Negrupisan J	klasičan flankovan flankovan
	DT-Ab003	stetoskop	NZ_CP050916.1/CP050916.1				
	DT-Ab007	sputum	NZ_CP050914.1/CP050914.1				
	DT-Ab020	sputum	NZ_CP050911.1/CP050911.1				
	DT-Ab022	sputum	NZ_CP050907.1/CP050907.1				
	DT-Ab057	Bronchoalveolar lavage fluid	NZ_CP050904.1/CP050904.1		-		
	DT01139C	klinički uzorak	NZ_CP053218.1/CP053218.1				
	DT0544C	klinički uzorak	CP053215.1	QLI37522.1	3,415,257..3,416,321	A	transpozaza
	DU202	sputum	NZ_CP017152.1/CP017152.1		-		
	E-011922	paper mill kaolin	NZ_CP059542.1/CP059542.1				
	E-072658	paper pulp mill	NZ_CP061705.1/CP061705.1				
	E47	Room 7	NZ_CP042556.1/CP042556.1				
	EAB1	soj iz laboratorije	NZ_CP112859.1/CP112859.1				
	EAB2	soj iz laboratorije	NZ_CP112860.1/CP112860.1				
	LEV1449/17Ec	Uvezena hrana i klinički uzorak	NZ_CP038262.1/CP038262.1				
	39741	Iuvezena hrana i klinički uzorci	NZ_CP038258.1/CP038258.1				
	Ex003	Voda (artesian well)	NZ_CP049314.1/CP049314.1				
	F-1629	Direktno pohranjivanje	CP099969.1				
	F46	klinički	NZ_CP096575.1/CP096575.1				
	FDAARGOS_1036	Direktno pohranjivanje	CP066016.1	QQB67876.1 QQB67884.1	894,409..895,584 900,586..901,752 911,644..912,889	E C pseudo	flankovan klasičan
	FDAARGOS_1359	Direktno pohranjivanje	NZ_CP069851.1/CP069851.1				
	FDAARGOS_1360	Direktno pohranjivanje	NZ_CP069840.1/CP069840.1				
	FDAARGOS_533	sputum	CP033768.1	AYY54866.1	3,615,966..3,617,429	D	transpozaza
	FDAARGOS_540	Direktno pohranjivanje	CP033754.1	AYX87484.1 AYX87491.1	2,586,520..2,587,638 2,595,642..2,596,883	D C	nepotpun nepotpun
	G20AB007	krv	NZ_CP066237.1/CP066237.1				
	G20AB009	krv	NZ_CP066235.1/CP066235.1				
	G20AB010	krv	NZ_CP066232.1/CP066232.1				

	G20AB011	krv	NZ_CP066229.1/CP066229.1				
	HKU3	bolnica	NZ_CP084733.1/CP084733.1				
	HKU4	bolnica	NZ_CP084730.1/CP084730.1				
	HKU5	bolnica	NZ_CP084727.1/CP084727.1				
	HKU6	bolnica	NZ_CP084724.1/CP084724.1				
	HKU7	bolnica	NZ_CP084721.1/CP084721.1				
	HRAB-85	sputum	NZ_CP018143.1/CP018143.1				
	HWBA8	sputum	NZ_CP020597.1/CP020597.1				
	IOMTU433	Respiratorni trakt	NZ_AP014649.1/AP014649.1				
	J9	Klinički uzorak	NZ_CP041587.1/CP041587.1				
	JBA13	sputum	NZ_CP020584.1/CP020584.1				
	K09-14	zemljište	NZ_CP043953.1/CP043953.1		-		
	KAB01	Bronhijalni	NZ_CP017642.1/CP017642.1				
	KAB02	Bronhijalni	NZ_CP017644.1/CP017644.1				
	KAB03	sputum	NZ_CP017646.1/CP017646.1				
	KAB04	sputum	NZ_CP017648.1/CP017648.1				
	KAB05	krv	NZ_CP017650.1/CP017650.1				
	KAB06	rana	NZ_CP017652.1/CP017652.1				
	KAB07	sputum	NZ_CP017654.1/CP017654.1				
	KAB08	rana	NZ_CP017656.1/CP017656.1				
	KBN10P02143	gnoj	NZ_CP013924.1/CP013924.1		-		
	KBN10P04593	krv	NZ_CP099989.1/CP099989.1				
	KBN10P05679	Direktno pohranjivanje	NZ_CP100305.1/CP100305.1				
	KSK1	Respiratorni specimen	NZ_CP072122.1/CP072122.1				
	KSK10	gnoj	NZ_CP072280.1/CP072280.1				
	KSK11	Respiratorni	CP072285.1/CP072285.1				
	KSK18	respiratorni	NZ_CP072290.1/CP072290.1				
	KSK19	respiratorni	NZ_CP072295.1/CP072295.1				
	KSK2	respiratorni	NZ_CP072398.1/CP072398.1				
	KSK20	respiratorni	NZ_CP072300.1/CP072300.1				
	KSK6	respiratorni	NZ_CP072270.1/CP072270.1		-		
	KSK7	respiratorni	NZ_CP072275.1/CP072275.1				
	KSK Sensitive	respiratorni	CP072305.1	QTK75658.1	3,335,988..3,337,052	A	transpozaza
	LAC-4	nepoznato	NZ_CP007712.1/CP007712.1				
	LAC4	nepoznato	NZ_CP018677.1/CP018677.1				
	LHC22-2	pileći feces	CP084297.1				
	LMG994	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087331.1/CP087331.1	WP_140947982.1	2,070,332..2,071,555 3,654,254..3,655,369	B A	Flankovan transpozaza

				WP_000585016.1 WP_031986077.1	2,836,913..2,838,013	negrupisan	transpozaza
	LUH 6011	nepoznato	NZ_CP031383.1/CP031383.1				
	M164-3	*Manis javanica*	NZ_CP058729.1/CP058729.1				
	M175-3	*Manis javanica*	NZ_CP059474.1/CP059474.1				
	MDR-CQ	nepoznato	NZ_CP019114.1/CP019114.1				
	MDR-TJ	Bolnički uzorak	NC_017847.1/CP003500.1		-		
	MDR-UNC	right leg muscle, right leg fascia, central venous catheter, dialysis catheter, surface of the left leg ulcer, and left lower leg	NZ_CP031444.1/CP031444.1				
	MDR-ZJ06	(klinički) nepoznato	NC_017171.2/CP001937.2		-		
	MRSN 56	kuk	NZ_CP080452.1/CP080452.1 CP090606.1				
	MRSN 58	Kuk	NZ_CP090607.1/CP090607.1				
	MRSN15313	cerebrospinalna tečnost	CP033869.1	AYY89232.1 AYY89244.1	2,210,730..2,211,902 2,218,293..2,219,465	F F	Klasičan klasičan
	MRSN57	kuk	NZ_CP091172.1/CP091172.1				
	MS14413	Urin (kateter)	NZ_CP054302.1/CP054302.1				
	N13-03449	Patients from Canadian acute care bolnicas	NZ_CP043417.1/CP043417.1				
	NCCP 15989	sputum	CP099784.1				
	NCCP 15992	Direktno pohranjivanje	CP099786.1				
	NCCP 15995	Direktno pohranjivanje	CP099788.1				
	NCCP 15996	urin	CP099790.1				
	NCCP 16006	Direktno pohranjivanje	CP099793.1				
	NCCP 16007	urin	NZ_CP091465.1/CP091465.1				
	NCCP 16011	Direktno pohranjivanje	CP099795.1				
	NCGM 237	Respiratorni, krv, urin	NZ_AP013357.1/AP013357.1		-		
	NCIMB 8209	aerobic microbial decomposition of whole and defoliated guayule (retting)	NZ_CP028138.1/CP028138.1				
	NCTC13421	Direktno pohranjivanje	LS483472.1	SQI54944.1 SQI54905.1	1,942,021..1,943,187 1,933,632..1,934,807	C E	flankovan flankovan
	NCTC7364	nepoznato	LT605059.1	SCD16021.1 SCD16029.1	2,063,045..2,064,208 2,069,398..2,070,561	B B	klasičan flankovan

				SCD14470.1	419,790..421,253	D	transpozaza
	NIPH17_0019	krv	NZ_AP024415.1/AP024415.1				
	Nord4-2	Direktno pohranjivanje	NZ_CP091596.1/CP091596.1				
	NY13623	sputum	NZ_CP106988.1/CP106988.1	UYF87871.1	2,027,025..2,028,239	B	flankovan
	NY5301	ascites	NZ_CP094283.1/CP094283.1				
	OC043	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087321.1/CP087321.1				
	OC059	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087312.1/CP087312.1				
	OC061	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087300.1/CP087300.1				
	OC064	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087317.1/CP087317.1	WP_031966312.1	2,178,662..2,179,726	A	flankovan
	OC068	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087309.1/CP087309.1				
	OC070	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087298.1/CP087298.1				
	OC073	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087325.1/CP087325.1	WP_004737971.1	3,355,470..3,356,957	D	transpozaza
	OC074	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087328.1/CP087328.1	WP_258580194.1	1,906,934..1,908,100	C	flankovan
	OC081	Direktno pohranjivanje	NZ_CP087304.1/CP087304.1	WP_000609264.1	1,908,368..1,909,612 1,917,220..1,917,371	C pseudo	flankovan
	OCU_Ac16a	Tracheal aspirate from a bolnicaized patient	AP023077.1	WP_072689817.1	1,863,263..1,864,738	D	flankovan
	OCU Ac18	Venska krv	NZ_AP024802.1/AP024802.1				
	ORAB01	bodily fluid	NZ_CP015483.1/CP015483.1				
	P7774	gnoj	NZ_CP040260.1/CP040260.1				
	PB364	Klinički izolat	NZ_CP040425.1/CP040425.1				
	PG20180064	nepoznato	NZ_CP014538.1/CP014538.1				
	PM1912235	gnoj	NZ_CP050410.1/CP050410.1				
	PM192696	sputum	NZ_CP050412.1/CP050412.1				
	PM193665	Gnoj	NZ_CP050415.1/CP050415.1				
	PM194188	Bronchoalveolarlavage	NZ_CP050425.1/CP050425.1				
	PM194229	Bronchoalveolarlavage	NZ_CP050432.1/CP050432.1				
	R2090	tkivo	NZ_LN868200.1/LN868200.1				

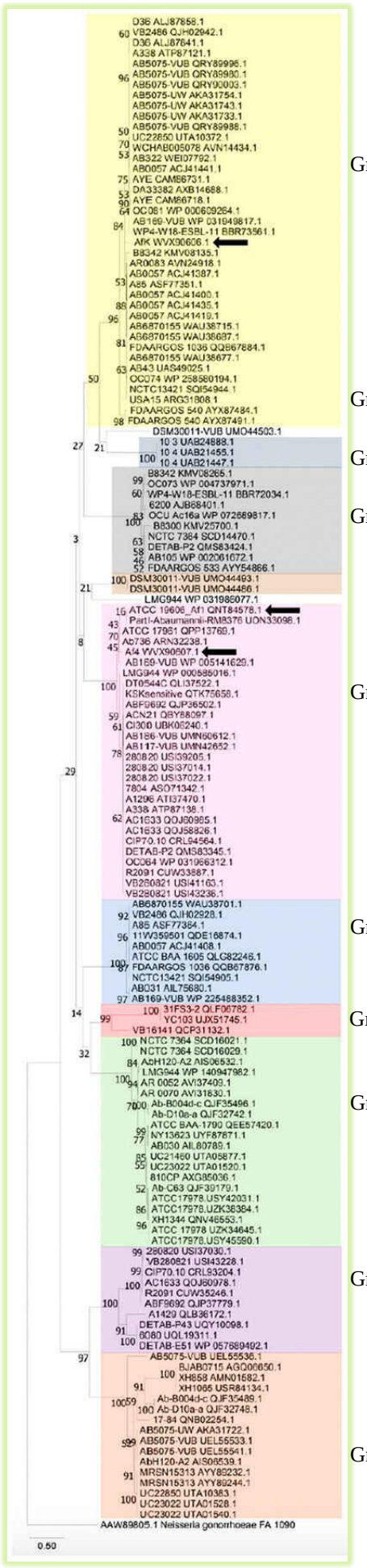
	R2091	tkivo	NZ_LN997846.1/LN997846.1	CUW33887.1 CUW35246.1	491,918..492,982 1,965,798..1,967,051	A I	transpozaza klasičan
	RBH2	Direktno pohranjivanje	CP110462.1				
	RCH52	Direktno pohranjivanje	NZ_CP085788.1/CP085788.1				
	Res13-Abat-PEA21-P4-01-A	Pigswab	NZ_CP062919.1/CP062919.1				
	S1, AB1A2	Bronchoalveolarlavage	NZ_CP026943.1/CP026943.1				
	SAA14	krv	NZ_CP020579.1/CP020579.1				
	SD	Klinički izolat	CP064292.1				
	SHOU-Ab01	*Andriasdavidianus*	NZ_CP087594.1/CP087594.1				
	SMC_Paed_Ab_BL01	krv, centralna linija	NZ_CP025266.1/CP025266.1				
	SP304	sputum	NZ_CP040080.1/CP040080.1				
	SSA12	krv	NZ_CP020578.1/CP020578.1				
	SSA6	Endotracheal aspirate	NZ_CP020591.1/CP020591.1				
	SSMA17	tečnost bronhijalnog ispiranja	NZ_CP020581.1/CP020581.1				
	TCDC-AB0715	Direktno pohranjivanje	CP002522.2				
	TG22182	trachealaspirate	NZ_CP039993.1/CP039993.1				
	TG22627	trachealaspirate	NZ_CP039520.1/CP039520.1				
	TG22653	bronchoalveolarlavage	NZ_CP039518.1/CP039518.1				
	TG29392	krv	NZ_CP039930.1/CP039930.1				
	TG31302	trachealaspirate	NZ_CP039343.1/CP039343.1				
	TG31986	trachealaspirate	NZ_CP039341.1/CP039341.1				
	TP1	Klinički uzorak	NZ_CP056784.2/CP056784.2				
	TP2	Klinički uzorak	NZ_CP060011.1/CP060011.1				
	TP3	Klinički uzorak	NZ_CP060013.1/CP060013.1				
	TYTH-1	bakteremija	NC_018706.1/CP003856.1				
	UC20804	Peritonealni apsces	NZ_CP076807.1/CP076807.1				
	UC21460	tkivo	NZ_CP076814.1/CP076814.1	UTA05877.1	1,824,561..1,825,775	B	flankovan
	UC22850	Vrh katetera	NZ_CP076821.1/CP076821.1	UTA10383.1 UTA10372.1	2,501,931..2,503,103 2,494,511..2,495,755	F C	klasičan flankovan
	UC23022	krv	NZ_CP076812.1/CP076812.1	UTA01520.1 UTA01528.1 UTA01540.1	1111264..1112478 1117290..1118462 1124853..1126025	B F F	flankovan klasičan klasičan
	UC24137	sacrum ulcer	NZ_CP076817.1/CP076817.1				
	UC24371	endotracheal aspirate	NZ_CP076804.1/CP076804.1				
	UC25604	tečnost peritonealna	NZ_CP076801.1/CP076801.1				
	USA15	sputum	CP020595.1	ARG31808.1	2,251,549..2,252,715	C	flankovan
	USA2	urin	NZ_CP020592.1/CP020592.1				
	VB11737	krv	NZ_CP050400.1/CP050400.1				

	VB1190	krv	NZ_CP040047.1/CP040047.1				
	VB16141	krv	CP040050.1	QCP31132.1	1,853,393..1,854,553	G	Flankovan pseodo
	VB2107	sputum	NZ_CP051474.1/CP051474.1				
	VB2139	sputum	NZ_CP050526.1/CP050526.1				
	VB2181	sputum	NZ_CP050401.1/CP050401.1				
	VB2200	sputum	NZ_CP050421.1/CP050421.1				
	VB23193	krv	CP035672.1		-		
	VB2486	sputum	CP050403.1	QJH02942.1 QJH02928.1	2,036,912..2,038,156 2,027,603..2,028,778	C E	flankovan flankovan
	VB280821	krv	NZ_CP098795.1/CP098795.1	USI41163.1 USI43236.1 USI43228.1	2,317,985..2,319,049 652,274..653,338 644,586..645,464	A A I	transpozaza flankovan transpozaza
	VB31459	krv	CP035930.1				
	VB33071	krv	CP040084.1/CP040084.1				
	VB35179	krv	CP040053.1				
	VB35435	krv	CP040056.1				
	VB35575	krv	NZ_CP040087.1/CP040087.1				
	VB473	sputum	NZ_CP050388.1/CP050388.1				
	VB7036	krv	NZ_CP050523.1/CP050523.1				
	VB723	krv	NZ_CP050390.1/CP050390.1				
	VB82	krv	NZ_CP050385.1/CP050385.1				
	VB958	krv	CP040040.1				
	WCHAB005078	Direktno pohranjivanje	CP027246.2	AVN14434.1	1,910,050..1,911,294	C	flankovan
	WCHAB005133	Direktno pohranjivanje	NZ_CP026750.2/CP026750.2				
	WKA02	sputum	NZ_CP020598.1/CP020598.1				
	WP4-W18-ESBL-11	otpadna voda treatment plant effluent	AP022077.1	BBR73561.1 BBR72034.1	2,006,965..2,008,209 390,603..392,090	C D	flankovan transpozaza
	XDR-BJ83	Pacijent, muško	NZ_CP018421.1/CP018421.1				
	XH1056	sputum	NZ_CP045645.1/CP045645.1	USR84134.1	2,124,779..2,125,849	F	Klasičan nepotpun
	XH1344	YunsongYu Laboratorija	CP061541.1	QNV46553.1	1,982,136..1,983,365	B	Flankovan (pseudo)
	XH1935	pacijent	NZ_CP088894.1/CP088894.1				
	XH386	Donji respiratorni trakt	NZ_CP010779.1/CP010779.1 NZ_CP021326.1/CP021326.1				
	XH731	sputum	NZ_CP019217.1/CP019217.1 NZ_CP021321.1/CP021321.1				
	XH856	Drenažna tečnost	NZ_CP014541.1/CP014541.1				

	XH857	sputum	NZ_CP014540.1/CP014540.1				
	XH858	sputum	NZ_CP014528.1/CP014528.1	AMN01582.1	2,163,381..2,164,451	F	Klasičan (nepotpun)
	XH859	rana	NZ_CP014539.1/CP014539.1				
	XH860	Nepoznato (klinika)	NZ_CP014538.1/CP014538.1				
	XH906	krv	NZ_CP023140.1/CP023140.1				
	XL380	Rizosfera krastavca	NZ_CP046536.1/CP0oc46536.1				
	XYAB2018	krv	NZ_CP060285.1/CP060285.1				
	YC103	stolica	NZ_CP054560.1/CP054560.1	UJX51745.1	1,932,409..1,932,906	G (nepotpun)	klasičan
	YU-R612	sputum	NZ_CP014215.1/CP014215.1				
	YZM-0314	bakteremija	NZ_CP104908.1/CP104908.1				
	YZM-0406	bakteremija	NZ_CP104912.1/CP104912.1				
	Z198	cerebrospinalna tečnost	NZ_CP109836.1/CP109836.1				
	ZW85-1	feces	NC_023028.1/CP006768.1				
	04117201	Klinički izolat	CP079943.1 CP079944.1				
	2022CK-00843	Direktno pohranjivanje	CP117759.1				
	RAB9	Klinički izolat	NZ_CP121557.1/CP121557.1				
	AB233-VUB	Klinički izolat	NZ_CP091336.1/CP091336.1				
	2022CK-00063	sputum	CP115632.1				
	RAB94	Klinički izolat	NZ_CP121563.1/CP121563.1				
	RAB55	Klinički izolat	NZ_CP121577.1/CP121577.1				
	A9844	Klinički izolat	CP102580.1				
	96	bronhijalna sekrecija	NZ_CP121345.1/CP121345.1				
	2022CK-00783	urin	CP117728.1				
	2022CK-00251	sputum	CP115641.1				
	2022CK-00211	sputum	CP115637.1				
	2022CK-00371	koža	CP115645.1				
	AB1343	sputum	NZ_CP090182.1/CP090182.1				
	EGA65	periferna krv	NZ_CP125223.1/CP125223.1				
	EGA10	rana kuka	NZ_CP125225.1/CP125225.1				
	RAB73	Klinički izolat	NZ_CP121567.1/CP121567.1				
	2022CK-00241	sputum	CP115639.1				
	OCU-Ac19	Klinički izolat	AP025531.1				
	2022CK-00185	Direktno pohranjivanje	CP115626.1				
	HAB11	Klinički izolat	NZ_CP121632.1/CP121632.1				
	2022CK-00480	sputum	CP115621.1				

	2022CK-00340	rana/apsces	CP115623.1				
	RAB14	Klinički izolat	NZ_CP121583.1/CP121583.1				
	RAB73	Klinički izolat	NZ_CP121567.1/CP121567.1				
	WU 164	urin	NZ_CP033876.1/CP033876.1				
	X4-65	nepoznato	NZ_CP064194.1/CP064194.1				
	X4-300	nepoznato	CP064202.1				
	X4-136	nepoznato	CP074698.1				
	X4-107	nepoznato	CP074695.1				
	X4-201	krv	CP076736.1				
	X4-584	urin	CP076739.1				
	X4-705	pleural effusion	CP076742.1				
	MAB17	Klinički izolat	NZ_CP121595.1/CP121595.1				
	Canada BC-5	nosocomial spread of war-related MDR-ABC in a Canadian civilian bolnica with origin from soldier evacuated via Landstuhl Regional Medical Center	NZ_CP116680.1/CP116680.1				
	WB4	Feedlot Water bowl	CP123854.1				
	2022CK-00784	rana/apsces	CP117764.1				
	Ab4294	Direktno pohranjivanje	CP123993.1				
	WP8-W18-ESBL-11	otpadna voda tretman biljnim tečnostima	NZ_AP022238.1/AP022238.1				
	LRT	otpadna voda	NZ_CP121375.1/CP121375.1				
	LRB	otpadna voda	NZ_CP121370.1/CP121370.1				
	Ab_8_4	otpadna voda	NZ_CP121365.1/CP121365.1				
	RAB97	Klinički izolat	NZ_CP121560.1/CP121560.1				
	RAB53	Klinički izolat	NZ_CP121579.1/CP121579.1				
	RAB11	Klinički izolat	NZ_CP121586.1/CP121586.1				
	JAB270	Klinički izolat	NZ_CP121629.1/CP121629.1				
	JAB144	Klinički izolat	NZ_CP121625.1/CP121625.1				
	JAB117	Klinički izolat	NZ_CP121612.1/CP121612.1				
	JAB186	Klinički izolat	NZ_CP121609.1/CP121609.1				
	JAB77	Klinički izolat	NZ_CP121598.1/CP121598.1				
	MAB9	Klinički izolat	NZ_CP121588.1/CP121588.1				

Na osnovu aminokiselinskih sekvenci Zot proteina konstruisano je filogenetsko stablo *A. baumannii* specifičnih filamentoznih faga (Slika 12). Koristeći sekvence aminokiselina Zot proteina, identifikovani filamentozni fagi su podeljeni u 10 grupa, označeni slovima od A do J. Grupe A, B i C su dominantne, a dva soja (DSM30011-VUB i LMG944) sadrže gene koji ne pripadaju ni jednoj određenoj grupi.


Grupa C
Grupa H
Grupa D
Grupa J
Grupa A
Grupa E
Grupa G
Grupa B
Grupa I
Grupa F
AAW89805.1 Neisseria gonorrhoeae FA 1090
0.50

Slika 12. Filogenetsko stablo *A. baumannii* specifičnih faga. Grupe A-J zasnovane na aminokiselinskim sekvencama Zot proteina. A, B, C grupe su najzastupljenije, dva soja (DSM30011-VUB i LMG944) sadrže gene koji ne pripadaju ni jednoj od specifičnih grupa, a Zot faga Af1, AfK i Af4 su naznačeni crnom strelicom. Evoluciona istorija je izvedena korišćenjem metode maksimalne verovatnoće i modela zasnovanog na JTT matrici (Jones i sar., 1992). Prikazano je drvo sa najvećim log verovatnoće (-20,514.03). Procenat grana u kojima su povezani taksoni grupisani zajedno je prikazan ispred njih. Početno stablo(a) za heurističku pretragu dobijeno je automatski primenom algoritama Neighbor-Join i BioNJ na matricu procenjenih rastojanja u paru ustanovljenim korišćenjem JTT modela, a zatim odabirom topologije sa superiornom vrednošću log verovatnoće. Stablo je nacrtano u razmeri, sa granama dužine izmerene brojem zamena ak po mestu. Ova analiza je uključivala 142 aminokiselinske sekvence. U konačnom skupu podataka bilo je ukupno 672 pozicije. Evolucione analize su sprovedene u MEGA X programu (Kumar i sar., 2018).

5.2.2. *In vitro* analiza sojeva iz kolekcije

Koristeći specifične prajmere za grupe, u 15 sojeva otkriveni su Af profagi u genomima iz kolekcije kultura, odnosno kod 23,8% sojeva (Tabela 9). Kao i u slučaju *in silico* analiza i kod ovih sojeva su najčšći bili profagi iz grupa A, B i C.

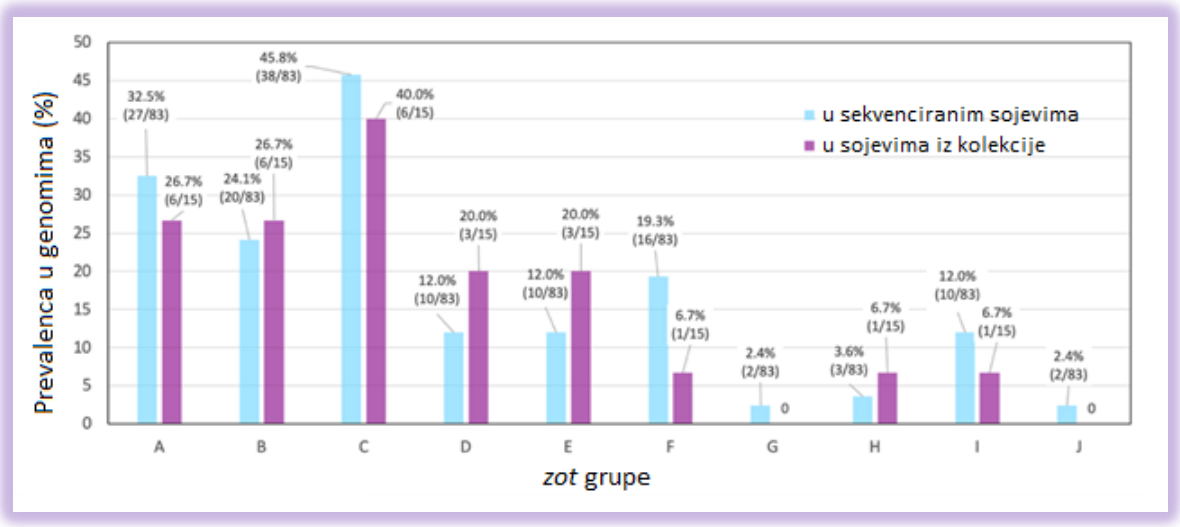
Tabela 9. Sojevi *A. baumannii* iz kolekcije PK Lab-a sa grupama Af profaga koje su detektovane PCR metodom

Naziv soja	Poreklo	Detektovana Zot grupa
ATCC 19606	Referentni soj	A
ATCC BAA 747	Referentni soj	D, I
NCTC 13423	Referentni soj	-*
Aba-8781	Klinički uzorak- infekcija rane	-
Aba-8833	Klinički uzorak- infekcija rane	C, D
Aba-34963	Klinički uzorak- infekcija rane	C
Aba-40100	Klinički uzorak- infekcija rane	B
Aba-2572	Klinički uzorak- infekcija rane	B, C
Aba-2793	Klinički uzorak- infekcija rane	-
Aba-4156	Klinički uzorak- infekcija rane	-
Aba-4727	Klinički uzorak- infekcija rane	E, F
Aba-4779	Klinički uzorak- infekcija rane	
Aba-4803	Klinički uzorak- infekcija rane	A, B
Aba-4804	Klinički uzorak- infekcija rane	A
Aba-4890	Klinički uzorak- infekcija rane	-
Aba-4914	Klinički uzorak- infekcija rane	C
Aba-5055	Klinički uzorak- infekcija rane	C, E
Aba-5074	Klinički uzorak- infekcija rane	-
Aba-5081	Klinički uzorak- infekcija rane	-
Aba-5372	Klinički uzorak- infekcija rane	-
Aba-6673	Klinički uzorak- infekcija rane	-
Aba-7860	Klinički uzorak- infekcija rane	A, B
Aba-8255	Klinički uzorak- infekcija rane	-
Aba-B-Fen	Površinska voda	-
Aba-DP-Fen	Površinska voda	D, H
Aba-DN-Ace	Površinska voda	-
Aba-DZ-Ace	Površinska voda	-
Aba-M-Ace	Površinska voda	-
Aba-S-Ace	Površinska voda	E

Aba-DTD-Tyr	Površinska voda	-
Aba-S-Tyr	Površinska voda	-
Aba-BJ1	Površinska voda	-
Aba- M.Bar	Površinska voda	-
Aba- G.Pod	Površinska voda	-
Aba- Sakajtaš	Površinska voda	-
Aba- K	Površinska voda	C
Aba- Karađorđevo	Površinska voda	-
Aba- Tam	Površinska voda	-
Aba- Sava	Površinska voda	-
Aba- Bosut	Površinska voda	-
Aba-Vrbas BL	Površinska voda	-
Aba-Ar	Površinska voda	-
Aba-Jegr	Površinska voda	-
Aba-Odž	Otpadna voda	-
Aba-Mr.Tisa	Površinska voda	-
Aba- Tem	Površinska voda	-
Aba- Sirig	Površinska voda	-
Aba- Bruje	Površinska voda	-
Aba- Beg	Površinska voda	-
Aba- N.Miloševo	Površinska voda	-
Aba- Karaš	Površinska voda	-
Aba- DI	Površinska voda	-
Aba- DII	Površinska voda	-
Aba- DIII	Površinska voda	-
Aba- KanJ	Površinska voda	-
Aba- SMil	Otpadna voda	-
Aba- Zas	Površinska voda	-
Aba- Dub	Površinska voda	-
Aba- Vlas	Površinska voda	-
Aba- KanBr	Površinska voda	-
Aba- KanHip	Površinska voda	-
Aba- Jama	Otpadna voda	-
Aba- Rib	Površinska voda	-
Aba- Ša	Površinska voda	-

[*]- nije detektovana ni jedna grupa profaga

Ako se uporede dobijene učestalosti *zot* gena kod sojeva sa sekvenciranim genomom i sojeva iz kolekcije kultura (slika 13), može se videti da su ove učestalosti nešto veće u sojevima iz kolekcije, dok je učestalost svake pojedinačne grupe slična. *Zot* geni grupa C, D, E i H češće su detektovani u kolekciji u odnosu na sekvencirane genome, dok je grupa F češće detektovana kod sekvenciranih sojeva.



Slika 13. Prevalenca specifičnih grupa zot gena (A-J) utvrđena *in silico* u sekvenciranim genomima i PCR metodom u sojevima iz kolekcije, izraženo u procentima.

5.3. IZOLACIJA Af FILAMENTOZNIH FAGA

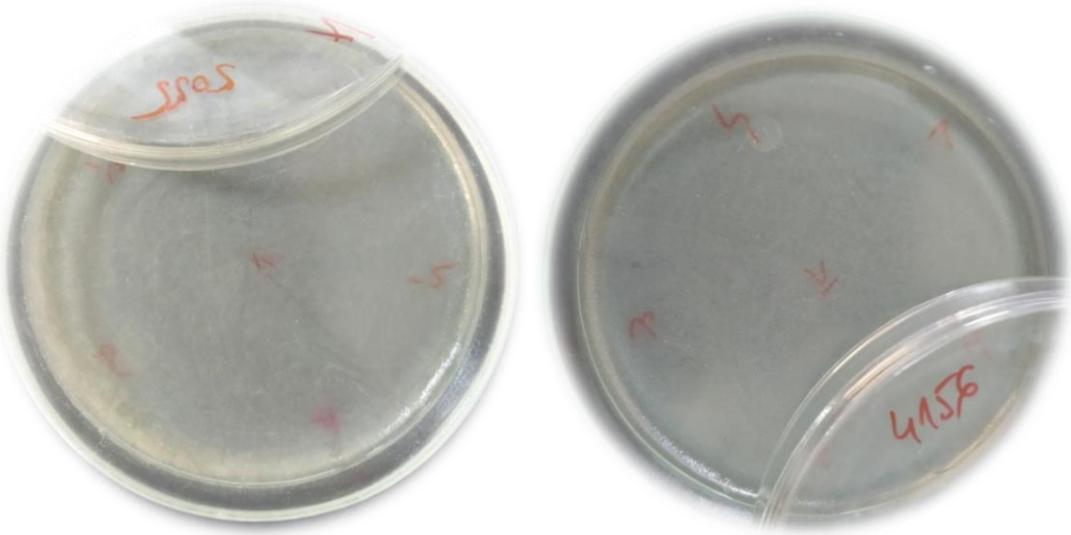
Bakteriofagi su izolovani iz genoma sledećih sojeva *A. baumannii*: referentnog ATCC 19606, soja iz kliničkog uzorka Aba-4804 i novoizolovanog soja iz prirodne sredine Aba-K, a označeni su kao Af1, Af4 i AfK, redom. Fagi Af1 i Af4 su pripadali grupi A, a fag AfK grupi C. Nakon umnožavanja i prečišćavanja, formirani prsten faga u cezijum hloridu (Slika 14) je dijaliziran u SM puferu i dobijena suspenzija je korišćena za sve naredne analize. Odabrani su fagi ovih sojeva na osnovu PCR analize kojom je ustanovljeno da pripadaju najbrojnijim grupama faga formiranim na osnovu Zot amino-kiselinskih sekvenci.



Slika 14. Prsten faga formiran nakon tretmana PEG8000 i prečišćavanja ultracentrifugiranjem u ekvilibrijumu CsCl.

5.4. BROJNOST Af FAGA U SUSPENZIJI

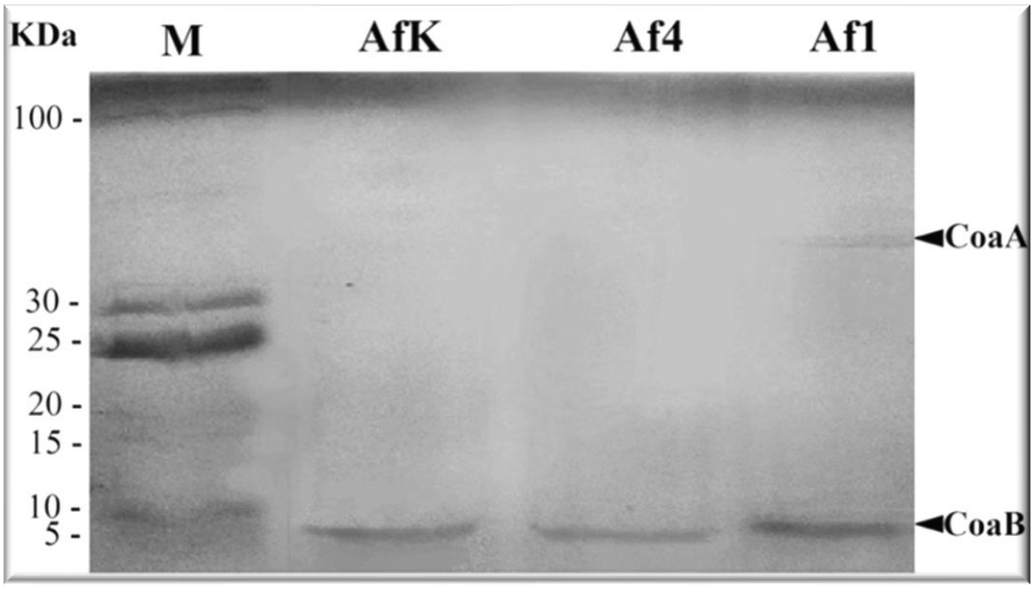
Sve tri metode su pokazale da fagi ne liziraju ćelije domaćina, odnosno ne formiraju plake, čak ni u prisustvu subinhibitornih koncentracija antibiotika. Na slici 15 prikazano je odsustvo plaka na dva soja, gde se uočava bakterijski rast u formi tepiha bez lize bakterijskih ćelija ili zone prosvetljenja, a takav rezultat je bio na svim sojevima.



Slika 15. Bakterijski rast sojeva Aba-5055 i Aba-4156 bez lize ili zone prosvetljenja

5.5. PROTEINSKI PROFIL FAGA

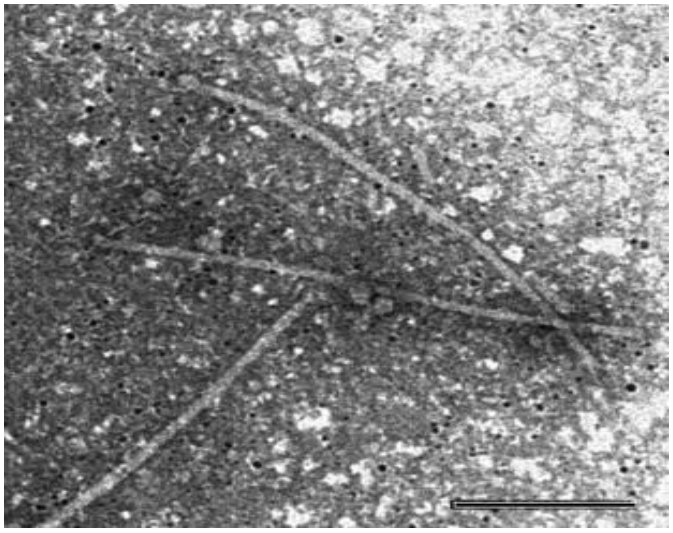
Karakterizacija proteina Af filamentoznih faga primenom SDS-PAGE metode otkrila je prisustvo glavnog proteina kapsida (CoaB proteina) kao dominantne trake. Ovo je potvrđeno za sva tri analizirana faga: Af1, Af4 i AfK (Slika 16). Veličina traka dobijenih za CoaB protein kod sva tri faga je slična i odgovara očekivanoj veličini CoaB proteina, kako je predviđeno *in silico* analizom (približno 4,5 kDa). Dodatna proteinska traka kod faga Af1 odgovara adhezionom proteinu omotača (CoaA), sa približnom molekulskom težinom od 49 kDa. *In silico* analiza je predvidela molekulsku masu od 48,9 kDa za ovaj protein. Kod druga dva faga se ova traka ne uočava, najverovatnije zbog niže koncentracije proteina u gelu.



Slika 16. Proteinski profil Af faga. M – marker LR Unstained protein ladder; u okviru Af1 kolone uočavaju se dve trake proteina: CoaB(oko 4.5 kDa) i CoaA protein (oko 49 kDa), u AfK i Af4 kolonama je detektovan samo CoaB.

5.6. MORFOLOGIJA Af FAGA

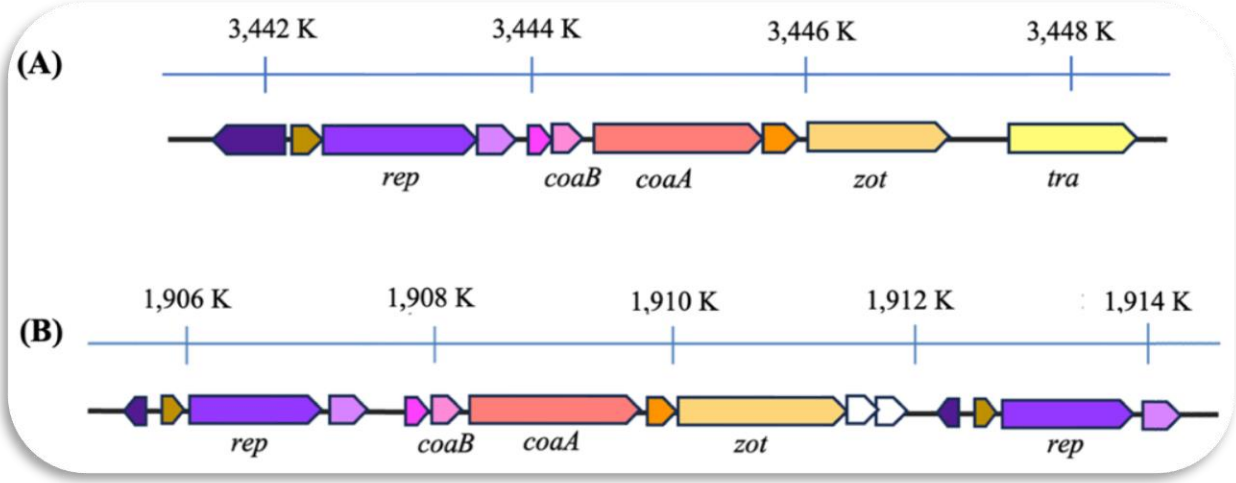
TEM metodom je potvrđeno da je Af1 potpun profag koji proizvodi filamentozne virione. Virioni su približno 770 nm dužine (Slika 17). Neke varijacije, sa kraćim ili dužim virionima, primećene su u preparatu.



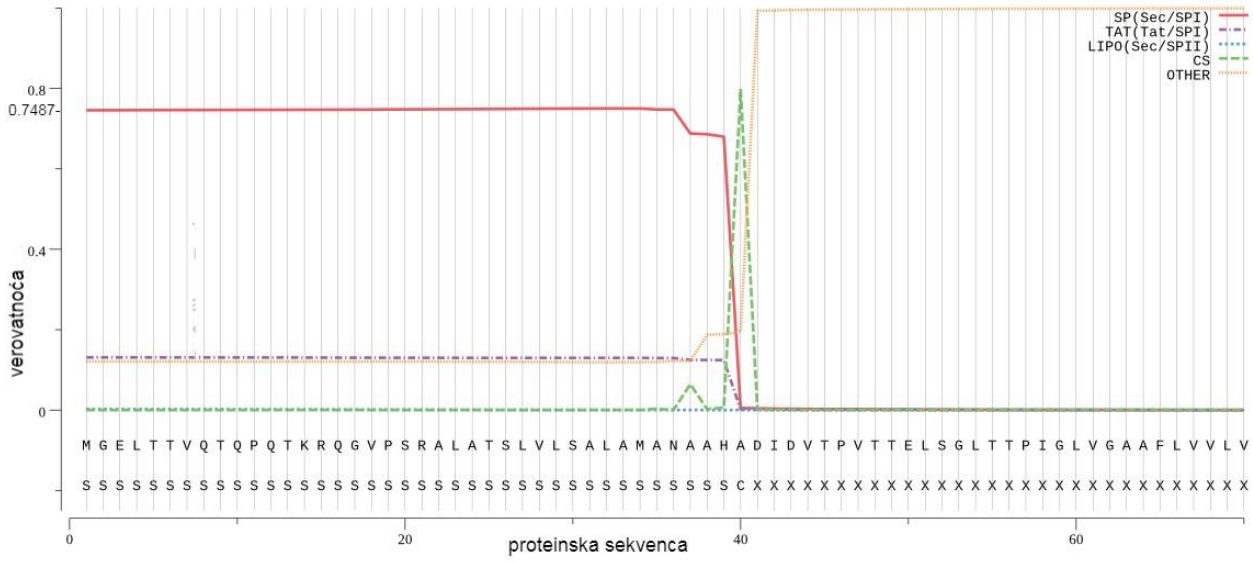
Slika 17. Virioni Af1 faga dokumentovani transmisionim elektronskim mikroskopom kontrastiran sa 1% uranil acetatom; dužina bar linije je 250 nm

5.7. KARAKTERIZACIJA GENOMA FAGA

Analiza genoma Af faga pokazala je da profagi imaju ključne gene specifične za viruse koji pripadaju porodici *Inoviridae* (slika 19). Modularni raspored gena sličan je onom kod drugih priznatih vrsta iz porodice *Inoviridae*, a to je prikazano na slici 18. Na jednom kraju, prisutni su geni odgovorni za integraciju virusne DNK (*tra*) u genom domaćina i geni za morfogenezu viriona (*zot*), nadovezani na gene odgovorni za strukturne proteine (*coaB* i *coaA*). Na osnovu poređenja genoma Af1 profaga sa genomima bakterija koje imaju i nemaju integrisani ovaj fag, utvrđeno je da su najverovatnije koordinate Af1 faga u soju ATCC 19606 (pristupni br. NZ_CP059040.1/CP059040.1) 3.441.704–3.448.908, tako da je veličina genoma 7201nt. Genom faga Af1 (slika 19.A.) sadrži transpozazu IS110 kao transpozazu tipa DEDD ($E=7{,}70\times10^{-68}$) i ključne gene specifične za *Inoviridae* - gene za Zot, sa konzervisanim domenom P-petlje-NTP-aze ($E=2{,}01\times10^{-29}$), adhezionim proteinom (CoaA), koji sadrži konzervisanu sekvencu Neisseria_TspB proteina (protein B koji stimuliše T i B ćelije; $E=1{,}18\times10^{-3}$), a glavni protein omotača sadrži 82 aminokiseline, od kojih se 40 iseca kao signalni peptid (predviđeno mesto zasecanja između 40. i 41. amino-kiseline sa verovatnoćom 0,7487 (slika 19). Preostale 42 aminokiseline sa konzerviranom CoaB sekvencom ($E=4{,}36\times10^{-8}$) predstavljaju strukturni protein sa molekulskom težinom 4,45 kDa. Na kraju genoma nalazi se protein za replikaciju, koji sadrži DNK relaksazaNicK domen, odgovoran za rekombinaciju, reparaciju i replikaciju ($E=2{,}31\times10^{-53}$).

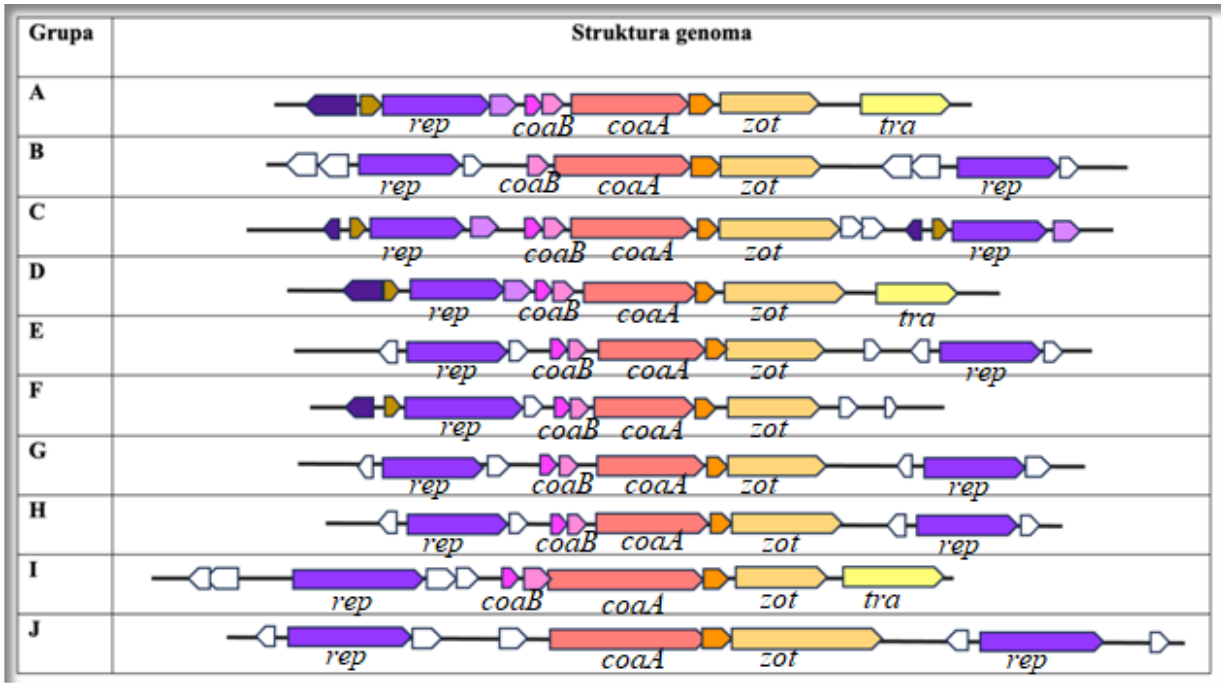


Slika 18. Organizacija genoma Af faga: **A)** Af1 profag u soju ATCC 19606 (grupa A) sa transpozazom i **(B)** profag u soju WCHAB005078 (Pristupni br. CP027246.2; grupa C) sa bočnim flankovanim krajevima replikativnog modula; *tra* – transpozaza; *zot* – gen za Zonula occludens toksin; *CoaA* – gen za adhezioni protein kapsida; *CoaB* – gen za glavni protein kapsida; *rep* – gen za protein koji inicijacira replikaciju; isti geni u dva prikazana genoma su iste boje



Slika 19. Mesto uklanjanja signalne sekvence proteina CoaB koje nisu deo viriona ustanovljeno SignalIP-5.0 alatom. Predviđeno mesto zasecanja je nakon 40. aminokiseline sa verovatnoćom 0,7487.

Kada se uporede genomi faga iz različitih grupa (slika 20), uočava se da grupe A, D i I poseduju transpozazu, međutim, uočeno je u pojedinim genomima da fagi grupa A i I mogu biti i bez transpozaze, a da su njihovi ključni (eng. *core*) geni flankovani sa obe strane proteinom inicijacije replikacije i regulatornim genima. Fagi drugih grupa B, C, E, F, G, H, J su većinom flankovani i ne poseduju transpozazu, ali su utvrđeni i klasični neintegrativni genomi u ovim grupama faga (izuzev E i H grupa u kojima su detektovani samo flankovani genomi).



Slika 20. Poređenje genoma profaga iz različitih grupa, isti geni su prikazani istom bojom. Grupa A iz soja ATCC 19606 (Pristupni br. CP059040.1); grupa B iz soja ATCC BAA-1790 (Pristupni br. CP042841.1); grupa C iz soja WCHAB005078 (Pristupni br. CP027246.2); grupa D iz soja B8300 (Pristupni br. CP021347.1); grupa E iz soja

A85 (Pristupni br. CP021782.1); grupa F iz soja AB5075-UW (Pristupni br. CP008706.1); grupa G iz soja 31FS3-2 (Pristupni br. CP044517.1); grupa H iz soja 10_3 (Pristupni br. CP059547.1); grupa I iz soja A1429 (Pristupni br. CP046898.1); grupa J iz soja DSM30011_VUB (Pristupni br. CP091333.1)

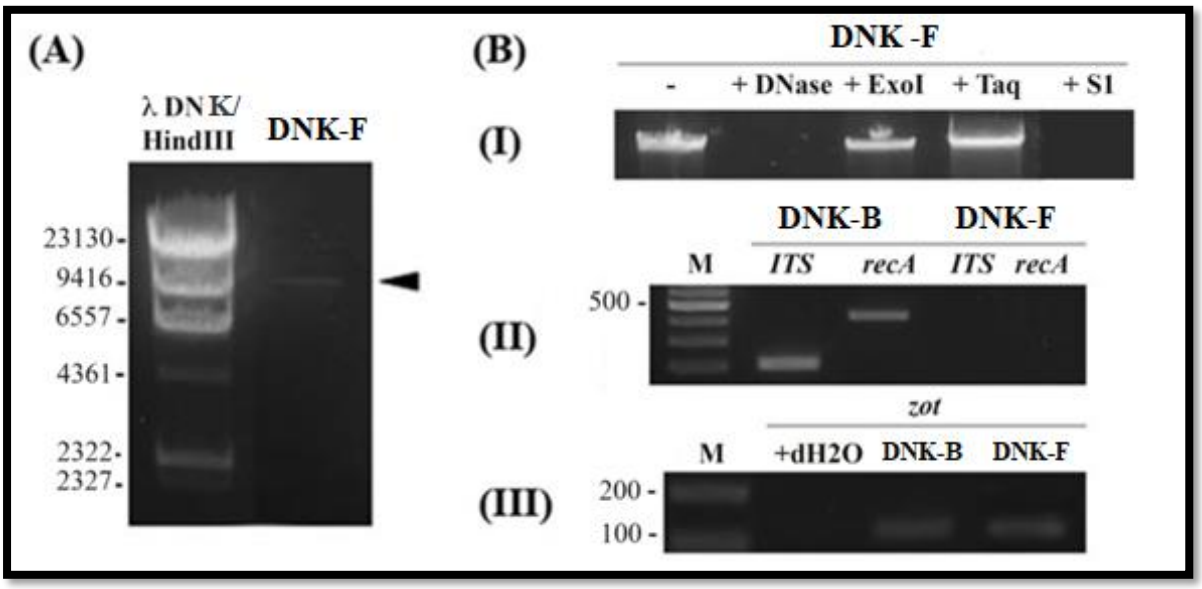
Analiza aminokiselinskih sekvenci CoaB i Zot (prilog 1A) i CoatB (prilog 1B) pokazala je <50% sličnosti unutar grupa od A do J, ali ne i među predstavnicima grupa, što ukazuje na potencijalno 10 novih rodova filamentoznih faga *A. baumannii*, prema ICTV pravilima podešavanja za definiciju roda (https://ictv.global/report/chapter/inoviridae/inoviridae/inovirus). Uzimajući u obzir dva soja koji nisu uključeni u postojeće grupe, a koji takođe imaju međusobno različite osnovne gene, ukupan broj potencijalnih rodova je 12.

5.7.1. Karakterizacija viralne DNK

Virusna DNK Af1 faga je uspešno izolovana, a veličina genoma ovog faga je između 6.557 i 9.416 baza (Slika 21.A). Izolovana DNK Af1 faga nije pokazala prisustvo *ITS* regiona specifičnog za rod *Acinetobacter*, niti *recA* gena specifičnog za vrste *A. baumannii* (Slika 21.B.II), čime je potvrđeno odsustvo bakterijske DNK u uzorku.

5.7.2. Enzimska digestija

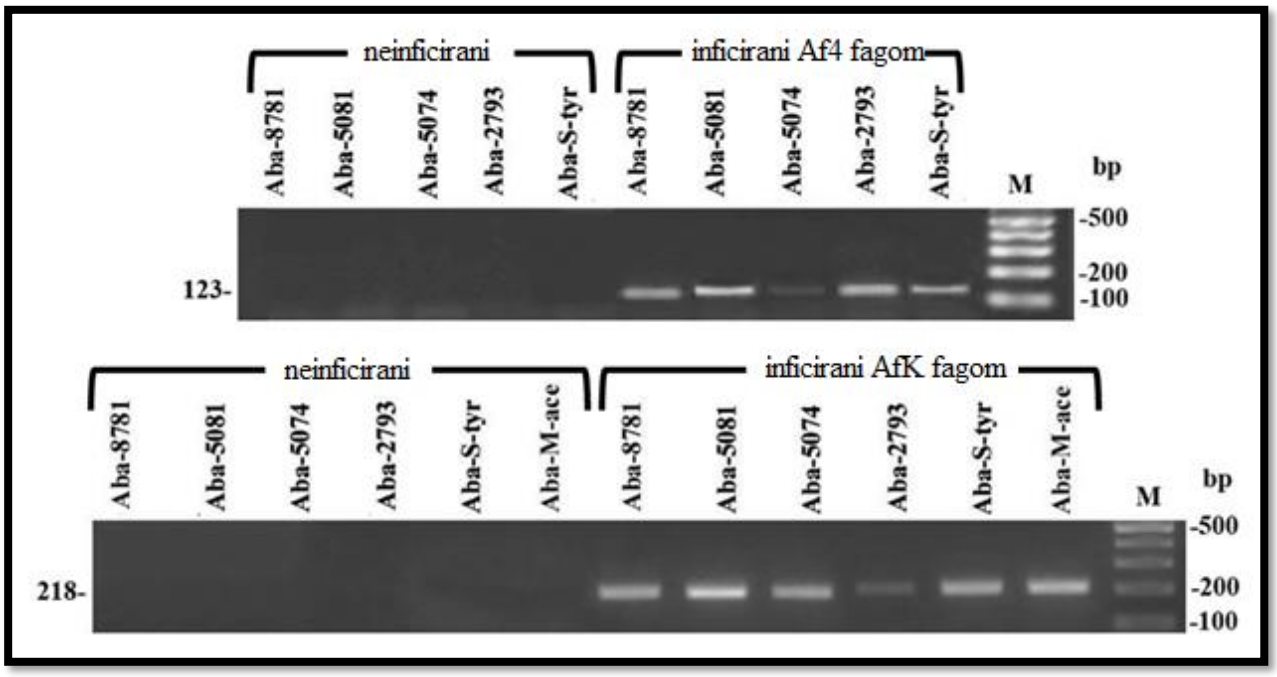
Izolovana nukleinska kiselina iz viriona je pokazala osetljivost na DNazu i S1 nukleazu (Slika 21.B.I), jer DNaza seče obe vrste DNK jednolančanu i dvolančanu, a S1 seče samo jednolančanu DNK. U skladu sa tim, traka je ostala neisečena nakon tretmana sa Taq I restrikcionim enzimom, jer je specifičan za degradaciju dvolančane DNK. Takođe je traka ostala neisečena u tretmanu enzimom Exo I koji seče samo linearnu DNK. Rezultati tretmana ukazuju na to da je ova DNK jednolančana i cirkularna. Pored toga, PCR analiza na prisustvo *zot* gena u Af1 bila je uspešna u virusnoj DNK, a bakterijska DNK je služila kao pozitina kontrola (Slika21.B.III).



Slika 21. Potvrda produkcije Af1 viriona i prisustva jednolančane (ssDNK) u virionima. **A.** Marker λ Hind III; uočava se traka virusne DNK-F. **B. (I)** Netretirana virusna DNK kao kontrola, tretirana virusna DNK enzimima: DNaza (+DNase), egzonukleaza I (+ExoI), TaqI (+Taq) i S1 nukleaza (+S1); **(II)** PCR reakcija bakterijske (DNK-B) i virusne DNK (DNK-F) sa prajmerima za *ITS* region i *recA;* M – marker 100 bp; **(III)** PCR reakcija sa odgovarajućim prajmerima za detekciju *zot*, sa bakterijskom (DNK-B) i virusnom DNK (DNK-F) kao matricama; marker 100 bp; +dH_2O negativna kontrola.

5.8.INFEKCIJA ODABRANIH SOJEVA FAGIMA I UTICAJ NA FENOTIPSKE KARAKTERISTIKE

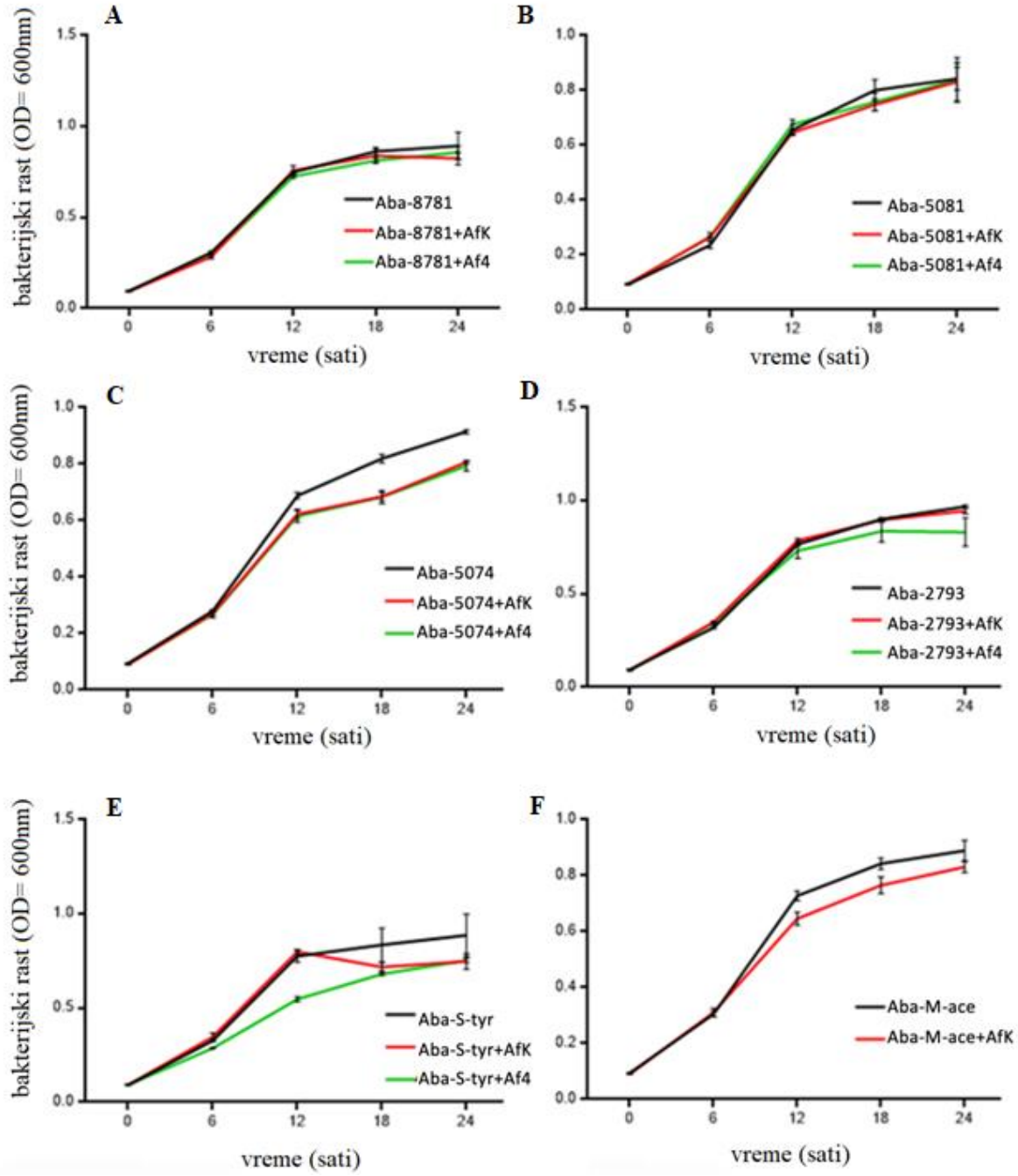
Uspešna infekcija je zabeležena sa Af4 fagom, koji pripada A grupi prema naznačenim prajmerima sa očekivanom veličinom produkt 123 bp, kod pet sojeva *A. baumannii*. AfK fag, koji pripada C grupi sa očekivanom veličinom produkta 218 bp, inficirao je šest sojeva. Nijedan od sojeva nije bio podložan infekciji Af1 fagom. Aba-M-Ace soj je bio isključivo inficiran AfK fagom, pokazujući otpornost na Af1 i Af4 fage. Infekcija je potvrđena PCR-om, korišćenjem bakterijske genomske DNK kao matrice i odgovarajućih prajmera. Odabrani produkti su sekvencirani (Pristupni br. OR999321 i OR999322) (Slika 22).



Slika 22. Potvrda infekcije Af4 (gore) i AfK fagima (dole), M- marker 100 bp.

5.8.1. Uticaj infekcije Af fagima na kinetiku rasta

Infekcija soja sa Af4 i AfK značajno je inhibirala rast *A. baumannii* sojeva sa izuzecima za sojeve Aba-8781 i Aba-5081 (slika 23). Kod ostalih inficiranih sojeva, promene su uočene nakon 6 do12 h inkubacije u poređenju sa njihovim neinficiranim ekvivalentima. Infekcija sa Af4 je statistički značajno smanjila ukupan rast sojeva Aba-5074, Aba-2793, Aba-S-tyr i Aba-M-ace, dok je AfK takođe smanjio rast sojeva (p<0,001), sa izuzetkom soja Aba-2793.

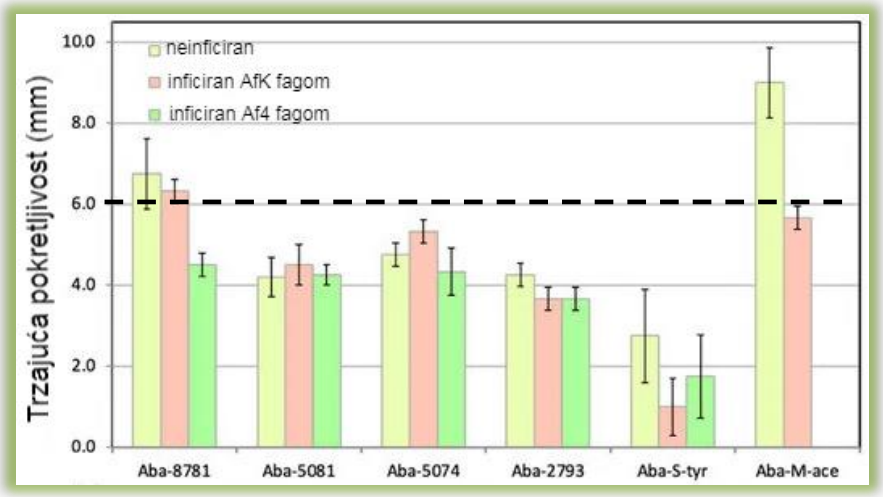


Slika23. Rast neinficiranih i inficiranih AfK-inficiranih *A. baumannii* sojeva i Af4-inficiranih *A. baumannii* sojeva (izuzev Aba-M-ace). Aba-8781 soj **(A)**, Aba-2793 soj **(B)**, Aba-5074 soj **(C)**, Aba-5081 soj **(D)**, Aba-S-tyr soj **(E)** i Aba-M-ace soj **(F)**, praćeni svakih 30 minuta tokom 24 h i rast je izražen kao OD_{600}. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.D. (n = 5). Primenjen je višestruki t test (GraphPad Prism 6).

5.8.2. Uticaj infekcije Af fagima na kretanje pilima, tj. trzajuću pokretljivost

Test pokretljivosti pilima je pokazao blago smanjenje trzajuće pokretljivosti kod svih inficiranih sojeva, ali razlike nisu bile statistički značajne između neinficiranih i inficiranih sojeva. Genomska vrsta *A. baumannii* je srednje pokretna i nepokretna za većinu sojeva, što se

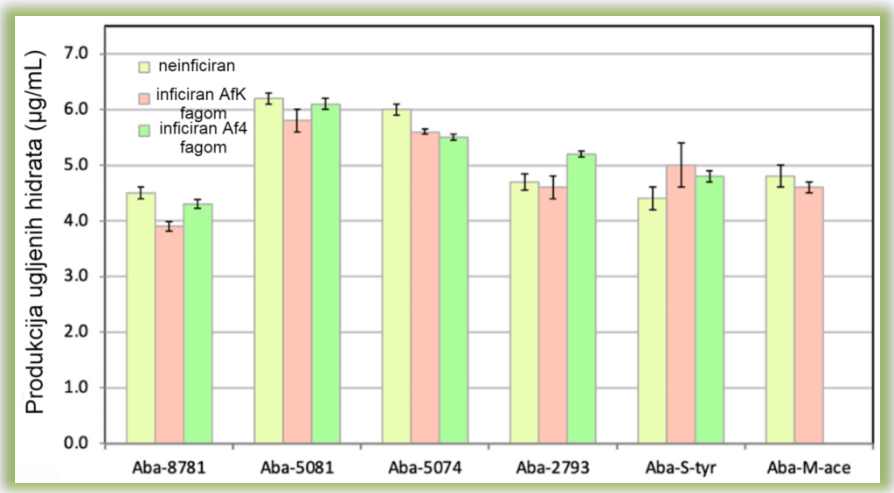
pokazalo i u ovom eksperimentu (slika 24). Međutim, važno je primetiti da je došlo do promene od srednje pokretne do trzajuće negativne (nepokretne) grupe za soj Aba-8781 inficiran Af4 fagom i soj Aba-M-ace inficiran AfK fagom.



Slika 24. Promena u trzajućem kretanju nakon infekcije Af4 i AfK fagima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (*n*=4), primenjen je višestruki *t* test (GraphPad Prism 6). Isprekidana linija pokazuje graniččnu vrednost za razlikovanje nepokretnih i srednje pokretnih sojeva.

5.8.3. Uticaj infekcije Af fagima na produkciju ugljenih hidrata

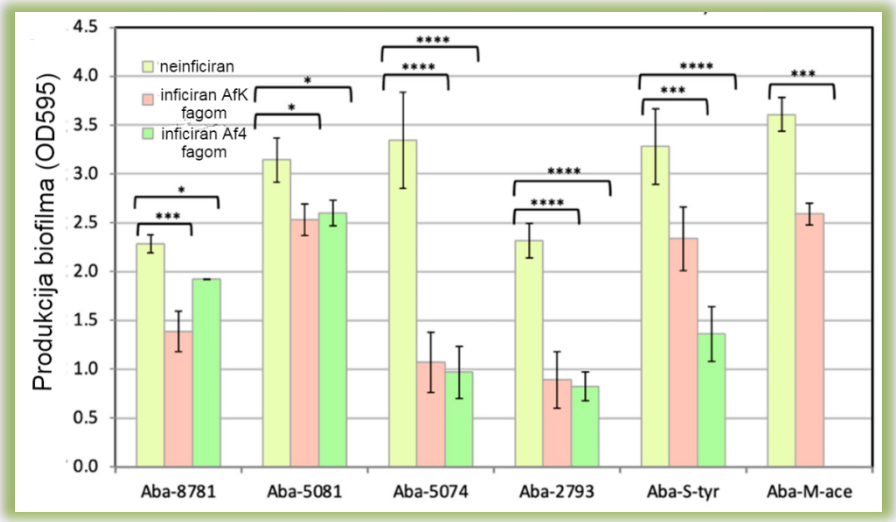
Kod svih šest testiranih sojeva, ustanovljena koncentracija ugljenih hidrata, odnosno lipooligosaharida, je iznosila od 4 μg mL^{-1} do 8 μg mL^{-1} (slika 25). Statistički značajna razlika u produkciji ugljenih hidrata između neificiranih sojeva i njihovih ekvivalenata inficiranih Af fagima nije utvrđena.



Slika 25. Produkcija ugljenih hidrata *A. baumannii* neinficiranih sojeva u odnosu na njihove ekvivalente inficirane Af fagima. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM (n = 4), primenjen je višestruki t-test (GraphPad Prism 6).

5.8.4. Uticaj infekcije Af fagima na produkciju biofilma

Infekcije sa Af4 i AfK fagima značajno su doprinele smanjenju proizvodnje biofilma kod različitih sojeva *A. baumannii* (slika 26). Najveća razlika je uočena kod sojeva Aba-5074 i Aba-2793 (p<0,0001) pri infekcijama oba faga, dok je takva razlika zabeležena kod soja Aba-S-tyr pri infekciji Af4 fagom. Infekcija AfK fagom je smanjila produkciju biofilma u sojevima Aba-8781, Aba-S-tyr i Aba-M-ace sa p<0,001, a najslabiji efekat je zabeležen nakon infekcije soja Aba-5081 sa p<0,5. Af4 fag je ovim inficiranim sojevima Aba-8781 i Aba-5081 smanjio produkciju biofilma sa p<0,05.



Slika 26. Smanjenje uprodukciji biofilma *A. baumannii* sojeva nakon infekcije Af4 i AfK fagima, izraženo kao OD_{595}. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM (n = 3); testirano je višestrukim t testom (GraphPad Prism 6); **** p< 0,0001; *** p< 0,001; ** p< 0,01; * p<0,05.

5.8.5. Uticaj infekcije Af fagima na osetljivost na antibiotike

Infekcija sa Af4 i AfK fagima značajno je povećala osetljivost inficiranih sojeva na ceftriakson, tobramicin i ciprofloksacin (Tabela 10). Neinficirani soj Aba-8781 postao je osetljiv na ceftriakson i tobramicin nakon infekcije Af4 fagom. Slično, infekcija AfK fagom je učinila soj Aba-8781 osetljivim na tobramicin. Soj Aba-5081 je pokazao povećanu osetljivost na ciprofloksacin nakon infekcije i Af4 i AfK fagima, iako nisu uočene nikakve kvalitativne promene. Slično, soj Aba-2793 je pokazao niži MIC za ceftriakson nakon infekcije oba faga, ali je ostao rezistentan na antibiotik. Konačno, MIC za tobramicin u Aba-S-tyr soju nakon infekcije oba faga bio je 64 μg mL^{-1}, dok je neinficirani soj imao MIC od 256 μg mL^{-1}. Ipak, kvalitativno

se osetljivost ovog soja nije promenila, tj. ovaj soj je ostao otporan na tobramicin. Inficirani sojevi su pokazali smanjeni MIC za ciprofloksacin, dok je najmanji uticaj imao ceftriakson.

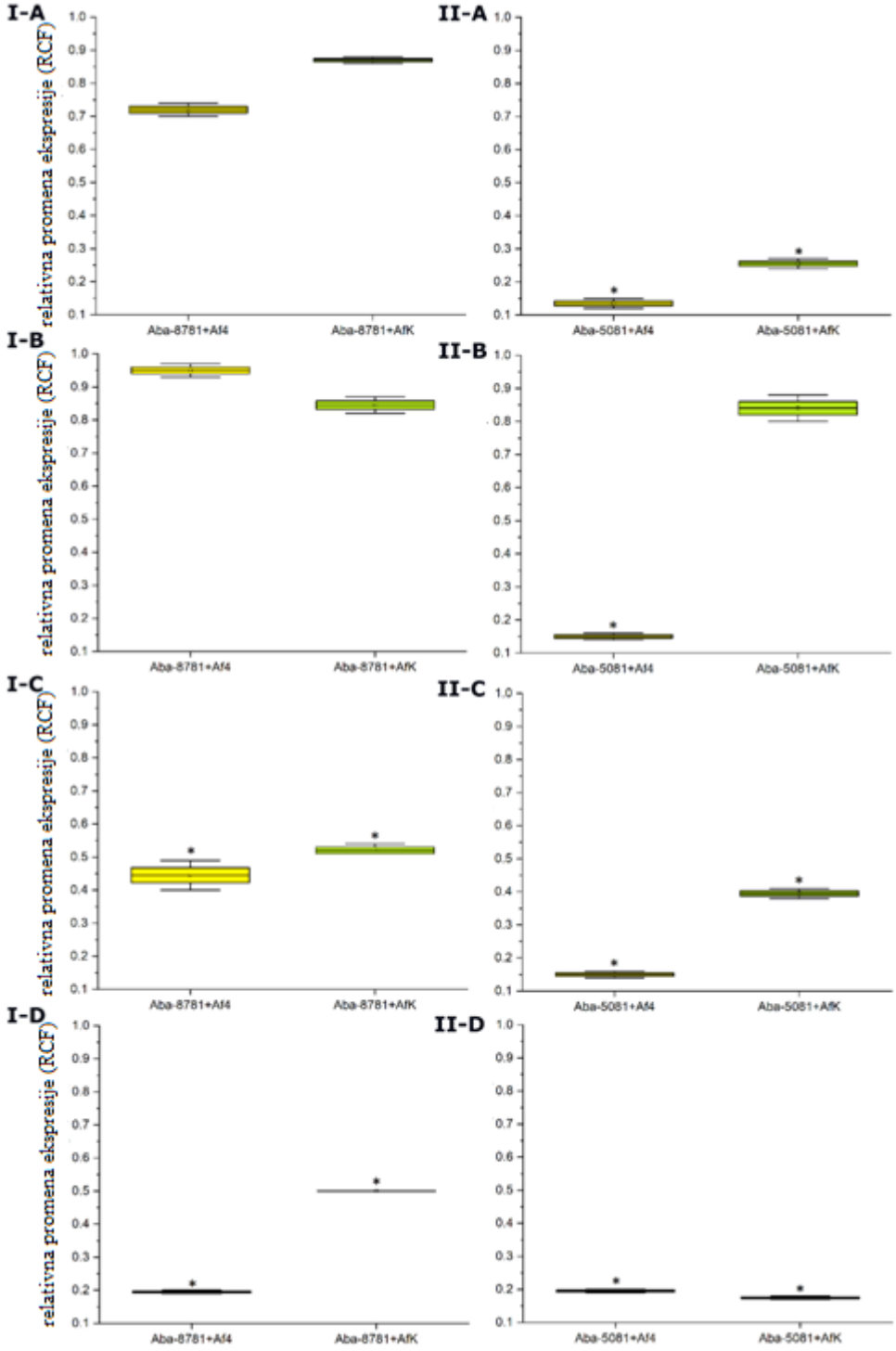
Tabela 10. Promene u osetljivosti sojeva *A. baumannii* na antibiotike nakon infekcije AfK i Af4 fagima. Promene ≥2xMIC su podebljane; a kvalitativna osetljivost je prikazana u zagradi.

Naziv soja	Ceftriakson (μg mL^{-1})			Tobramicin (μg mL^{-1})			Ciprofloksacin (μg mL^{-1})		
	neinf.	+AfK	+Af4	neinf.	+AfK	+Af4	neinf.	+AfK	+Af4
Aba-8781	32 (I)*	16 (I)	**8 (S)**	64 (R)	**1 (S)**	**1 (S)**	0,25 (S)	<0,125 (S)	<0,125 (S)
Aba-5081	>512 (R)	>512 (R)	512 (R)	64 (R)	32 (R)	64 (R)	128 (R)	**32 (R)**	**32 (R)**
Aba-5074	>512 (R)	>512 (R)	>512 (R)	>512 (R)	>512 (R)	>512 (R)	64 (R)	32 (R)	64 (R)
Aba-2793	>512 (R)	**128 (R)**	**128 (R)**	1 (S)	1 (S)	1 (S)	0.25 (S)	<0,125 (S)	<0,125 (S)
Aba-S-tyr	128 (R)	128 (R)	128 (R)	256 (R)	**64 (R)**	**64 (R)**	32 (R)	32 (R)	32 (R)
Aba-M-ace	128 (R)	128 (R)	-	1 (S)	0,5 (S)	-	16 (R)	4 (R)	-

*(R)-rezistentan, (I)-umereno osetljiv, (S)-osetljiv

5.8.6. Uticaj infekcije Af fagima na ekspresiju efluksnih pumpi

Relativne promene ekspresije gena za četiri efluks pumpe su prikazane na slici 27. Detektovana je generalno smanjena ekspresija efluksinh pumpi kod svakog inficiranog soja Af4 i AfK fagima u poređenju sa neinficiranim. Izuzetak je bila ekspresija gena *adeA* i *adeB* kod inficiranog soja Aba-8781, koja je bila smanjena, ali smanjenje nije statistički značajno u pogledu granične vrednosti <0,67.



Slika 27. Relativna promena ekspresije gena za efluksne pumpe *adeA* (**A**), *adeB* (**B**), *adeC* (**C**) i *abeMRT* (**D**), kod Aba-8781 **(I)** i Aba-5081 **(II)** sojeva, neinficiranih i inficiranih sa Af4 (žuto) i AfK fagima (zeleno), izračunato primenom $2^{-\Delta\Delta CT}$ metode, a granične vrednosti relativne ekspresije gena su >1,5 ili <0,67 (*); (n = 4).

6. DISKUSIJA

Ova studija je pokazala da izolovani Af fagi specifični za *A. baumannii* pripadaju redu *Tubulavirales* i familiji *Inoviridae.* To je pokazano na osnovu filamentozne morfologije bakteriofaga, koja je specifična za ovaj red. Ispitivani (pro)fagi su pokazali i specifičnu organizaciju genoma u modulima specifičnim za ovaj takson, a restrikcionom digestijom je dokazano da virioni koje produkuju sadrže jednolančanu cirkularnu DNK. DNK Af1 faga je okarakterisana na osnovu digestije sa nukleazama, enzimima čiji su supstrati određene forme DNK, te ukazuju na njenu prirodu. Viralna DNK Af1 senzitivna je na enzime S1 i DNazu, a otporna na tretmane sa TaqI i ExoI, što ukazuje na jednolančanu, cirkularnu prirodu DNK. Određena veličina genoma Af1 iznosi između 6.557 i 9.416 kbp, a odsustvo preciznosti je iz razloga što dvolančana i jednolančana DNK, kao i linearna i cirkularna, nemaju isti obrazac kretanja kroz agarozni gel. U prilog tome ide i proteinska struktura viriona, sa dominacijom CoaB proteina male molekulske mase i CoaA proteina približne mase 50 kDa u okviru viriona. Takođe, na osnovu analiza aminokiselinskih sekvenci ključnih proteina faga kao što su Zot i CoatB, a po preporukama ICTV-a, utvrđeno je postojanje potencijalno 12 novih rodova u okviru ove familije. Ovih 12 grupa faga je pokazalo međusobnu sličnost u sekvencama Zot i CoatB proteina manju od 50%, te su kandidati za poseban rod u okviru familije *Inoviridae* (Knežević i sar., 2021).

Analiza sekvenciranih genoma *A. baumannii*, deponovanih u NCBI GenBank, pokazala je da je 15,3% sojeva posedovalo najmanje jedan genetički element koji odgovara *zot* genu. Slična proporcija je detektovana i kod specifičnih *A. baumannii* filamentoznih faga unutar analiziranih sojeva u kolekciji PCR metodom, sa malo većim procentom sojeva koji imaju bar jedan *zot* gen (23,8%). Kada se uporedi prisustvo ovih (pro)faga kod *A. baumannii*, u odnosu na prevalencu filamentoznih (pro)faga kod *P. aeruginosa* (Knežević i sar., 2015), uočava se 3-4 x manja učestalost. Razlog za ovo nije poznat, ali je jasno da učestalost infekcije bakterija inovirusima značajno varira u zavisnosti od vrste.

Oko dve trećine sojeva pozitivnih na Af imalo je jedan *zot* gen, dok su kod ostalih detektovane dve ili više uzastopne potpune ili nepotpune kopije. Ovo ukazuje da među ispitivanim fagima, tačnije nekim grupama, kao što su A i C, A i E, A i D, A i I, B i F, C i E, C i F, kao i C i D, ne postoji jasna superinfekciona ekskluzija. Upravo su A, B i C grupe najčešće

detektovane, verovatno iz razloga što infekcija ovim fagima ne sprečava infekciju fagima iz drugih grupa i obrnuto.

Neki od ovih faga poseduju transpozazu i pojavljuju se kao jedna kopija u genomu kao što je slučaj sa D i I grupama, dok se (pro)fagi grupe A pojavljuju u više kopija. Ovo je verovatno rezultat specifičnog mehanizma integracije, u slučaju Af1 faga sa transpozazom IS110 sa DEDD katalitičkim domenom. Ova transpozaza ne generiše bočne direktne ponovke nakon transpozicije, niti su insercione sekvence koje formira invertovano ponovljene. Ona koristi mehanizam „copy-paste“ sa privremenim dvolančanim kružnim DNK intermedijerom, posredujući u umetanju profaga u ponovljene ekstragenske palindrome, integrone ili krajeve drugih transpozabilnih elemenata (Siguier et al, 2014; Makalovski et al, 2019). Po ovoj osobini Af1 fag pokzuje najviše sličnosti sa *N. gonorrhoeae* NgoF6 fagom (Piekarovicz i sar., 2014), jer su višestruke kopije profaga ranije primećene kod drugih profaga koji kodiraju sopstvene transpozaze, kao što su npr. filamentozni fagi *Neisseria,* koji kodiraju PivNM transpozazu (Lesterlin, i sar., 2004; Kavai i sar., 2005; Bischeour i sar., 2012; Derbise i Carniel, 2014; Huber i Valdor, 2002). Važno je u ovom kontekstu napomenuti filogenetsku srodnost rodova *Neisseria* i *Acinetobacter*, koja se između ostalog ogleda i u sličnosti njihovih filamentoznih bakteriofaga. Druga grupa kojoj pripadaju profagi *A. baumannii* ne poseduju transpozazu, već su ograničeni (flankovani) ponovljenim replikativnim modulom, koji uključuje genezaregulaciju ekspresije i protein inicijacije replikacije. Ovi fagi verovatno koriste domaćinovu mašineriju za integraciju i pojavljuju se kao tandemski ponovci od dve do četiri kopije u bakterijskim genomima. Ovaj tip faga karakterističan za E i H grupe, zabeležen je u pojedinim genomima grupa B, C, F, G i J, a taj fenomen je ustanovljen i kod faga *Vibrio cholerae* CTXϕ i faga *Yersinia pestis* YpfΦ koji integrišu svoje genome u *dif* mesta domaćina preko XerC/D rekombinatnog sistema koji je prethodno objašnjen u tekstu (Huber i Valdor, 2002; McLeod, i sar., 2005; Castillo, i sar., 2017).

U *in silico* analiziranom genomu Af1 utvrđena je konzervisana sekvenca Neisseria_TspB proteina (protein B koji stimuliše T i B ćelije; E = 1,18 × 10^{-3}), koji je poznat kao faktor virulencije, a koji je integralni deo CoaA proteina za adheziju. Protein sa ovim domenom vezuje IgG i izaziva agregaciju ćelija *N. meningitidis*, čime obezbeđuje zaštitu bakterija od imunskog odgovora (Mueller i sar., 2013). Dakle, protein odgovoran za adheziju faga za ćeliju domaćina, CoaA, zbog slične strukture, takođe može igrati ulogu u virulenciji *A. baumannii*, što bi trebalo dalje proučiti.

Analizom proteinskog profila Af faga ustanovljena je traka veličine približno 50 kDa što ukazuje na postojanje ovog proteina kod Af1, dok se u druga dva faga ne uočava vreovatno usled

razlike u količini tog proteina. Naime, glavni protein kapsida, CoaB, se ponavlja nekoliko hiljada puta u jednom virionu te se SDS-PAGE metodom relativno lako uočavaju trake veličine oko 5 kDa, dok se CoaA ponavlja samo 5 puta. Dakle, ta traka nije vidljiva ako koncentracija proteina za SDS-PAGE nije veoma visoka. Analiza suspenzije faga transmisionim elektronskim mikroskopom je pokazala filamentoznu morfologiju, što je u skladu sa karakteristikama glavnog proteina kapsida predstavnika familije *Inoviridae*. Mikrografije viriona koji su u obliku dugačkogi tankog filamenta odgovaraju pripadnicima ove familije, kao što su Pf fagi koji inficiraju sojeve *P. aeruginosa* (Abalo i sar., 2020, Gavrić, 2023) i *Ralstonia* fag PE226 (Murugaiyan i sar., 2011), ali su nekoliko puta kraći od njih, što je verovatno posledica značajno manjeg genoma.

Af filamentozni fagi su izolovani metodom koju su optimizovali Gavrić i Knežević (2022a). Produženim periodom inkubacije uz agitaciju se izbegava stacionarna faza rasta u biofilmu pri čemu filamentozni fagi budu zarobljeni u matriksu (Secor i sar., 2016a). Takođe, modifikacijom višestrukog centrifugiranja umesto filtriranja kroz pore filtera 0,22 μm se obezbeđuje veća brojnost viriona u uzorku uz odsustvo bakterijskih ćelija. Pokazano je da filtracija smanjuje brojnost filamentoznih faga sa prinosom nižim od 0,01% (Piekarowicz i sar., 2020, Gavrić i Knežević, 2022a). Produžena inkubacija praćena dodavanjem svežeg medijuma obezbeđuje značajno veći titar faga nakon propagacije, od 3,5 do 7,4 logaritama, a prečišćavanje u ekvilibrijumu CsCl je značajno olakšano, jer su jasnije i koncentrovanije trake faga. Takođe, metodom određivanja brojnosti faga u suspenziji opisanom u Gavrić i Knežević (2022a), utvđeno je da opisani *A. baumannii* specifični filamentozni fagi ne liziraju ćelije domaćina. Bakterijski rast u formi tepiha je ostao bez zone prosvetljenja ili lize bakterijske ćelije nakon dodavanja virusne suspenzije Af1, Af4 i AfK faga. Usled nedostatka lize nije bilo moguće utvrditi njihovu tačnu brojnost u eksperimentima. Određeni filamentozni fagi su sposobni da formiraju plake na bakterijskom konfluentnom rastu u formi tepiha, koje su obično neprozirne i male, veličine 1 mm (Hai i Lithgov, 2019), a tumačeni su više kao rezultat smanjenog rasta bakterija, pre nego lize bakterijske ćelije. Sa ovim u skladu su i rezultati relativno slabog smanjenja rasta *A. baumannii* nakon infekcije Af fagima.

U brojnim studijama je istražen uticaj filamentoznih bakteriofaga na fenotip njihovih domaćina kod različitih bakterijskih vrsta (Webb i sar., 2003; Rice i sar., 2009; Gavrić i Knežević, 2022). Iz tog razloga je analiziran uticaj infekcije Af filamentoznim fagima specifičnim za vrstu *A. baumannii*. Infekcija *zot*-negativnih sojeva *A. baumannii* uspostavljena je tretmanom Af4 i AfK na 5 i 6 sojeva *A. baumannii*, dok Af1 nije inficirao nijedan od odabranih

sojeva. Inficirani sojevi pokazali su promene mnogih fenotipskih karakteristika u poređenju sa njihovim neinficiranim ekvivalentima.

Na kinetiku rasta domaćina brojni filamentozni fagi imaju inhibitorni efekat (Askora i sar., 2009; Addy i sar., 2012; Ahmad i sar., 2014; Yamada i sar., 2007) ili zanemarljivo mali (Kamiunten i Wakimoto, 1981; Wan i Goddard 2012; Kuo i sar., 1987). Takođe, pokazano je i odsustvo uticaja infekcije fagom na rast *R. solanacearum* (Ahmad i sar., 2017) i *Yersinia pestis* (Debrise i sar., 2007), kao i blago smanjenje rasta inficiranih *Pseudomonas aeruginosa* sojeva filamentoznim fagom, ali samo privremeno, te se nakon 24h inkubacije više ne detektuje razlika u rastu između inficiranog i neinficiranog soja (Gavrić i Knežević, 2022b). Kod analiziranih sojeva *A. baumannii* utvrđen je sličan efekat infekcije Af4 i AfK fagima – nakon 6 do 12 h inkubacije detektovano je blago smanjenje rasta, što je verovatno posledica potrošnje ćelijskih resursa tokom replikacije faga i sinteze virusnih proteina (Loh i sar., 2019). Inhibicija rasta bakterija potencijalno može ukazivati i na opterećen i sporiji metabolizam bakterija. Autori Pourtois i sar., (2021) ustanovili su da je proizvodnja Pf faga metabolički skupa za bakterije, tako da sojevi *P. aeruginosa* koji produkuju fage (Pf+) rastu sporije od Pf-negativnih (Pf-) sojeva *in vitro* (Pourtois i sar., 2021). Ipak, ovo smanjenje rasta nije dovoljno da se uoče virusne plake na podlozi.

Ispitan je i efekat infekcije sojeva Af fagima na trzajuću pokretljivost. Utvrđena je blaga inhibicija trzajuće pokretljivosti nakon infekcije svih sojeva Af4 i AfK fagima, ali statistički značajna razlika nije potvrđena. Za trzajuću pokretljivost bakterije koriste pile, a pili tipa IV su uobičajena karakteristika sojeva *A. baumannii* i istovremeno predstavljaju receptore za filamentozne fage (Bradlei, 1980; Bart i sar., 2011; Knežević i sar. 2021). Dobijeni nalazi blagog smanjenja kretanja pilima su u skladu sa nalazima za druge filamentozne fage, *Xanthomonas* fag XacF1, *Ralstonia* fagi RSS51 i RSM3 i *Pseudomonas* fag Pf4, što sugeriše da filamentozni fagi mogu uticati na trzajuću pokretljivost vezivanjem za pile tipa IV i na taj način ometati pokretljivost ili smanjiti proizvodnju pila da bi sprečili superinfekciju (Vang i sar., 2013; Ahmad i sar., 2014; Ahmad i sar., 2017; Gavrić i Knežević, 2022; Secor i sar, 2017). Ustanovljen je i mehanizam da Pf4 fag proizvodi PfsE protein koji inhibira izduživanje pila (Schmidt i sar., 2022).

Filamentozni bakteriofagi *Ralstonia, Vibrio* i *Pseudomonas* sojeva su pored navedenih fenotipskih osobina pokazali uticaj i na promene u produkciji kapsule (Mai-Prochnow i sar., 2015). Dobro su dokumentovani mehanizmi interakcija fag-kapsula za litičke fage, dok za filamentozne postoji potreba za daljim proučavanjem. Nakon infekcije fagom, bakterije mogu mutirati, smanjiti ekspresiju ili izgubiti receptore koje fag koristi da prodre u ćeliju (Bertin i sar.,

2011). Kod drugih je uočeno da bakterije maskiraju receptore faga slojem ekstracelularnih polisaharida (EPS), tj. kapsulama. U mnogim slučajevima fagi su blokirani kapsulama i ne mogu da dođu do svog receptora za ulazak (Rouset i sar., 2018). Ipak, neki fagi su razvili mehanizme da kod kapsuliranih sojeva *A. baumannii* koriste kapsulu kao receptor ili samo da je zaobiđu (Altamirano i sar., 2021). Međutim, fagi kao odgovor na to mogu da razviju sposobnost da prepoznaju novi receptor (Mayer i sar., 2012), ili da se brzo prilagode mutiranom receptoru (Michel i sar., 2010). Ono što *Inoviridae* ne poseduju u odnosu na fage sa repom jeste domen endosijalidaze, enzima koji fagima sa repom omogućava da razgrade EPS koji pokriva maskirane receptore (Latka i sar, 2019). Ovim bi potencijalno moglo da se objasne dobijeni rezultati uticaja infekcije na kapsulu *A. baumannii* sojeva kod kojih je produkcija kapsula veoma slaba i pre infekcije fagom. Za razliku od Af faga, kod *Ralstonia* faga RSS1 uočeno je da menja osobine inficiranog soja utičući na ekspresiju faktora virulencije kao što su povećanje aktivnosti egzopolisaharida, trzajuće pokretljivosti i produkcije kapsule (Addy i sar., 2012). Svakako, nije dovoljno istražen uticaj filamentoznih faga na ovaj faktor virulencije, te su podaci za sada oskudni.

Bakterije često prelaze sa planktonskog, slobodnogživećeg stanja na život u okviru mikrobnih zajednica koje su u vezi sa površinom i nazivaju se biofilm. Uloga pila tipa IV i egzopolisaharida se ogleda i u ovom procesu, jer su zaslužni za formiranje mikrokolonija (Tomaras i sar., 2003). Biofilm kao bakterijska populacija zatvorena u ekstracelularnom matriksu je formacija koja igra ključnu ulogu u patogenezi i veoma otežava lečenje infekcija koje su posredovane biofilmom. Kapacitet *A. baumannii* da kolonizuje i formira biofilm na živim i neživim površinama igra značajnu ulogu u hroničnim infekcijama, rezistenciji na antibiotike, kao i u sposobnosti da preživi u bolničkim uslovima i učestvuje u horizontalnom transferu gena (Amankvah, et al. ., 2021; Iang i sar., 2019). Infekcije *A. baumannii* posredovane biofilmom su najčešći tip infekcije ovom bakterijom, povezane su sa medicinskom opremom i izuzetno ih je teško lečiti. Iako filamentozni fagi generalno doprinose proizvodnji biofilma, Af fagi značajno smanjuju sposobnost *A. baumannii* da formiraju biofilm. Slično je primećeno samo za nekoliko drugih filametoznih faga kao što su Ralstonia fagi RSM3 i RSS0 (Addy i sar., 2012a; Yamada, 2013), ili *E. coli* fag f1 (Mai i sar., 2011). Smanjenje proizvodnje biofilma u slučaju infekcije Af fagima može biti rezultat uočenog odsustva lize bakterijskih ćelija, pa se ekstracelularna DNK u manjoj meri oslobađa iz ćelija. U vezi sa tim može biti odsustvo plaka nakon infekcije Af fagima. Ekstracelularna DNK je sastavni deo matriksa biofilma za koju se navodi da je odgovorna za njegovu bolju produkciju (Webb i sar., 2003; Rice i sar., 2009). Pored toga, filamentozni fagi *P. aeruginosa* (Pf) značajno poboljšavaju stabilnost biofilma, pošto su dugi filamenti, kao što je slučaj sa Pf fagima dužine i do 2.000 nm i kao takvi su važna komponenta

matriksa biofilma (Secor i sar., 2015). Međutim, Af fagi su znatno kraći i verovatno ne mogu da vežu komponente matriksa tako efikasno kako ih vezuju Pf fagi. Takođe, u početnim koracima razvoja biofilma ustanovljeno je da su pili i pokretljivost pilima uključeni u pronalaženje adekvatnih površina za adheziju, posebno što *A. baumannii* nema mogućnost plivajućeg kretanja. Pili su odgovorni i za početno vezivanje i formiranje mikrokolonija (Whiteley i sar., 2001), tako da smanjenje trzajuće pokretljivosti nakon infekcije Af fagom odgovara ovim nalazima smanjene proizvodnje biofilma. Slično tome, odsustvo efekta Af faga na produkciju kapsule, koja je važna u inicijalnoj adheziji, u skladu je sa smanjenjem produkcije biofilma.

Infekcija Af filamentoznim fagima je doprinela i povećanju osetljivosti inficiranih sojeva na specifične grupe antibiotika. Ovo povećanje se odnosi na planktonske ćelije, pre formiranja biofilma. Povećanje osetljivosti *A. baumannii* sojeva nakon infekcije je bilo najuočljivije za tobramicin i ceftriakson, pošto je infekcija Af4 i AfK fagima ponovo senzibilisala sojeve koji su u odsustvu infekcije pokazali rezistentnost na njih. Promena u osetljivosti sojeva nakon infekcije može biti i veoma velika, kao što je slučaj sa *R. solanacearum* fagom RSS1 koji povećava osetljivost bakterije na ampicilin za najmanje deset puta (Addy i sar., 2012). Takođe, Pf filamentozni bakteriofagi povećavaju osetljivost *P. aeruginosa* na aminoglikozide, β-laktame i fluorohinolone (Gavrić i Knežević, 2022), a Vibrio fag VEJ povećava osetljivost *Vibriocholerae* na ampicilin (Wang i sar., 2013). U studiji Gavrić i Knežević (2022b) uočeno je povećanje aktivnosti antibiotika na *P. aeruginosa* sojeve PA14 i LESB58 koji su inficirani Pf4 fagom, naročito za ciprofloksacin, gentamicin, ceftazidim i streptomicin. Osetljivost ovih sojeva se infekcijom promenila iz rezistentnih u umereno osetljivue sojeve, što ukazuje na značajnu resenzitizaciju na ove antibiotike. *In vitro* eksperimenti su pokazali da filamentozni fagi u kombinaciji sa malim dozama antibiotika inhibiraju rast ili čak ubijaju *P. aeruginosa* (Hagens i sar., 2006). Pretpostavljeni mehanizam promene osetljivosti na antibiotike je prethodno objašnjen činjenicom da mašinerija za ekstruziju faga u bakterijskoj membrani može da promeni njenu permeabilnost, omogućavajući ulazak antibiotika u ćeliju (Endeman i Model, 1995). Naime, p4 je 14-merni protein, čije subjedinice formiraju poru u centralnom delu, kroz koju mogu da uđu antibiotici. Ove pore su zatvorene ako ne dolazi do ekstruzije faga, ali se mogu otvoriti usled promene membranskog potencijala, kao što je dokumentovano za Escherichia fag f1 (Lin i sar., 2001).

U kontekstu smanjenja MIC vrednosti pri infekciji filamentoznim fagom, prvi put je ispitana ekspresija efluksnih pumpi kao mogućeg mehanizma uključenog u ovaj fenomen. Što se tiče infekcije fagima sa repom, postoje nalazi da oni koriste pumpe membranskog efluksnog sistema kao receptore. Tako na primer, *Pseudomonas* fag OMKO1 koristi porin M spoljašnje

membrane (OprM), koji je deo deo Mex efluksnog sistema za uklanjanje više lekova, kao receptor za svoje vezivanje za domaćina (Chan i sar., 2016). Povećana izloženost ovog receptora fagima i vezivanju faga za njihpredstavlja selekciju na bakterijeu pravcu razvoja rezistentnosti na fage. Samim tim se narušava i efikasnost Mex efluksnih pumpi za ekskreciju hemijskih antibiotika, ustanovljeno je u studiji autora Chan i sar. (2016). Ovi podaci pokazuju da rezistencija na fage dovodi do veće osetljivosti na antibiotike koje prvenstveno kontrolišu Mex efluksni sistemi. Dolazi do evolutivnog kompromisa kod multirezistentnih sojeva *P. aeruginosa*, pri čemu evolucija otpornosti bakterija na infekciju fagima menja mehanizam efluksne pumpe koja sve slabije ekskretuje lekove i dolazi do povećanu osetljivost na nekoliko klasa antibiotika (Hsueh isar., 2005; Labrie i sar., 2010; Chan i sar, 2016). Ovo svakako nije slučaj sa filamentoznim fagima, koji isključivo koriste pile kao receptore. Efluksne pumpe abeMRT kod sojeva *A. baumannii* odgovorne su za rezistenciju na ciprofloksacin (Coyne i sar., 2010) i utvrđenaje njihova niža ekspresija u Aba-8781 i Aba-5081 inficiranim sojevima što je u skladu sa nižim MIC vrednostima inficiranih sojeva za ciprofloksacin. Takođe, efluksne pumpe adeABC su povezane sa rezistencijom na tobramicin i ceftriakson (Coyne i sar., 2010), pa je njihova izmenjena ekspresija u inficiranim sojevima povezana sa prethodno ustanovljenim nižim MIC vrednostima. Mehanizam koji može doprineti funkcionisanju efluksnih pumpi je potencijalna konkurencija pumpi i ekstruzionih mašinerija i proteina kapsida Af faga, pošto se svi oni integrišu u ćelijsku membranu. Smanjen broj efluksnih pumpi integrisanih u membrane može dovesti do manje količine eliminisanih antibiotika iz ćelije, a samim tim i do povećane osetljivosti bakterija, što je neophodno dodatno potvrditi. Ipak, ovo ne objašnjava dokazano nižu relatinu ekspresiju gena za efluksne pumpe, zbog čega je mehanizam uticaja filamentoznih faga na ekspresiju efluksnih pumpi verovatno daleko kompleksniji.

Uočeno povećanje osetljivosti sojeva na konvencionalne antibiotike nakon infekcije Af fagima moglo bi predstavljati potencijalno novu, komplementarnu strategiju u borbi protiv multiplo rezistentnih sojeva *A. baumannii*. Mogućnost resenzitizacije sojeva nakon infekcije Af fagima moglo bi imati značaj u tretmanu infekcija čiji su etiološki agensi multiplo i panrezistentni sojevi *A. baumannii*. Pre razmatranja potencijalne primene Af faga u resenzitizaciji sojeva, neophodno je u potpunosti rasvetliti mehanizme koji su uključeni u ovaj fenomen, a onda testirati primenu ovih faga u pretkliničkim i kliničkim studijama.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

- U genomu soja ATCC 19606 detektovan je profag, koji po modularnoj organizaciji genoma i prisutnim genima odgovara flamentoznim (pro)fagima i ovaj fag je dalje korišćen za *in silico* analize
- Analizom prisustva *zot* gena u 541 genomu *A. baumannii*, ustanovljena je relativno niska prevalenca filamentoznih profaga od 15,3%. U kolekciji kultura ovaj procent je bio nešto veći (23,8%), ali je prevalenca ovih faga bliska onoj dobijenoj *in silico* analizama.
- Ustanovljeno je postojanje 12 različitih grupa kao potencijalnih rodova u okviru ove familije, na osnovu razlike u Zot i CoaB amino-kiselinskim sekvencama, koje su iznosile ≥50%. Utvrđeno je postojanje 10 grupa označenih slovima A-J i dva profaga koja ne pripadaju ni jednoj grupi.
- Sojevi su obično posedovali jedan, a ređe 2 i više profaga, pri čemu su dominantni bili pofagi iz grupa A, B i C.
- Af1 i Af4 fagi iz grupe A, koja kodira transpozaze za integraciju u genom domaćina, dok AfK fag iz grupe C, kod koje je uvrđeno da stvara profag flankovan sa oba kraja genima replikacije i regulacije.
- Izvršena je karakterizacija morfologije faga Af1 izolovanog iz referentnog soja *A. baumannii* ATCC 19606 transmisionim elektronskim mikroskopom i time su potvrđene morfološke karakteristike bakteriofaga familije *Inoviridae*. Virioni su filamentozni, dužine oko 770 nm, sa izvesnim varijacijama u dužini viriona u preparatu.
- Okarakterisan je proteinski profil faga SDS-PAGE metodom čime je detektovano prisustvo CoaB proteina, odnosno glavnog proteina kapsida filamenoznih faga, veličine oko 5 kDa, kao i CoaA, tj. adhezionog proteina veličine oko 50 kDa, što odgovara očekivanim masama određenim *in silico* analizama.
- Utvrđena je veličina izolovane DNK, koja iznosi između 6.557 i 9.416 baza. Tretman enzimima DNaza, ExoI, TaqI i S1 nukleaze ukazao je da je viralna DNK jednolančana i cirkularna.
- Izolovani su i okarakterisani bakteriofagi Af1 i Af4 iz sojeva ATCC 19606, Aba-4804, koji pripadaju grupi A kao i AfK poreklom iz soja Aba-K, koji pripada grupi C. Ovi fagi ne liziraju bakterijsku ćeliju, tj. ne stvaraju plake, odnosno zone prosvetljenja.

- Određeni sojevi *A. baumannii* u kojima nije detektovano prisustvo profaga PCR metodom (*zot*-negativni), uspešno su inficirani fagima Af4 i AfK. Izvršene su analize uticaja infekcije fagimana fenotipske karakteristike čime je ustanovljeno da infekcija ovim fagima utiče na faktore virulencije i fitnesa *A. baumannii*.
- Ustanovljena je inhibicija rasta inficiranih sojeva nakon šestog i dvanastog sata inkubacije u odnosu na neinficirane, sa izuzetkom sojeva Aba-8781 i Aba-5081.
- Trzajuće kretanje pomoću pila je smanjeno kod inficiranih sojeva u odnosu na neinficirane, međutim nije ustanovljena statistički značajna razlika. Ipak, kod pojedinih sojeva došlo do kvalitativne promene pokretljivosti, od umerene pokretljivosti trzajućim kretanjem, do odsustva pokretljivosti.
- Formiranje biofilma je statistički značajno inhibirano kod inficiranih sojeva u odnosu na njihove neinficirane ekvivalente. Fag Af4 je pokazao veću inhibiciju formiranja biofilma kod inficiranih sojeva u odnosu na fag AfK.
- Osetljivost na antibiotike ceftriakson, tobramicin i ciprofloksacin se povećala nakon infekcije. Soj Aba-8781 je nakon infekcije resenzitivisan – od srednje osetljivog na ceftriakson i rezistenog na tobramicin postao je osetljiv na oba antibiotika. Minimalna inhibitorna koncentracija za tobramicin u inficiranom soju Aba-S-tyr smanjila se četiri puta, ali je inficiran soj ostao rezistentan na tobramicin. Ova osobina bakteriofaga mogla bi biti iskorišćena u kliničkim tretmanima infekcija uzrokovanim multiplo- i panrezistentnim sojevima *A. baumannii*.
- Ekspresija gena četiri efluksne pumpe (*adeA, adeB, adeC* i *abeMRT*) je smanjena kodsvih sojeva nakon infekcije fagima. Izuzetak su *adeA* i *adeC* geni u inficiranom Aba-8781 soju gde smanjenje ekspresije nije statistički značajno, kao i *adeC* u Aba-5081 soju inficiranom AfK fagom, u odnosu na graničnu vrednost od <0,67.

Acinetobacter baumannii specifični filamentozni bakteriofagi poseduju sve zajedničke osobine familije *Inoviridae*. Nakon infekcije ovi fagi značajno doprinose promeni fenotipa *A. baumannii* sojeva. Veća osetljivost na antibiotike, smanjeno formiranje biofilma, niža kinetika rasta i smanjena pokretljivost pilima kod sojeva inficiranih Af fagom ukazuju na potencijal faga u smanjenju virulencije bakterije. Takođe, infekcija Af fagima ima i svoj klinički značaj u kontekstu resenzitizacije multiplo i panrezistentnih sojeva s obzirom na to da se povećava osetljivost na pojedine antibiotike nakon infekcije. Ovo bi trebalo dokazati u dodatnim pretkliničkim i kliničkim studijama, rasvetliti tačan mehanizam ove pojave i definisati strategiju za njenu eventualnu primenu.

8. LITERATURA

Addy, H.S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., Yamada, T. 2012a. The filamentous phage φrSS1 enhances virulence of phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* on tomato. Phytopath. 102,244–251.

Addy, H.S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., Yamada, T. 2012b. Utilization of filamentous phage phiRSM3 to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Dis.* 96,1204–1209.

Ahmad, A., Askora, A., Kawasaki, T., Efujie, M., Eyamada, T. 2014. The filamentous phage XacF1 causes loss of virulence in *Xanthomonas axonopodis* pv.*citri*, the causative agent of citrus canker disease. Front. Microbiol. 5,321.

Ahmad, A., Fadel, F., Sebban Kreuzer, C., Ba, M., Pélissier, G.D., Bornet, O., Vincent, F. 2017. Structural and functional in sights in to the periplasmic detector domain of the GacS histidine kinase controlling biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*.Sci. Rep. 7,11262.

Ahmad, T. A., Tawfik, D. M., Sheweita, S. A., Haroun, M., and El-Sayed, L. H. 2016. Development of immunization trials against *Acinetobacter baumannii*. Trials. Vaccinol. 5, 53–60.

Ahmed, S.S, Alp, E. 2015. Genotyping methods for monitoring the epidemic evolution of *A. baumannii* strains. J Infect Dev Ctries 9:347–354.

Ahuatzin-Flores OE, Torres E, Chávez-Bravo E. *Acinetobacter baumannii*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Pathogen in New Habitats: A Systematic Review. Microorganisms. 2024 Mar 23;12(4):644.

Aleksic Sabo, V., Gavric, D., Pejic, J., Knezevic, P. 2022. *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* complex: Isolation, identification and characterisation of environmental and clinical strains.Biol. Serb. 44,3–17.

Aleksic, V., Mimica-Dukic, N., Simin, N., Nedeljkovic, N.S., Knezevic, P. 2014. Synergistic effect of *Myrtus communis* L. essential oils and conventional antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* wound isolates. Phytomedicine.21,1666–1674.

Aleksić, V. 2016. Osetljivost multiplo rezistentnih sojeva *Acinetobacter baumannii* na nekonvencionalne antimikrobne agense. Doktorska teza. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet.

Amankwah, S., Abdella, K., Kassa, T. 2021. Bacterial biofilm destruction: A focused review on the recent use of phage-based strategies with other antibiofilm agents. Nanotechnol. Sci. Appl.14,161–177.

Aqawi M., Gallily R., Sionov R.V., Zaks B., Friedman M., Steinberg D. 2020. Cannabigerol prevents quorum sensing and biofilm formation of Vibrio harveyi. Front. Microbiol. 11:858.

Arndt, D., Grant, J.R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., Wishart, D.S. 2016. PHASTER: A better, faster version of the PHAST phage search tool. Nucleic Acids Res. 44,W16–W21.

Askora, A., Kawasaki, T., Usami, S., Fujie, M., Yamada ,T. 2009. Host recognition and integration of filamentous phage phiRSM in the phytopathogen, *Ralstonia solanacearum*.Virol.384,69–76.

Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D. 2020. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. Antibiotics (Basel). 12;9(3):119.

Baumann, P., Doudoroff, M., Stanier, R. 1968. A study of the *Moraxella* group II oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). J. Bacteriol., 95:1520-1541.

Bergogne-Bérézin, E., Towner, K. J. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev., 9:148–165.

Bischerour, J., Spangenberg, C., Barre, F.X. 2012. Holliday junction affinity of the base excision repair factor EndoIII contributes to cholera toxin phage integration.EMBO J.31,3757–3767.

Bou, G., Cervero, G., Domínguez, M. A., Quereda, C., and MartínezBeltran, J. 2000a. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β-lactamases. J. Clin. Microbiol. 38, 3299–3305.

Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S, Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 48:1–12.

Bouvet, P., Grimont, P. 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 description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Inter. J. Syst. Bacter. 36:228-240.

Bozzola, J.J., Russell, L.D. 1998. *Electron Microscopy—Principles and Techniques for Biology*, 2nd Ed.; Jones and Bartlett Publishers Book News, Inc.:Portland,OR,USA, p.670.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities od protein utilizing the principle of protei-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Bradley, D.E. 1980. Afunctionof *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: Twitching motility. Can. J. Microbiol.26,146–154.

Branston, S.D., Stanley, E.C., Ward, J.M., Keshavarz-Moore, E. 2013. Determination of the survival of bacteriophage M13 from chemical and physical challenges to assist in its sustainable bioprocessing. Biotechnol Bioproc E 18, 560–566.

Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Garrity, G. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; Volume two: *Proteobacteria*; Part B: The *Gammaproteobacteria*. 2nd Ed. Garrity, G. M. Springer.

Brisou, J., Prevot, A. 1954. Studies on bacterial taxonomy. The revision of species under *Achromobacter* group. Annales de L'institut Pasteur. Microbiologie (Paris), 86:722-728.

Brown, A.E. 2007. Benson's Microbiological applications: Laboratory manual in General Microbiology. The McGrow-Hill Book Company.

Brown, L.R., Dowell, C.E. 1968. Replication of coliphage M13, I.Effects on host cell after synchronized infection.J. Virol.2,1290–1295.

Camarena, L., Bruno, V., Euskirchen, G., Poggio, S., Snyder, M. 2010. Molecular Mechanisms of Ethanol-Induced Pathogenesis Revealed by RNA-Sequencing. PLOS Pathog. 6(4): e1000834.

Chen, J., Su, Z., Liu, Y., Wang, S., Dai, X., Li, Y., Peng, S., Shao, Q., Zhang, H., Wen, P. 2009. Identification and characterization of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhenjiang.China Int. J. Infect. Dis.13,717–721.

Chouikha, I., Charrier, L., Filali, S., Derbise, A., Carniel, E. 2010. Insights in to the infective properties of YpfΦ, the *Yersinia pestis* filamentous phage.Virol.407,43–52.

Clemmer, K. M., Bonomo, R. A., Rather, P. N. 2011. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. Microbiol. 157(9):2534-2544.

Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI supplement M100. In *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 28th Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018.

Conners, R., León-Quezada, R.I., McLaren, M., Bennett, N.J., Daum, B., Rakonjac, J., Gold, V.A.M. 2023. Cryo-electron microscopy of the f1 filamentous phage reveals insights into viral infection and assembly. Nat Commun. 11;14(1):2724.

Cosgaya C, Ratia C, Marí-Almirall M, Rubio L, Higgins PG, Seifert H, Roca I, Vila J. 2019. *In vitro* and *in vivo* Virulence Potential of the Emergent Species of the *Acinetobacter baumannii* (Ab) Group. Front Microbiol. 24;10:2429.

Coyne, S., Guigon, G., Courvalin, P., Périchon, B. 2010. Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a micro array. Antimicrob. Agents Chemother. 54,333–340.

Damier-Piolle, L., Magnet, S., Brémont, S., Lambert, T., Courvalin, P. 2008. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 52(2):557-62.

Deloger, M., Karoui, M., Petit, M.A. 2009. A Genomic Distance Based on MUMIndicates Discontinuity Between Most Bacterial Species and Genera. J.bacteriol. 191. 91-9.

Derbise, A., Carniel, E. 2014. YpfΦ: A filamentous phage acquired by *Yersinia pestis*.Front. Microbiol. 15,701.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. 8:350–6.

Dupont-Rouzeyrol, M., Pagès, J.M., Lafitte, D., Siroy, A., Bollet, C. 2005. Identification of an OprD Homologue in *Acinetobacter baumannii*. J. Proteome Res. 4. 2386-90.

Espinal, P., Martí, S., Vila, J. 2012. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. J. Hosp. Inf. 80(1):56-60.

Evans, B.A., Amyes, S.G.2014. OXA β-lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 27(2):241-63.

Fajardo Bonin, R., Chapeaurouge, A., Perales, J., da Silva, J.G., Jr., do Nascimento, H.J., D'Alincourt Carvalho Assef, A.P. and Moreno Senna, J.P. 2014. Identification of immunogenic proteins of the bacterium *Acinetobacterbaumannii* using a proteomic approach. Prot. Clin. Appl., 8: 916-923.

Falagas, M.E., Koletsi, P.K., Bliziotis, I.A. 2006. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*.J. Med. Microbiol. 55, 1619–1629.

Fasano, A., Baudry, B., Pumplin, D.W., Wasserman, S.S., Tall, B.D., Ketley, J.M., Kaper, J.B. 1991. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions.Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5242–5246.

Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., editors. 2005. Virus Taxonomy. London: Elsevier

Fekrirad, Z., Darabpour, E., Kashef, N. 2021. Eradication of *Acinetobacter baumannii* Planktonic and Biofilm Cells Through Erythrosine-Mediated Photodynamic Inactivation Augmented by Acetic Acid and Chitosan. Curr. Microbiol. 78,879–886.

Feng, J.N., Model, P., and Russel, M. 1999. A transenvelope protein complex needed for filamentous phage assembly and export. Mol. Microbiol. 34, 745-755.

Fernandez-Cuenca, F., Martinez-Martinez, L., Conejo, M.C., Ayala, J.A., Perea, E.J., Pascual, A. 2003. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 51:565–574.

Flores-Diaz, M., Monturiol-Gross, L., Naylor, C., Alape-Giron, A., Flieger, A. 2016. Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 80, 597–628.

Gandham, N.R., Gupta, N., Jadhav, S.V., Misra, R.N. 2012. Isolation of *Acinetobacter baumannii* from cerebrospinal fluid following craniotomy, Med. J. DY. Patil. Univ., 5(2):151-153.

Gavric, D., Knezevic, P. 2022. Filamentous *Pseudomonas* Phage Pf4 in the Context of Therapy-Inducibility, Infectivity, Lysogenic Conversion, and Potential Application.Viruses. 14.

Gavric, D., Knezevic, P. 2022. Optimized Method for *Pseudomonas aeruginosa* Integrative Filamentous Bacteriophage Propagation.Front. Microbiol. 12,707815.

Geisinger, E., Isberg, R.R. 2015. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Pathog. 13;11(2):e1004691.

GenBank. National Institute of Health. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/prokaryotes/403/

Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I., Ursing, J. 1991. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. J. Clin. Microbiol. 29(2):277-82.

Hagens, S., Habel, A., Bläsi, U. 2006. Augmentation of the Antimicrobial Efficacy of Antibiotics by Filamentous Phage. Microb. Drug Resist. 12,164–168.

Hassan, A., Naz, A., Obaid, A., Paracha, R.Z., Naz, K., Mehwish Awan, F., Muhmmad, S.A., Janjua, H.A., Ahmad, J., Ali, A. 2016. Pangenome and immuno-proteomics analysis of *Acinetobacter baumannii* strains revealed the core peptide vaccine targets. BMC Genomics 17, 732.

Hay, I.D., Lithgow, T. 2019. Filamentous phages: Masters of amicrobial sharing economy.EMBO Rep. 20,47427.

Heritier, C., Poirel, L., Lambert, T., Nordmann P. 2005. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother., 49:3198–3202.

Higgins, P.G., Wisplinghoff, H., Stefanik, D., Seifert H. 2004. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 54:821–823.

Hood, R. D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M. A., Trinidad, R. R. S., Silverman, J.M., Ohlson, B.B., Hicks, K.G., Plemel, R.L., Li, M., Schwaz, S., Wang, W.J., Merz, A.J., Goodlett, D.R., Mougous, J.D. 2010. A type VI secretion system of *Pseudomonasaeruginosa* targets a toxin to bacteria. Cell Host Microbe 7, 25–37.

https://phil.cdc.gov/

https://www.biorender.com/

https://www.ecdc.europa.eu/en

Hu, C., Li, Y., Zhao, Z., Wei, S., Zhao, Z., Chen, H., Wu, P. 2018. *In vitro* synergistic effect of amlodipine and imipenem on the expression of the AdeABC efflux pump in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. PLoS One. 13(6):e0198061.

Huber, K.E., Waldor, M.K. 2002. Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD. Nature 417,656–659.

Hujer, K.M., Hamza, N.S., Hujer, A.M., Perez, F., Helfand, M.S., Bethel, C.R., Thomson, J.M., Anderson, V.E., Barlow, M., Rice, L.B., Tenover, F.C., Bonomo, R.A. 2005. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. Antimicrob. Agents Chemother. 49:2941–2948.

Hujer, K.M., Hujer, A.M., Hulten, E.A., Bajaksouzian, S., Adams, J.M., Donskey, C.J., Ecker, D.J., Massire, C., Eshoo, M.W., Sampath, R., Thomson, J.M., Rather, P.N., Craft, D.W., Fishbain, J.T., Ewell, A.J., Jacobs, M.R., Paterson, D.L., Bonomo, R.A. 2006. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. Antimicrob. Agents Chemother. 50:4114–4123.

International Committee on Taxonomy of Viruses: I.C.T.V. Availableonline: https://ictv.global/report/chapter/inoviridae/inoviridae/inovirus.

Jacobs, A.C., Hood, I., Boyd, K.L., Olson, P.D., Morrison, J.M., Carson, S., Sayood, K., Iwen, P.C., Skaar, E.P., Dunman, P.M. 2010. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. Infect Immun. 78(5):1952-62.

Jeon, J.H., Lee, J.H., Lee, J.J., Park, K.S., Karim, A.M., Lee, C.R., Jeong, B.C., Lee, S.H. 2015. Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. Int. J. Mol. Sci. 16, 9654-9692.

Jin, J.S., Kwon, S.O., Moon, D.C., Gurung, M., Lee, J.H., Kim, S.I., Lee, J.C. 2011. *Acinetobacter baumannii* Secretes Cytotoxic Outer Membrane Protein A via Outer Membrane Vesicles. PLOS ONE 6(2): e17027.

Quale, J., Bratu, S., Landman, D., Heddurshetti, R. 2003. Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Endemic in New York City, Clin. Infect. Dis. 37(2), 214–220.

Joly-Guillou, M.L. 2005. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*.Clin. Microbiol. Infect.11,868–873.

Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M. 1992. Therapist generation of mutation data matrices from protein sequences. Comput. Appl. Biosci. 8, 275–282.

Kamiunten, H., Wakimoto, S. 1981. Effect of Infection with Filamentous Phage Xf on the Growth, Ultrastructure and Virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* N5850. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.47,627–636.

Kawai, M., Uchiyama, I., Kobayashi,I. 2005. *In silico* genome comparison suggested that filamentous bacteriophages are integrated to *Neisseria* genomes by their own transposase. DNARes.12,389–401.

Kim, M., Oh, H.S., Park, S.C., Chun, J. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.64(Pt 2):346-351.

Knezevic, P., Petrovic, O. 2008a. Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia. Int. J. Antimicrob. Agents, 31(4):360-363.

Knezevic, P., Petrovic, O. 2008b. A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. J. Microbiol. Met. 74(2-3):114-118.

Knezevic, P., Adriaenssens, E.M., ICTV Report Consortium. 2021. J.Gen.Virol. 102,001614.

Knezevic, P., Kostanjsek, R., Obreht, D., Petrovic,O. 2009. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* Specific Phages with Broad Activity Spectra. Curr. Microbiol.59,173–180.

Knezevic, P., Voet, M., Lavigne,R. 2015. Prevalence of Pf1-like (pro)phage genetic elements among *Pseudomonas aeruginosa* isolates.Virol. 483,64–71.

Knežević, P. 2005. Antibiotska rezistencija vrste *Escherichia coli* izolovane iz crevnog trakta klinički zdravih goveda, svinja i živine. Magistarska teza, PMF UNS, Novi Sad.

Knežević, P. 2012. Bakteriofagi – alternativni antimikrobni agensi. Zadužbina Andrejević, Beograd.

Koeleman, J.G.M., Stoof, J., Van Der Bijl, M.W., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Savelkoul, P.H.M. 2001. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. J. Clin. Microbiol. 39(1):8-13.

Kon, H., Schwartz, D., Temkin, E., Carmeli, Y., Lellouche, J. 2020. Rapid identification of capsulated *Acinetobacter baumannii* using a density-dependent gradient test. BMC Microbiol. 20, 285.

Konstantinidis, K.T., Ramette, A., Tiedje, J.M. 2006. The bacterial species definition in the genomic era. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 361(1475):1929-40.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Biol. Evol.35,1547–1549.

Kuo, L.C., Teng, L.J., Yu, C.J., Ho, S.W., Hsueh, P.R. 2004. Dissemination of a clone of unusual phenotype of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* at a university hospital in Taiwan. J. Clin. Microbiol.442,1759–1763.

Kuo, L.C., Yu, C.J., Lee, L.N., Wang, J.L., Wang, H.C., Hsueh, P.R., Yang, P.C. 2003. Clinical features of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia at a university hospital in Taiwan. J. Formos. Med. Assoc. 102,601–606.

Kuo, T.T., Lin, Y.H., Huang, C.M., Chang, S.F., Dai, H., Feng, T.J. 1987. The lysogenic cycle of the filamentous phage Cflt from *Xanthomonas campestris* pv.*citri.* Virology.156,305–312.

Kuo, T.T., Tan, M.S., Su, M.T., Yang, M.K. 1991. Complete nucleotide sequence of filamentous phage Cf1c from *Xanthomonas campestris* pv.*citri.* Nucleic Acids Res.19,2498.

Kurcik-Trajkovska, B. 2009.*Acinetobacter* spp. – A serious enemy threatening hospitals Worldwide. Maced. J. Med. Sci. 2(2):157-162.

Kwon, H.J., Abi-Mosleh, L., Wang, M.L., Deisenhofer, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Infante, R.E. 2009. Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. Cell. 137(7):1213-24.

La Scola, B., Gundi, V.A., Khamis, A., Raoult, D. 2006. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. J. Clin. Microbiol. 44(3):827-32.

Laemmli,U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature227,680–685.

Lambert, P.A. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. JRSM. 42(95):22-26.

Lee, C.R., Lee, J.H., Park, M., Park, K.S., Bae, I.K., Kim, Y.B., Cha, C.J., Jeong, B.C., Lee, S.H. 2017. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7:55.

Lesterlin, C., Barre, F.X., Cornet,F. 2004. Genetic recombination and the cell cycle: What we have learned from chromosome dimers. Mol. Microbiol.54,1151–1160.

Lewis, K. 2008. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. Cur. Top.Microbiol. 322:107-131.

Limansky, A.S., Mussi, M.A., Viale, A.M. 2002. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. J. Clin. Microbiol., 40:4776–4778.

Lin, M.F., Lan, C.Y. 2014. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. World J. Clin. Cases, 2(12):787-814.

Lin, S.H., Chen,W.P., Kuo, T.T. 2001. Mechanism of host cell death induced by infection of *Escherichia coli* with the c2 clear-plaque mutant of phage f1. Bot. Bull. Acad. Sin. 42, 45–52.

Lockhart, S.R., Abramson, M.A., Beekmann, S.E., Gallagher, G., Riedel, S., Diekema, D.J., Quinn, J.P., Doern, G.V. 2007. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. J. Clin. Microbiol. 45(10):3352-9.

Loh, B.,Kuhn, A., Leptihn,S. 2019. The fascinating biology behind phage display: Filamentous phage assembly. Mol. Microbiol. 111,1132–1138.

Lopez, J., Webster, R.E. 1983. Morphogenesis of filamentous bacteriophage f1: orientation of extrusion and production of polyphage. Virology. 127(1):177-93.

Lu, T.K., Collins, J.J. 2007. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.104(27):11197-202.

Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., 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., Monnet, D.L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Inf. 18(3):268-281.

Makałowski, W., Gotea, V., Pande, A., Makałowska,I. 2019. Transposable Elements: Classification, Identification, and Their Use As a Tool For Comparative Genomics. MethodsMol.Biol. 1910,177–207.

Marciano, D.K., Russel, M., Simon, S.M. 1999. An aqueous channel for filamentous phage export. Science. 284,1516-1519.

Marti, S. Sanchez-Cespedes, J., Oliveira, E., Bellido, D., Giralt, E., Vila, J. 2006. Proteomic analysis of a fraction enriched in cell envelope proteins of *Acinetobacter baumannii*. Proteomics. 6 Suppl 1. S82-7.

May, T., Tsuruta, K., Okabe,S. 2011. Exposure of conjugative plasmid carrying *Escherichia coli* biofilms to male-specific bacteriophages. ISME J. 5,771–775.

McConnell, M.J., Actis, L., Pachón,J.*2013. Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol. Rev. 37,130–155.

Mhamedi, I., Hassaine, H., Bellifa, S., Lachachi, M., Terki, I. K., Djeribi, R. 2014. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* isolated from medical devices at the intensive care unit of the University Hospital of Tlemcen (Algeria). Afr.J. Microbiol. Res. 8(3):270-276.

Michel, B., Zinder, N.D. 1989. Translational repression in bacteriophage f1: characterization of the gene V protein target on the gene II mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 4002- 4006.

Monem, S., Furmanek-Blaszk, B., Łupkowska, A., Kuczyńska-Wiśnik, D., Stojowska-Swędrzyńska, K., Laskowska, E. 2020. Mechanisms Protecting *Acinetobacter baumannii* against Multiple Stresses Triggered by the Host Immune Response, Antibiotics and Outside-Host Environment. Int. J. Mol. Sci. 21(15):5498.

Moon, D. C., Choi, C. H., Lee, J. H., Choi, C.-W., Kim, H.-Y., Park, J. S., Kim, S.I., Lee, J.C. 2012. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein a modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. J. Microbiol. 50, 155–160.

Moon,J.S., Kim, W.G., Kim, C., Park, G.T., Heo, J., Yoo, S.Y., Oh, J.W. 2015. M13 Bacteriophage-Based Self-Assembly Structures and Their Functional Capabilities. Mini Rev. Org. Chem. 12,271–281.

Morris Faye, C. , Dexter, C., Kostoulias, X., Uddin Muhammad, I., Peleg Anton Y. 2019. The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. Front. Microbiol. 10.

Müller, M.G., Ing, J.Y., Cheng, M.K., Flitter, B.A., Moe, G.R. 2013. Identification of a phage-encoded Ig-binding protein from invasive *Neisseria meningitidis*. J. Immunol. 191,3287–3296.

Neilands, J.B. 1995. Siderophores: Strusture and function of microbial iron transport compounds. J. Biol. Chem. 270:26732-26726.

Nemec, A.., Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Brisse, S., Higgins, P.G. 2015. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65(Pt 3):934-942.

Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T.J., Deschaght, P., Passet, V., Vaneechoutte, M., Brisse, S., Dijkshoorn, L. 2011. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobactercalcoaceticus-Acinetobacterbaumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Res Microbiol. 162(4):393-404.

Nemec, A., De Baere T., Tjernberg I., Vaneechoutte M., van der Reijden T.J., Dijkshoorn, L. 2001. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1891–1899.

Nguyen, M., Joshi, S.G. 2021. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*, and their importance in hospital-acquired infections: a scientific review. J. Appl. Microbiol.131(6):2715-2738.

Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67(4):593-656.

Nowak, A., Kur, J. 1996. Differentiation of seventeen genospecies of *Acinetobacter* by multiplex polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Mol. Cell Probes. 10(6):405-11.

Oh, J.H., Lin, X.B., Zhang, S., Tollenaar, S.L., Özçam, M., Dunphy, C., Walter, J., van Pijkeren, J.P. 2019. Prophages in *Lactobacillus reuteri* Are Associated with Fitness Trade-Offs but Can Increase Competitiveness in the Gut Ecosystem. Appl Environ Microbiol. 13;86(1):e01922-19.

OlygoAnalyzerTool. Available on line: https://www.idtdna.com/calc/analyzer.

Shree, P., Singh, C.K., Sodhi, K.K., Surya, J.N., Singh, D.K. 2023. Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. Med. Microecology, 16 ,100084.

Parsek, M.R., Singh, P.K. 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annu. Rev. Microbiol. 57:677-701.

Peleg, A.J., Seifert, H., Paterson, D.L. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful Pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 21(3):538-582.

Poirel, L., Bonnin, R.A., Nordmann, P. 2011. Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. Crit. Rev. 63(12):1061–1067.

Pour, N.K., Dusane, D.H., Dhakephalkar, P.K., Zamin, F.R., Zinjarde,S.S., Chopade,B.A. 2011. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. FEMS Immunol. Med. Microbiol.62,328–338.

Pourtois, J.D., Kratochvil, M.J., Chen, Q., Haddock, N.L., Burgener, E.B., De Leo, G.A., Bollyky, P.L. 2021. Filamentous Bacteriophages and the Competitive Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* Strains under Antibiotic Treatment: a Modeling Study. mSystems. 6(3):e0019321.

Powers, M.J., Trent, M.S. 2018. Phospholipid retention in the absence of asymmetry strengthens the outer membrane permeability barrier to last-resort antibiotics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.115(36):E8518-E8527.

Prashanth, K., Vasanth, T., Saranathan, R., Makki, A.R., Pagal, S. 2012. Antibiotic resistance, biofilms and quorum sensing in *Acinetobacter* species, Chapter 8; in: Pana, M. (ed.), Antibiotic Resistant Bacteria - A Continuous Challenge in the New Millennium, InTech, 179-212.

Rakonjac, J., Feng, J.N., Model, P. 1999. Filamentous phage are released from the bacterial membrane by a twostep mechanism involving a short C-terminal fragment of pIII. J. Mol. Biol. 289, 1253-1265.

Rakonjac, J., Model, P. 1998. The roles of pIII in filamentous phage assembly. J. Mol. Biol. 282, 25-41.

Rice, S., Tan, C., Mikkelsen,P. 2009. The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. ISME J. 3,271–282.

Richter, A., Feßler, A.T., Böttner, A., Köper, L.M., Wallmann, J., Schwarz, S.2020. Reasons for antimicrobial treatment failures and predictive value of *in-vitro* susceptibility testing in veterinary practice: an overview. Vet. Microbiol. 245:108694.

Rickard, A. H., McBain, A. J., Stead, A. T., Gilbert, P. 2004. Shear rate moderates community diversity in freshwater biofilms. Appll. Environ. Microbiol. 70:7426-7435.

Roca, I., Espinal, P., Vila-Farrés, X., Vila, J. 2012. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. Front. Microbiol. 3:148-178.

Romeo, T. 2008. Bacterial biofilms, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Roux, S., Adriaenssens, E.M., Dutilh, B.E., Koonin, E.V., Kropinski, A.M., Krupovic,M., Kuhn, J.H., Lavigne, R., Brister, J.R., Varsani, A., i sar. 2019. Minimum Information about an Uncultivated Virus Genome (MIUViG). Nat. Biotechnol. 37,29–37.

Ruiz, M., Marti S., Fernandez-Cuenca F., Pascual A., Vila J. 2007. Prevalence of IS(Aba1) in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. FEMS Microbiol. Lett. 274:63–66.

Sahl, J.W., Johnson, J.K., Harris, A.D., Phillippy, A.M., Hsiao, W.W., Thom, K.A., Rasko, D.A. 2011. Genomic comparison of multi-drug resistant invasive and colonizing *Acinetobacter baumannii* isolated from diverse human body sites reveals genomic plasticity. BMC Genom. 12:291.

Sambrook, J., Russell, D.W. 2006. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. CSH Protoc. 2006(1):pdb.prot4455.

Sambrook, J., Russell, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA.

Schmidt, A.K., Fitzpatrick, A.D., Schwartzkopf, C.M., Faith, D.R., Jennings, L.K., Coluccio, A., Hunt, D.J., Michaels, L.A., Hargil, A., Chen, Q., Bollyky, P., Dorward, D.W., Wachter, J., Rosa, P.A., Maxwell, K., Secor, P. 2022. A Filamentous Bacteriophage Protein Inhibits Type IV Pili To Prevent Superinfection of *Pseudomonas aeruginosa*. mBio 13,e0244121.

Secor, P., Michaels, L., Smigiel, K., Rohani, M., Jennings, L., Hisert, K., Arrigoni, A., Braun, K., Birkland, T., Lai, Y., Hallstran, T.S., Bollyky, P.L., Singh, P.K., Parks, W.C. 2016. Filamentous Bacteriophage Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Alters the Inflammatory Response and Promotes Non invasive Infection *In Vivo*. Infect. Immun. 85,e00648-16.

Secor, P.R., Sweere, J.M., Michaels, L.A., Malkovskiy, A.V., Lazzareschi, D., Katznelson, E., Rajadas, J., Birnbaum, M.E., Arrigoni, A., Braun,K.R. 2015. Filamentous bacteriophage promote biofilm assembly and function. Cell Host Microbe 18,549–559.

Sequence Manipulation Suite. Available on line: http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html

SignalP5.0Server.Availableonline:https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/

Siguier, P., Gourbeyre, E., Chandler,M. 2014. Bacterial insertion sequences:Their genomic impact and diversity. FEMS Microbiol. Rev. 38,865–891.

Simpson, B.W., Nieckarz, M., Pinedo, V., McLean, A.B., Cava, F., Trent, M.S. 2021. *Acinetobacter baumannii* Can Survive with an Outer Membrane Lacking Lipooligosaccharide Due to Structural Support from Elongasome Peptidoglycan Synthesis. mBio. 12(6):e0309921.

Singh, J.K., Adams, F.G., Brown, M.H. 2018. Diversity and Function of Capsular Polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. Front. Microbiol. 9:3301.

Smani, Y., Fàbrega, A., Roca, I., Sánchez-Encinales, V., Vila, J., Pachón, J. 2014. Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 58(3):1806-8.

Smani, Y., McConnell, M.J., Pachón, J. 2012. Role of Fibronectin in the Adhesion of *Acinetobacter baumannii* to Host Cells. PLOS ONE 7(4): e33073.

Smani, Y., Dominguez-Herrera J., Pachón J. 2013. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. J. Infect. Dis. 208:1561–1570.

Smith, M.G., Gianoulis, T.A., Pukatzki, S., Mekalanos, J.J., Ornston, L.N., Gerstein, M., Snyder, M. 2007. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. Genes Dev. 21:601–614.

Songer, J.G. 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. Trends Microbiol. 5(4), 156-161.

Soo, P.C., Tseng, C.C., Ling, S.R., Liou, M.L., Liu, C.C., Chao, H.J., Lin, T.Y.,Chang, K.C. 2013. Rapid and sensitive detection of *Acinetobacter baumannii* using loop-mediated isothermal amplification. J. Microbiol. Met. 92(2):197-200.

Srinivasan, V.B., Rajamohan, G., Gebreyes, W.A. 2009. Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacterbaumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 53(12):5312-6.

Stahl, J., Bergmann, H., Göttig, S., Ebersberger, I., Averhoff, B. 2015. *Acinetobacter baumannii* Virulence Is Mediated by the Concerted Action of Three Phospholipases D. PLOS ONE 10(9): e0138360.

Henz, S.R., Huson, D.H., Auch, A.F., Nieselt-Struwe, K., Schuster, S.C. 2005. Whole-genome prokaryotic phylogeny, Bioinformatics. 21(10), 2329–2335.

Su, X.Z., Chen, J., Mizushima, T., Kuroda, T., Tsuchiya, T. 2005. AbeM, an H+-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. Antimicrob. Agents Chemother. 49(10):4362-4.

Tomaras, A.P., Dorsey, C.W., Edelmann, R.E., Actis, L.A. 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. Microbiol. 149(12):3473-3484.

Towner, K. 2006. Prokaryotes, Chapter 3.3.25.: The genus *Acinetobacter*, Springer 6: 746-758.

Traglia, G.M., Vilacoba, E., Almuzara, M., Diana, L., Iriarte, A., Centrón, D., Ramírez, M.S. 2014. Draft Genome Sequence of an Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Indigo-Pigmented Strain. Gen. Announc. 2(6):e01146-14.

Traglia, G.M., Quinn, B., Schramm, S.T., Soler-Bistue, A., Ramirez, M.S. 2016. Serum Albumin and Ca2+ Are Natural Competence Inducers in the Human Pathogen *Acinetobacterbaumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 60(8):4920-9.

Trucksis, M., Galen, J.E., Michalski, J., Fasano, A., Kaper,J.B. 1993. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90,5267–5271.

Turton, J.F., Kaufmann, M.E., Gill, M.J., Pike, R., Scott, P.T., Fishbain, J., Craft, D., Deye, G., Riddel, S., Lindller, L.E., Pitt, T.L.. 2006. Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. J. Clin. Microbiol. 44:2630–4.

Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., de Vos, P., Claeys, G., Verschaergen, G. 1995. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. J. Clin. Microbiol. 33:11–5.

Vaneechoutte, M., Elaichouni, A., Maquelin, K., Claeys, G., Van Liedekerke, A., Louagie, H., Verschraegen, G., Dijkshoorn, L. 1995. Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction and cell envelope protein electrophoresis for analysis of *Acinetobacter baumannii* and *A. junii* outbreaks. Res.Microbiol. 146:457–465.

Vashist, J., Tiwari,V., Das, R., Kapil, A., Rajeswari, M.R. 2011. Analysis of penicillin-binding proteins (PBPs) in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. Indian J. Med. Res. 133,332–338.

Vijayakumar, S., Mathur, P., Kapil, A., Das, B.K., Ray, P., Gautam, V., Sistla, S., Parija, S.C., Walia, K., Ohri, V.C., Anandan, S., Subramani, K., Ramya, I., Veeraraghavan, B. 2014. Molecular characterization & epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* collected across India. Ind. J. Med. Res., 149(2):240-246.

Vijayakumar, S., Rajenderan, S., Laishram, S., Anandan, S., Balaji, V., Biswas,I. 2016. Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. Front. Public Health. 4,105.

Vila, J., Pachon, J. 2008. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections. Exp. Op. Pharmacother. 9:587-599.

Vila, J., Ruiz, J., Goni P., Marcos, A., de Anta, T.J. 1995. Mutation in the gyrA gene of quinolone-reistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 39:1201-1203.

Waldor, M.K., Mekalanos,J.J. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science 272,1910–1914.

Wan, Z., Goddard,N. 2012. Competition Between Conjugation and M13 Phage Infection in *Escherichia coli* in the Absence of Selection Pressure: A Kinetic Study.G3. 2,1137–1144.

Wang, J., Ruan, Z., Feng, Y., Fu, Y., Jiang, Y., Wang, H., Yunsong, Y. 2014. Species Distribution of Clinical *Acinetobacter* Isolates Revealed by Different Identification Techniques. PLoS ONE 9(8): e104882.

Wang, Q., Kan, B., Wang,R. 2013. Isolation and characterization of the new mosaic filamentous phage VFJΦ of *Vibrio cholerae*. PLoS ONE. 8,e70934.

Wang, S.H., Sheng, W.H., Chang, Y.Y., Wang, L.H., Lin,H.C., Chen, M.L., Pan, H.J., Ko,W.J., Chang, S.C., Lin,F.J. 2003. Healthcare-associated outbreak due to pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a surgical intensive care unit. J. Hosp. Inf. 53,97–102.

Webb, J.S., Thompson, L.S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., Kjelleberg,S. 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. J. Bacteriol. 185,4585–4592.

WebCutter.Available online: https://heimanlab.com/cut2.html.

Weber, R., Herold, C., Hollert, H., Kamphues, J., Ungemach, L., Blepp, M., Ballschmiter, K. 2018. Life cycle of PCBs and contamination of the environment and of food products from animal origin. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 25.

Weber, B.S., Harding, C.M., Feldman,M.F. 2016. Pathogenic *Acinetobacter*: From the cell surface to infinity and beyond. J. Bacteriol.198,880–887.

Wendling, C.C., Refardt, D., Hall, A.R. 2021. Fitness benefits to bacteria of carrying prophages and prophage-encoded antibiotic-resistance genes peak in different environments. Evolution. 75(2):515-528.

Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory,S., Greenberg,E.P. 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.Nature 413,860–864.

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., Bruce, J.E. 2016. *In vivo* protein interaction network analysis reveals porin-localized antibiotic inactivation in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. Nat Commun. 7:13414.

Yamada, T., Kawasaki, T., Nagata, S., Fujiwara, A., Usami, S., Fujie, M. 2007. New bacteriophages that infect the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. Microbiology153,2630–2639.

Yamada,T. 2013. Filamentous phages of *Ralstonia solanacearum*: Double-edgeds words for pathogenic bacteria. Front. Microbiol. 4,325.

Yang, C.H., Su, P.W., Moi, S.H., Chuang,L.Y. 2019. BiofilmFormationin *Acinetobacter baumannii*: Genotype-Phenotype Correlation. Molecules 24,1849.

Yu, Z.C., Chen, X.L., Shen, Q.T., Zhao, D.L., Tang, B.L., Su, H.N., Zhang, Y.Z. 2015. Filamentous phages prevalent in *Pseudoalteromonas* spp. confer properties advantageous to host survival in Arctic sea ice. ISME J.9,871–881.

9. PRILOZI

Prilog 1A. Matriks tabele aminokiselinskih sekvenci Zot proteina predstavnika svake definisane grupe faga

1A.a. Matriks tabela Zot proteina predstavnika A grupe

A grupa	Partl. A. baumannii	280820	280820	280820	7804	A1296	A388	AB169-VUB	AB177-VUB	AB186-VUB	AB736	ABF9692	AC1633	AC1633	ACN21	ATCC17961	ATCC19606	CI300	CIP70.10	DETAB-P2	DTD544C	KSK Sens.	LMG994	OCO64	R2091	VB280821	VB280821
Partl. A. baumannii	100	87.4	87.4	87.4	87.4	87.4	87.4	91.1	87.1	87.1	100	87.1	87.4	87.4	87.1	100	100	87.1	87.4	87.4	87.4	87.4	92.2	87.4	87.4	87.4	87.4
280820	83.8	100	100	100	100	100	100	92.4	99.7	99.7	83.8	99.4	100	100	99.7	83.8	83.8	99.7	100	100	99.7	99.7	90.2	100	100	100	100
280820	83.8	100	100	100	100	100	100	92.4	99.7	99.7	83.8	99.4	100	100	99.7	83.8	83.8	99.7	100	100	99.7	99.7	90.2	100	100	100	100
280820	83.8	100	100	100	100	100	100	92.4	99.7	99.7	83.8	99.4	100	100	99.7	83.8	83.8	99.7	100	100	99.7	99.7	90.2	100	100	100	100
7804	83.8	100	100	100	100	100	100	92.4	99.7	99.7	83.8	99.4	100	100	99.7	83.8	83.8	99.7	100	100	99.7	99.7	90.2	100	100	100	100
A1296	83.8	100	100	100	100	100	100	92.4	99.7	99.7	83.8	99.4	100	100	99.7	83.8	83.8	99.7	100	100	99.7	99.7	90.2	100	100	100	100
A388	83.8	100	100	100	100	100	100	92.4	99.7	99.7	83.8	99.4	100	100	99.7	83.8	83.8	99.7	100	100	99.7	99.7	90.2	100	100	100	100
AB169-VUB	91.1	92.4	92.4	92.4	92.4	92.4	92.4	100	92.1	92.1	91.1	92.4	92.4	92.4	92.1	91.1	91.1	92.1	92.4	92.4	92.7	92.7	84.6	92.4	92.4	92.4	92.4
AB177-VUB	83.6	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	92.1	100	100	83.6	99.2	99.7	99.7	100	83.6	83.6	100	99.7	99.7	99.4	99.4	90	99.7	99.7	99.7	99.7
AB186-VUB	83.6	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	92.1	100	100	83.6	99.2	99.7	99.7	100	83.6	83.6	100	99.7	99.7	99.4	99.4	90	99.7	99.7	99.7	99.7
AB736	100	87.4	87.4	87.4	87.4	87.4	87.4	91.1	87.1	87.1	100	87.1	87.4	87.4	87.1	100	100	87.1	87.4	87.4	87.4	87.4	92.2	87.4	87.4	87.4	87.4
ABF9692	83.8	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	92.4	99.2	99.2	83.8	100	99.4	99.4	99.2	83.8	83.8	99.2	99.4	99.4	99.7	99.7	90	99.4	99.4	99.4	99.4
AC1633	83.8	100	100	100	100	100	100	92.4	99.7	99.7	83.8	99.4	100	100	99.7	83.8	83.8	99.7	100	100	99.7	99.7	90.2	100	100	100	100
AC1633	83.8	100	100	100	100	100	100	92.4	99.7	99.7	83.8	99.4	100	100	99.7	83.8	83.8	99.7	100	100	99.7	99.7	90.2	100	100	100	100
ACN21	83.6	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	92.1	100	100	83.6	99.2	99.7	99.7	100	83.6	83.6	100	99.7	99.7	99.4	99.4	90	99.7	99.7	99.7	99.7

ATCC17961	100	87.4	87.4	87.4	87.4	87.4	87.4	91.1	87.1	87.1	100	87.1	87.4	87.4	87.1	100	100	87.1	87.4	87.4	87.4	87.4	92.2	87.4	87.4	87.4	87.4
ATCC19606	100	87.4	87.4	87.4	87.4	87.4	87.4	91.1	87.1	87.1	100	87.1	87.4	87.4	87.1	100	100	87.1	87.4	87.4	87.4	87.4	92.2	87.4	87.4	87.4	87.4
CI300	83.6	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	92.1	100	100	83.6	99.2	99.7	99.7	100	83.6	83.6	100	99.7	99.7	99.4	99.4	90	99.7	99.7	99.7	99.7
CIP70.10	83.8	100	100	100	100	100	100	92.4	99.7	99.7	83.8	99.4	100	100	99.7	83.8	83.8	99.7	100	100	99.7	99.7	90.2	100	100	100	100
DETAB-P2	83.8	100	100	100	100	100	100	92.4	99.7	99.7	83.8	99.4	100	100	99.7	83.8	83.8	99.7	100	100	99.7	99.7	90.2	100	100	100	100
DT0544C	83.8	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	92.7	99.4	99.4	83.8	99.7	99.7	99.7	99.4	83.8	83.8	99.4	99.7	99.7	100	100	90.2	99.7	99.7	99.7	99.7
KSK Sens.	83.8	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	92.7	99.4	99.4	83.8	99.7	99.7	99.7	99.4	83.8	83.8	99.4	99.7	99.7	100	100	90.2	99.7	99.7	99.7	99.7
LMG994	92.2	94	94	94	94	94	94	88.2	93.8	93.8	92.2	93.8	94	94	93.8	92.2	92.2	93.8	94	94	94.1	94.1	100	94	94	94	94
OCO64	83.8	100	100	100	100	100	100	92.4	99.7	99.7	83.8	99.4	100	100	99.7	83.8	83.8	99.7	100	100	99.7	99.7	90.2	100	100	100	100
R2091	83.8	100	100	100	100	100	100	92.4	99.7	99.7	83.8	99.4	100	100	99.7	83.8	83.8	99.7	100	100	99.7	99.7	90.2	100	100	100	100
VB280821	83.8	100	100	100	100	100	100	92.4	99.7	99.7	83.8	99.4	100	100	99.7	83.8	83.8	99.7	100	100	99.7	99.7	90.2	100	100	100	100
VB280821	83.8	100	100	100	100	100	100	92.4	99.7	99.7	83.8	99.4	100	100	99.7	83.8	83.8	99.7	100	100	99.7	99.7	90.2	100	100	100	100

1A.b. Matriks tabela Zot proteina predstavnika B grupe

B grupa	XH1344	UC23022	UC21460	NY13623	NCTC7364	NCTC7364	LMG944	ATCC BAA1790	ATCC17978	ATCC17978	ATCC17978	ATCC17978	AR_0070	AR_0052	AbH120-A2	AB030	Ab-D10a-a	Ab-C63	Ab-B004d-c	810CP
XH1344	100	98	98	94.3	76	76	85.3	94.3	99.8	99.8	99.8	99.8	86.3	86.3	85.6	94.3	94.3	97.3	90.9	97.5
UC23022	96.1	100	100	97.8	73.4	73.4	87.5	97.8	98.3	98.3	98.3	98.3	88.5	88.5	87.7	97.8	97.8	97.3	94.4	99.3
UC21460	96.1	100	100	97.8	73.4	73.4	85.7	97.8	98.3	98.3	98.3	98.3	88.5	88.5	87.7	97.8	97.8	97.3	94.4	99.3
NY13623	94.1	97.8	97.8	100	77.1	77.1	86.5	100	96.3	96.3	96.3	96.3	87	87	87.2	100	100	95.5	93.6	97.5
NCTC7364	70.6	71.7	71.7	72.4	100	100	78.7	72.4	71.4	71.4	71.4	71.4	79.2	79.2	78.2	72.4	72.4	71.2	70.3	71.2
NCTC7364	70.6	71.7	71.7	72.4	100	100	78.7	72.4	71.4	71.4	71.4	71.4	79.2	79.2	78.2	72.4	72.4	71.2	70.3	71.2
LMG944	85.2	87.5	87.5	86.5	83.6	83.6	100	86.5	87.3	87.3	87.3	87.3	97.1	97.1	98.3	86.5	86.5	86.5	85.8	87
ATCC BAA1790	94.1	97.8	97.8	100	77.1	77.1	86.5	100	96.3	96.3	96.3	96.3	87	87	87.2	100	100	95.5	93.6	97.5

ATCC17978	97.8	98.3	98.3	96.3	76	76	87.2	96.3	100	100	100	100	88.2	88.2	87.5	96.3	96.3	97.5	92.9	97.8
ATCC17978	97.8	98.3	98.3	96.3	76	76	87.2	96.3	100	100	100	100	88.2	88.2	87.5	96.3	96.3	97.5	92.9	97.8
ATCC17978	97.8	98.3	98.3	96.3	76	76	87.2	96.3	100	100	100	100	88.2	88.2	87.5	96.3	96.3	97.5	92.9	97.8
ATCC17978	97.8	98.3	98.3	96.3	76	76	87.2	96.3	100	100	100	100	88.2	88.2	87.5	96.3	96.3	97.5	92.9	97.8
AR_0070	86.2	88.5	88.5	87	84.1	84.1	97.1	87	88.2	88.2	88.2	88.2	100	100	98.3	87	87	87.8	87.8	88
AR_0052	86.2	88.5	88.5	87	84.1	84.1	97.1	87	88.2	88.2	88.2	88.2	100	100	98.3	87	87	87.8	87.8	88
AbH120-A2	85.5	87.7	87.7	87.2	83.1	83.1	98.3	87.2	87.5	87.5	87.5	87.5	98.3	98.3	100	87.2	87.2	86.5	86.5	87.2
AB030	94.1	97.8	97.8	100	77.1	77.1	86.5	100	96.3	96.3	96.3	96.3	87	87	87.2	100	100	95.5	93.6	97.5
Ab-D10a-a	90.8	93.4	93.4	92.6	76	76	84.8	92.6	92	92	92	92	86.8	86.8	85.6	92.6	92.6	92	99	93.1
Ab-C63	95.6	97.3	97.3	95.5	75.9	75.9	86.5	95.5	97.5	97.5	97.5	97.5	87.8	87.8	86.5	95.5	95.5	100	92.9	97.3
Ab-B004d-c	90.8	94.4	94.4	93.6	76	76	85.8	93.6	92.9	92.9	92.9	92.9	87.7	87.7	86.5	93.6	93.6	92.9	100	94.1
810CP	95.6	99.3	99.3	97.5	75.9	75.9	87	97.5	97.8	97.8	97.8	97.8	88	88	87.3	97.5	97.5	97.3	94.1	100

1A.c. Matriks tabela Zot proteina predstavnika C grupe

C grupa	AB5075-VUB 003	AB5075-VUB 003	AB5075-VUB 003	AB5075-VUB 003	A388	A85	AB0057	AB0057	AB0057	AB0057	AB0057	AB322	AB43	AB5057-UW	AB505-UW	AB505-UW	AB6870155	AB6870155	AB6870155	AR_0083	AYE	AYE	B8342	D36	D36	DA33382	FDAARGOS_1036	FDAARGOS_540	FDAARGOS_540	NCTC13421	OC074	OC081	UC22850	USA15	VB2486	WCHAB005078	WP4-W18-ESBL-11	AB169-VUB
AB5075-VUB 003	100	100	100	100	99.8	88.7	88.7	88.7	88.7	88.7	98.8	98.8	88.4	100	100	100	88.7	88.7	88.7	89	98.1	98.6	84.1	99.8	99.8	98.1	88.7	84.4	80.8	88.7	88.1	98.1	98.8	88.7	99.8	98.6	95.2	99
AB5075-VUB 996	100	100	100	100	99.8	88.7	88.7	88.7	88.7	88.7	98.8	98.8	88.4	100	100	100	88.7	88.7	88.7	89	98.1	98.6	84.1	99.8	99.8	98.1	88.7	84.4	80.8	88.7	88.1	98.1	98.8	88.7	99.8	98.6	95.2	99
AB5075-VUB 988	100	100	100	100	99.8	88.7	88.7	88.7	88.7	88.7	98.8	98.8	88.4	100	100	100	88.7	88.7	88.7	89	98.1	98.6	84.1	99.8	99.8	98.1	88.7	84.4	80.8	88.7	88.1	98.1	98.8	88.7	99.8	98.6	95.2	99
AB5075-VUB 980	100	100	100	100	99.8	88.7	88.7	88.7	88.7	88.7	98.8	98.8	88.4	100	100	100	88.7	88.7	88.7	89	98.1	98.6	84.1	99.8	99.8	98.1	88.7	84.4	80.8	88.7	88.1	98.1	98.8	88.7	99.8	98.6	95.2	99
A388	99.8	99.8	99.8	99.8	100	88.4	88.4	88.4	88.4	88.4	98.6	98.6	88.1	99.8	99.8	99.8	88.4	88.4	88.4	89	97.8	98.3	83.8	100	100	97.8	88.4	84.1	80.6	88.4	87.9	97.8	98.6	88.4	100	98.3	94.9	98.6

A85	83.9	83.9	83.9	83.9	83.7	100	100	100	100	100	84.9	84.4	99.7	83.9	83.9	83.9	100	100	100	99.2	83.7	83.9	93.8	83.7	83.7	83.7	100	86.4	80.1	100	99.5	83.7	84.4	100	83.7	84.2	82.6	99
AB0057	83.9	83.9	83.9	83.9	83.7	100	100	100	100	100	84.9	84.4	99.7	83.9	83.9	83.9	100	100	100	99.2	83.7	83.9	93.8	83.7	83.7	83.7	100	86.4	80.1	100	99.5	83.7	84.4	100	83.7	84.2	82.6	99
AB0057	83.9	83.9	83.9	83.9	83.7	100	100	100	100	100	84.9	84.4	99.7	83.9	83.9	83.9	100	100	100	99.2	83.7	83.9	93.8	83.7	83.7	83.7	100	86.4	80.1	100	99.5	83.7	84.4	100	83.7	84.2	82.6	99
AB0057	83.9	83.9	83.9	83.9	83.7	100	100	100	100	100	84.9	84.4	99.7	83.9	83.9	83.9	100	100	100	99.2	83.7	83.9	93.8	83.7	83.7	83.7	100	86.4	80.1	100	99.5	83.7	84.4	100	83.7	84.2	82.6	99
AB0057	83.9	83.9	83.9	83.9	83.7	100	100	100	100	100	84.9	84.4	99.7	83.9	83.9	83.9	100	100	100	99.2	83.7	83.9	93.8	83.7	83.7	83.7	100	86.4	80.1	100	99.5	83.7	84.4	100	83.7	84.2	82.6	99
AB0057	99.8	99.8	99.8	99.8	98.5	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	100	99.5	89.4	99.8	99.8	99.8	89.7	89.7	89.7	89.8	98.3	98.8	84.8	98.5	98.5	98.3	89.7	84.6	81	89.7	89.2	98.3	99.5	89.7	98.5	99.3	95.4	99
AB322	99.8	99.8	99.8	99.8	98.5	89.2	89.2	89.2	89.2	89.2	99.5	100	88.9	99.8	99.8	99.8	89.2	89.2	89.2	89.2	98.8	98.8	84.8	98.5	98.5	98.8	89.2	84.1	80.6	89.2	88.7	98.8	100	89.2	98.5	99.8	95.4	99
AB43	83.7	83.7	83.7	83.7	83.5	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	84.7	84.2	100	83.7	83.7	83.7	99.7	99.7	99.7	98.9	83.5	83.7	93.6	83.5	83.5	83.5	99.7	86.4	80.1	99.7	99.7	83.5	84.2	99.7	83.5	83.9	82.4	99
AB5057-UW	100	100	100	100	99.8	88.7	88.7	88.7	88.7	88.7	98.8	98.8	84.4	100	100	100	88.7	88.7	88.7	89	98.1	98.6	84.1	99.8	99.8	98.1	88.7	84.4	80.8	88.7	88.1	98.1	98.8	88.7	99.8	98.6	95.2	99
AB5057-UW	100	100	100	100	99.8	88.7	88.7	88.7	88.7	88.7	98.8	98.8	84.4	100	100	100	88.7	88.7	88.7	89	98.1	98.6	84.1	99.8	99.8	98.1	88.7	84.4	80.8	88.7	88.1	98.1	98.8	88.7	99.8	98.6	95.2	99
AB5057-UW	100	100	100	100	99.8	88.7	88.7	88.7	88.7	88.7	98.8	98.8	84.4	100	100	100	88.7	88.7	88.7	89	98.1	98.6	84.1	99.8	99.8	98.1	88.7	84.4	80.8	88.7	88.1	98.1	98.8	88.7	99.8	98.6	95.2	99
AB68701 55	83.9	83.9	83.9	83.9	83.7	100	100	100	100	100	84.9	84.4	99.7	83.9	83.9	83.9	100	100	100	99.2	83.7	83.9	93.8	83.7	83.7	83.7	100	86.4	80.1	100	99.5	83.7	84.4	100	83.7	84.2	82.6	99
AB68701 55	83.9	83.9	83.9	83.9	83.7	100	100	100	100	100	84.9	84.4	99.7	83.9	83.9	83.9	100	100	100	99.2	83.7	83.9	93.8	83.7	83.7	83.7	100	86.4	80.1	100	99.5	83.7	84.4	100	83.7	84.2	82.6	99
AB68701 55	83.9	83.9	83.9	83.9	83.7	100	100	100	100	100	84.9	84.4	99.7	83.9	83.9	83.9	100	100	100	99.2	83.7	83.9	93.8	83.7	83.7	83.7	100	86.4	80.1	100	99.5	83.7	84.4	100	83.7	84.2	82.6	99
AR_0083	79.7	79.7	79.7	79.7	79.7	94.2	94.2	94.2	94.2	94.2	80.4	79.9	94	79.7	79.7	79.7	94.2	94.2	94.2	100	79.7	79.7	88.9	79.7	79.7	79.7	94.2	82.1	75.9	94.2	93.7	79.7	79.9	94.2	79.7	79.8	79.6	91.6

| | | |

| | | |

A85	100	100	99	92.8	92.3	100	99	99	99	100
AB0057	99	99	100	93.1	92.6	99	100	100	100	99
AB031	92.8	92.8	93.1	100	99.5	92.8	93.1	93.1	93.1	92.8
AB169-VUB	92.3	92.3	92.6	99.5	100	92.3	92.6	92.6	92.6	92.3
AB6870155	100	100	99	92.8	92.3	100	99	99	99	100
ATCC BAA1605	99	99	100	93.1	92.6	99	100	100	100	99
FDAARGOS_1036	99	99	100	93.1	92.6	99	100	100	100	99
NCTC 13421	99	99	100	93.1	92.6	99	100	100	100	99
VB2486	100	100	99	92.8	92.3	100	99	99	99	100

1A.f. Matriks tabela Zot proteina predstavnika F grupe

F grupa	XH858	XH1056	UC23022	UC23022	UC22850	MRSN15313	MRSN15313	AbH120-A2	AB5057-UW	Ab-D10a-a	Ab-B004d-c	17-84	BJAB	AB5075-VUB 541	AB5075-VUB 536	AB5075-VUB 533
XH858	100	100	53.1	53.1	53.1	53.1	53.1	53.4	53.4	57.4	57.4	51.2	100	53.4	38.1	51
XH1056	100	100	53.1	53.1	53.1	53.1	53.1	53.4	53.4	57.4	57.4	51.2	100	53.4	38.1	51
UC23022	51.3	51.3	100	100	100	100	100	95.6	95.6	76.2	76.2	77.2	51.3	95.6	78.9	95.4
UC23022	51.3	51.3	100	100	100	100	100	95.6	95.6	76.2	76.2	77.2	51.3	95.6	78.9	95.4
UC22850	51.3	51.3	100	100	100	100	100	95.6	95.6	76.2	76.2	77.2	51.3	95.6	78.9	95.4
MRSN15313	51.3	51.3	100	100	100	100	100	95.6	95.6	76.2	76.2	77.2	51.3	95.6	78.9	95.4
MRSN15313	51.3	51.3	100	100	100	100	100	95.6	95.6	76.2	76.2	77.2	51.3	95.6	78.9	95.4
AbH120-A2	51.3	51.3	95.6	95.6	95.6	95.6	95.6	100	100	78.8	78.8	77	51.3	100	83	99.7
AB5057-UW	51.3	51.3	95.6	95.6	95.6	95.6	95.6	100	100	78.8	78.8	77	51.3	100	83	99.7
Ab-D10a-a	57.4	57.4	75.7	75.7	75.7	75.7	75.7	76.2	76.2	100	100	73.5	57.4	76.2	62.7	78.6
Ab-B004d-c	57.4	57.4	75.7	75.7	75.7	75.7	75.7	76.2	76.2	100	100	73.5	57.4	76.2	62.7	78.6
17-84	48.5	48.5	77	77	77	77	77	76.5	76.5	73.6	73.6	100	48.5	76.5	61.2	76.8
BJAB	100	100	53.1	53.1	53.1	53.1	53.1	53.4	53.4	57.4	57.4	51.2	100	53.4	38.1	51

AB5075-VUB 541	51.3	51.3	95.6	95.6	95.6	95.6	95.6	100	100	78.8	78.8	77	51.3	100	83	99.7
AB5075-VUB 536	48.8	48.8	95.1	95.1	95.1	95.1	95.1	100	100	72	72	72.1	48.8	100	100	100
AB5075-VUB 533	53.3	53.3	95.4	95.4	95.4	95.4	95.4	99.7	99.7	76	76	76.3	53.3	99.7	83	100

1A.g. Matriks tabela Zot proteina predstavnika G grupe

G grupa	YC103	VB16141	31FS3-2
YC103	100	24	39.3
VB16141	55.9	100	40.8
31FS3-2	97.2	41.2	100

1A.h. Matriks tabela Zot proteina predstavnika H grupe

H grupa	10_3	10_4 a	10_4 b
10_3	100	100	100
10_4 a	100	100	100
10_4 b	100	100	100

1A.i. Matriks tabela Zot proteina predstavnika I grupe

I grupa	280820	6080	A1429	ABF9692	AC1633	CIP70.10	DETAB-E51	DETAB-P43	R2091	VB280821
280820	100	71.4	69.7	95.3	98.3	98.3	71.4	71.4	98.3	100
6080	49.5	100	73.1	61.4	61.1	61.1	100	100	61.1	71.4
A1429	49.1	73.1	100	59.2	59.5	59.5	73.1	73.1	59.5	69.7
ABF9692	66.4	60.7	57.4	100	97.1	97.1	60.7	60.7	97.1	95.2

AC1633	68.5	60.5	57.6	97.1	100	100	60.5	60.5	100	98.3
CIP70.10	68.5	60.5	57.6	100	100	100	60.5	60.5	100	98.3
DETAB-E51	49.5	100	73.1	61.4	61.1	61.1	100	100	61.1	71.4
DETAB-P43	49.5	100	73.1	61.4	61.1	61.1	100	100	61.1	71.4
R2091	68.5	60.5	57.6	100	100	100	60.5	60.5	100	98.3
VB280821	100	71.4	69.7	95.3	98.3	98.3	71.4	71.4	98.3	100

1A.j. Matriks tabela Zot proteina predstavnika J grupe

J grupa	DSM486	DSM493
DSM486	100.0	100.0
DSM493	100.0	100.0

1A.k. Matriks tabela analiziranih aminokiselinskih sekvenci Zot proteina između grupa

Predstavnici grupa	**3E+05 (A)**	**AB169-VUB (A)**	**ATCC19606 (A)**	**LMG994(A)**	XH1344 (B)	NY13623 (B)	NCTC7364 (B)	LMG944(B)	Ab-D10a-a(B)	A388 (C)	A85(C)	FDAARGOS_540 (C)	FDAARGOS_540 (C)	WP4-W18-FSBLL-11 (D)	NCTC7364(D)	B8300 (D)	XH858 (F)	UC23022 (F)	AbH120-A2 (F)	Ab-D10a-a (F)	17-84 (F)	A85 (E)	**YC103 (G)**	**VB16141 (G)**	**31FS3-2 (G)**	10_3 (H)	**DSM (J)**	**DSM (nesvrstan)**	**LMG944 (nesvrstan)**
280820 (A)	100	92.4	83.8	34.9	34.7	35.7	37.1	34.9	33.7	35.5	39.5	38.6	40.5	30.7	32.1	29.4	21.7	18.9	20.1	23.8	22	38.4	24.3	38.1	28.6	27.7	38.2	36.6	39.4
AB169-VUB (A)	92.4	100	91.1	35.1	34.5	35.1	35.2	35.1	33.3	36.5	39.7	39	40.9	32.5	32.7	31.8	21.8	18.4	19.6	21.5	21.6	39.2	24.3	37.9	29.5	28.8	38.2	37.2	40.9

ATCC19606 (A)	87.4	91.1	100	36.2	35	35.6	34.8	36.2	34.3	35.8	38.4	40	40.7	31.9	31.7	30.4	21.3	23.5	23.3	19.3	26.4	39.7	23.8	38.9	29.7	28.4	40.1	35.5	38.5
LMG994(A)	94.1	88.2	92.2	100	35.6	36.9	37.1	35.9	34.6	35.7	39.8	39.5	40.2	30.6	31.3	29.1	21.7	23.5	20.1	26.1	22	39.3	24.3	39.1	29.3	27.3	39.4	34.4	36.8
XH1344 (B)	37.5	37.3	36.5	37.2	100	94.3	76.1	85.3	89.1	37.4	37.9	38.7	37.3	27.7	26	25.3	18.9	18.1	19	18.5	19	35.2	11.3	38.3	29.1	23.8	38.2	31.6	32
NY13623 (B)	38.2	37.6	36.8	38.1	94.1	100	77.1	86.5	90.8	36.5	37	37.2	34.6	28.2	26.6	25.8	19.2	18.1	19	18.5	19.2	34.7	11.3	38.8	28.4	23.5	38.2	32.1	32.7
NCTC7364(B)	38.4	36.5	34.1	36.3	70.6	72.4	100	78.7	68.7	32.4	35	30.5	32.1	24.9	25.3	24.2	19.3	17.7	18.5	18.3	19.8	37.6	10.8	41.9	25.2	32	34	37	33.3
LMG944(B)	37.3	37.6	37.4	35.9	85.2	86.5	83.6	100	83.1	35.4	35.6	36.9	34.3	28.8	27	25.6	17.4	17.7	18.5	18.3	17.5	39.9	10.8	37.9	26.9	27.7	39.5	32.8	32.8
Ab-D10a-a (B)	39.4	36.4	36.2	36.6	90.8	92.6	75	84.8	100	35.7	35.4	37.4	34.5	27.6	26.5	25.8	17.5	17.3	17.9	17.7	17.6	35.3	11.3	37	27.6	22.9	38.1	32.5	32.8

A388 (C)	37.9	38.1	35.8	34.6	35.9	35.8	33.5	34.6	34.2	100	88.4	80.6	84.1	27.7	32.2	33.2	10.8	15.7	16.4	13.4	17.3	31.9	21.6	29.4	28.1	36	37.2	34.2	31.7
A85 (C)	39.5	39.7	39.7	32.6	34.4	34	33	32.6	31.7	83.7	100	80.1	86.4	24.3	24.5	24.7	10.6	13.9	16.1	13.2	17.8	30.6	21.6	29.2	27	36.8	35.2	36.4	33.5
FDAARGOS_540 (C)	40.2	40.6	38.7	36.2	38.7	36.5	30.8	36.2	35.9	81.7	84.8	100	96	27.3	26.7	27.7	10.6	13.4	15.7	13	10.2	27.9	22.7	29.6	33.1	36.3	36.2	36.2	29.8
FDAARGOS_540 (C)	38.4	38.8	36.8	30.4	31.3	30.6	29.1	30.4	29.8	76.1	82.8	87	100	22.3	22.5	22.9	10.6	15	15.7	15.6	10.2	26.6	22.7	28	25.1	34.9	46.6	39.3	31.1
WP4-W18-FSBLL-11 (D)	39.4	42.3	40.7	35.6	33.3	34.2	32	35.6	33.1	33.6	31.6	32.9	30.3	100	93.5	87.9	23.4	13.5	14.1	14	14.3	32.2	17.7	27.6	31.1	32.6	34	29.2	30.4
NCTC7364 (D)	40.8	41.5	38.5	39.4	30.8	32.1	33.6	32.4	31	38.7	31.3	32.2	30.2	92.6	100	90.9	23.7	13.4	14.6	14.4	14.5	31.1	23.1	27.9	30.7	32.9	33.4	30.1	31.3
B8300 (D)	37.5	40	37.1	30.4	29.9	31.7	30.4	30.4	30.4	39.5	31.6	32.2	30.7	86.8	90.9	100	19.7	13.2	14.1	13.1	13.3	32.4	23.1	27.6	31.4	31.8	32.6	30.1	34.3

XH858 (F)	20.3	20.4	30.4	15.1	15.8	16.3	17.3	15.1	14.8	8.5	8.8	7.8	9.3	16.1	16.6	14.3	100	53.1	53.4	57.4	51.2	19.8	0	16.1	0	11.1	19.8	9.4	23.3
UC23022 (F)	16.2	15.8	23.2	14.4	14.2	14.4	14.9	14.4	13.3	13	13	10.6	13.2	11	10.8	10.7	51.3	100	95.6	76.2	77.2	16.3	0	10.4	0	7.2	13.6	6.9	20.3
AbH120-A2 (F)	17.1	16.6	22.5	14.5	14.6	14.9	15.4	14.5	13.8	12.6	13.3	12.1	13.5	11.2	12.2	11.6	51.1	95.6	100	78.8	77	16.7	0	12.4	0	7.2	13.9	6.6	21.1
Ab-D10a-a (F)	24.2	18.8	15.9	25.8	14.5	14.7	15.7	14.8	13.8	10.5	11	10	11.2	11.6	11.9	11.3	57.4	75.7	76.2	100	73.5	16.1	0	10.2	27.9	6.9	17.3	6.6	18.6
17-84 (F)	18.5	16.1	15.9	13.4	14.4	14.8	13.9	13.4	13.2	7	7.4	6.7	7.5	9	9.4	10	48.5	77	76.5	73.6	100	17.4	0	11.4	0	6.8	15.4	6.6	19.6
A85 (E)	40.1	40.9	36.4	33.4	33.7	33.6	37.6	33.4	33.4	33.2	32.3	29.6	29.3	26.5	25.2	27.8	22.7	20	20.8	19.6	22.2	100	23.3	36.7	28.9	30.7	37.1	35.4	31.8
YC103 (G)	11.5	11.5	10.6	4.3	4.5	4.7	4.5	4.3	4.5	9.1	9.6	9.6	10.7	5.5	7.8	7.8	0	0	0	0	0	10.2	100	24	39.3	8.6	6.8	23.3	14.9
VB16141 (G)	39.4	39.1	37.7	35.5	35.5	36.4	42.1	35.5	33.8	28.8	29.8	29.2	30.6	22.1	22.1	21.4	19.6	9.9	12.2	9.6	11.1	36	55.9	100	40.8	32.1	33.6	35.7	31.4

31FS3-2 (G)	28.9	30	28.2	26.5	28.2	27.8	25.6	26.5	26.5	29	27.9	33.8	28.3	25.7	25.3	26.5	0	0	0	0	0	28.1	97.2	41.2	100	25.7	30.7	24.3	29.2
10_3 (H)	27.2	28.9	27.4	25.6	22.9	22.9	31.8	25.6	21.7	34.8	37	35.4	37.3	27	31.7	29.5	15.1	7.4	7.4	7.2	7.1	30.2	21.6	32.1	26.8	100	27.8	31	33.1
DSM (J)	37.3	38.1	40.1	39.4	38.2	38.2	34	39.5	38.1	37.2	35.2	36.2	46.6	34	33.4	32.6	19.8	13.6	13.9	17.3	15.4	37.1	6.8	33.6	30.7	27.8	100	32.8	36.3
DSM (nesvrstan)	29.6	30	30.3	29.3	28.3	28.4	31.5	29	29.4	29.5	29.4	29.8	30.7	30.2	31.5	30.8	4.1	2.9	2.8	2.8	2.8	29.2	7.9	29.8	20.8	27.5	27.2	100	22.2
LMG (nesvrstan)	40.7	42.2	41.5	39.5	35.8	36.1	35.6	36.3	37.1	34.9	34.3	30.1	32.4	40.7	41.2	42.3	21.7	17.3	17.8	15.9	15.9	34.3	7	33.6	31.7	34.4	39.5	29.3	100

Prilog 1B. Matriks tabele aminokiselinskih sekvenci CoaB proteina predstavnika svake definisane grupe faga

1B.a. Matriks tabela CoaB proteina predstavnika A grupe

A grupa	280820a	280820b	280820c	7804	A1296	A388	AB169-VUB	AB177-VUB	AB186-VUB	AB736	ABF9692	AC1633a	AC1633b	ACN21	ATCC17961	ATCC19606	CI300	CIP70.10	DETAB-P2	DTD544C	KSK Sens.	LMG994	OCO64	R2091	VB280821a	VB280821b	PartI.Abaumannii
280820a	100	100	98.7	100	98.7	96.2	70.7	96.2	96.2	70.7	96.2	100	98.7	96.2	70.7	70.7	96.2	98.7	98.7	96.2	96.2	70.7	96.2	98.7	98.7	100	70.7
280820b	100	100	98.7	100	98.7	96.2	70.7	96.2	96.2	70.7	96.2	100	98.7	96.2	70.7	70.7	96.2	98.7	98.7	96.2	96.2	70.7	96.2	98.7	98.7	100	70.7
280820c	98.7	98.7	100	98.7	100	97.4	69.5	94.9	94.9	69.5	97.4	98.7	100	94.9	69.5	69.5	94.9	100	100	97.4	97.4	94.9	97.4	100	100	98.7	69.5
7804	100	100	98.7	100	98.7	96.2	70.7	96.2	96.2	70.7	96.2	100	98.7	96.2	70.7	70.7	96.2	98.7	98.7	96.2	96.2	70.7	96.2	98.7	98.7	100	70.7
A1296	98.7	98.7	100	98.7	100	97.4	69.5	94.9	94.9	69.5	97.4	98.7	100	94.9	69.5	69.5	94.9	100	100	97.4	97.4	94.9	97.4	100	100	98.7	69.5
A388	96.2	96.2	97.4	96.2	97.4	100	68.3	96.2	96.2	68.3	98.7	96.2	97.4	96.2	68.3	68.3	96.2	97.4	97.4	98.7	98.7	96.2	100	97.4	97.4	96.2	68.3
AB169-VUB	70.7	70.7	69.5	70.7	69.5	68.3	100	70.7	70.7	98.8	68.3	70.7	69.5	70.7	98.8	98.8	70.7	69.5	69.5	68.3	68.3	68.3	69.5	69.5	69.5	70.7	98.8
AB177-VUB	96.2	96.2	94.9	96.2	94.9	96.2	70.7	100	100	70.7	97.4	96.2	94.9	100	70.7	70.7	100	94.9	94.9	97.4	97.4	97.4	96.2	94.9	94.9	96.2	70.7
AB186-VUB	96.2	96.2	94.9	96.2	94.9	96.2	70.7	100	100	70.7	97.4	96.2	94.9	100	70.7	70.7	100	94.9	94.9	97.4	97.4	97.4	96.2	94.9	94.9	96.2	70.7
AB736	70.7	70.7	69.5	70.7	69.5	68.3	98.8	70.7	70.7	100	68.3	70.7	69.5	70.7	100	100	70.7	69.5	69.5	68.3	68.3	68.3	68.3	69.5	69.5	70.7	100
ABF9692	96.2	96.2	97.4	96.2	97.4	98.7	68.3	97.4	97.4	68.3	100	96.2	97.4	97.4	68.3	68.3	97.4	97.4	97.4	100	100	97.4	98.7	97.4	97.4	96.2	68.3
AC1633a	100	100	98.7	100	98.7	96.2	69.2	96.2	96.2	70.7	96.2	100	98.7	96.2	70.7	70.7	96.2	98.7	98.7	96.2	96.2	70.7	96.2	98.7	98.7	100	70.7
AC1633b	98.7	98.7	100	98.7	100	97.4	69.5	94.9	94.9	69.5	97.4	98.7	100	94.9	69.5	69.5	94.9	100	100	97.4	97.4	94.9	97.4	100	100	98.7	69.5
ACN21	96.2	96.2	94.9	96.2	94.9	96.2	70.7	100	100	70.7	97.4	96.2	94.9	100	70.7	70.7	100	94.9	94.9	97.4	97.4	97.4	96.2	94.9	94.9	96.2	70.7
ATCC17961	70.7	70.7	69.5	70.7	69.5	68.3	98.8	70.7	70.7	100	68.3	70.7	69.5	70.7	100	100	70.7	69.5	69.5	68.3	68.3	68.3	68.3	69.5	69.5	70.7	100
ATCC19606	70.7	70.7	69.5	70.7	69.5	68.3	98.8	70.7	70.7	100	68.3	70.7	69.5	70.7	100	100	70.7	69.5	69.5	68.3	68.3	68.3	68.3	69.5	69.5	70.7	100
CI300	96.2	96.2	94.9	96.2	94.9	96.2	70.7	100	100	70.7	97.4	96.2	94.9	100	70.7	70.7	100	94.9	94.9	97.4	97.4	97.4	96.2	94.9	94.9	96.2	70.7
CIP70.10	98.7	98.7	100	98.7	100	97.4	69.5	94.9	94.9	69.5	97.4	98.7	100	94.9	69.5	69.5	94.9	100	100	97.4	97.4	94.9	97.4	100	100	98.7	69.5

DETAB-P2	98.7	98.7	100	98.7	100	97.4	69.5	94.9	94.9	69.5	97.4	98.7	100	94.9	69.5	69.5	94.9	100	100	97.4	97.4	94.9	97.4	100	100	98.7	69.5
DT0544C	96.2	96.2	97.4	96.2	97.4	98.7	68.3	97.4	97.4	68.3	100	96.2	97.4	97.4	68.3	68.3	97.4	97.4	97.4	100	100	97.4	98.7	97.4	97.4	96.2	68.3
KSK Sens.	96.2	96.2	97.4	96.2	97.4	98.7	68.3	97.4	97.4	68.3	100	96.2	97.4	97.4	68.3	68.3	97.4	97.4	97.4	100	100	97.4	98.7	97.4	97.4	96.2	68.3
LMG994	93.6	93.6	94.9	93.6	94.9	96.2	68.3	97.4	97.4	68.3	97.4	93.6	94.9	97.4	68.3	68.3	97.4	94.9	94.9	97.4	97.4	100	94.9	94.9	94.9		68.3
OCO64	96.2	96.2	97.4	96.2	97.4	100	69.2	96.2	96.2	68.3	98.7	96.2	97.4	96.2	68.3	68.3	96.2	97.4	97.4	98.7	98.7	96.2	100	97.4	97.4	96.2	68.3
R2091	98.7	98.7	100	98.7	100	97.4	94.9	94.9	94.9	69.5	97.4	98.7	100	94.9	69.5	69.5	94.9	100	100	97.4	97.4	94.9	97.4	100	100	98.7	69.5
VB280821a	98.7	98.7	100	98.7	100	97.4	94.9	94.9	94.9	69.5	97.4	98.7	100	94.9	69.5	69.5	94.9	100	100	97.4	97.4	94.9	97.4	100	100	98.7	69.5
VB280821b	100	100	98.7	100	98.7	96.2		96.2	96.2	70.7	96.2	100	98.7	96.2	70.7	70.7	96.2	98.7	98.7	96.2	96.2	70.7	96.2	98.7	98.7	100	70.7
PartI.Abaumannii	70.7	70.7	69.5	70.7	69.5	68.3	98.8	70.7	70.7	100	68.3	70.7	69.5	70.7	100	100	70.7	69.5	69.5	68.3	68.3	68.3	68.3	69.5	69.5	70.7	100

1B.b. Matriks tabela CoaB proteina predstavnika B grupe

B grupa	XH1344	UC23022	UC21460	NY13623	NCTC7364	NCTC7364	LMG944	ATCC BAA1790	ATCC17978	ATCC17978	ATCC17978	ATCC17978	AR_0070	AR_0052	AbH120-A2	AB030	Ab-D10a-a	Ab-C63	Ab-B004d-c	810CP
XH1344	100	97.6	97.6	98.8	47	47	47	98.8	100	100	100	100	47	47	54.2	98.8	69.8	100	98.8	98.8
UC23022	97.6	100	100	98.8	47	47	47	98.8	97.6	97.6	97.6	97.6	47	47	54.2	98.8	69.8	97.6	98.8	98.8
UC21460	97.6	100	100	98.8	47	47	47	98.8	97.6	97.6	97.6	97.6	47	47	54.2	98.8	69.8	97.6	98.8	98.8
NY13623	98.8	98.8	98.8	100	48.2	48.2	48.2	100	98.8	98.8	98.8	98.8	48.2	48.2	55.4	100	71	98.8	100	100
NCTC7364	47	47	47	48.2	100	100	100	48.2	47	47	47	47	98.7	98.7	90.4	48.2	35.6	45	48.2	48.2
NCTC7364	47	47	47	48.2	100	100	100	48.2	47	47	47	47	98.7	98.7	90.4	48.2	35.6	45	48.2	48.2
LMG944	47	47	47	48.2	100	100	100	48.2	47	47	47	47	98.7	98.7	90.4	48.2	35.6	45	48.2	48.2
ATCC BAA1790	100	98.8	98.8	100	48.2	48.2	48.2	100	98.8	98.8	98.8	98.8	48.2	48.2	55.4	100	71	98.8	100	100
ATCC17978	100	97.6	97.6	98.8	47	47	47	98.8	100	100	100	100	47	47	54.2	98.8	69.8	100	98.8	98.8
ATCC17978	100	97.6	97.6	98.8	47	47	47	98.8	100	100	100	100	47	47	54.2	98.8	69.8	100	98.8	98.8
ATCC17978	100	97.6	97.6	98.8	47	47	47	98.8	100	100	100	100	47	47	54.2	98.8	69.8	100	98.8	98.8
ATCC17978	100	97.6	97.6	98.8	47	47	47	98.8	100	100	100	100	47	47	54.2	98.8	69.8	100	98.8	98.8

AR_0070	47	47	47	48.2	98.7	98.7	98.7	48.2	47	47	47	47	100	100	89.2	48.2	35.6	47	48.2	48.2
AR_0052	47	47	47	48.2	98.7	98.7	98.7	48.2	47	47	47	47	100	100	89.2	48.2	35.6	47	48.2	48.2
AbH120-A2	54.2	54.2	54.2	55.4	90.4	90.4	90.4	55.4	54.2	54.2	54.2	54.2	89.2	89.2	100	55.4	34.9	54.2	55.4	55.4
AB030	98.8	98.8	98.8	100	48.2	48.2	48.2	100	98.8	98.8	98.8	98.8	48.2	48.2	55.4	100	71	98.8	100	100
Ab-D10a-a	93.4	93.4	93.4	95	45.1	45.1	45.1	95	93.4	93.4	93.4	93.4	45.1	45.1	46.7	95	100	93.4	95	95
Ab-C63	100	97.6	97.6	98.8	47	47	47	98.8	100	100	100	100	47	47	54.2	98.8	69.8	100	98.8	98.8
Ab-B004d-c	98.8	98.8	98.8	100	48.2	48.2	48.2	100	98.8	98.8	98.8	98.8	48.2	48.2	55.4	100	71	98.8	100	100
810CP	98.8	98.8	98.8	100	48.2	48.2	48.2	100	98.8	98.8	98.8	98.8	48.2	48.2	55.4	100	71	98.8	100	100

1B.c. Matriks tabela CoaB proteina predstavnika C grupe

C grupa	AB169-VUB	A388	A85	AB0057a	AB0057b	AB0057c	AB0057d	AB0057e	AB322	AB43	AB5057-UWa	AB505-UWb	AB505-UWc	AB6870155a	AB6870155b	AB6870155c	AR_0083	AYEa	AYEb	B8342	D36a	D36b	DA33382	FDAARGOS_1036	FDAARGOS_540a	FDAARGOS_540b	NCTC13421	OC074	OC081	UC22850	USA15	VB2486	WCHAB005078	WP4-W18-FSBL-11	AB5075-VUB	AB5075-VUB	AB5075-VUB	AB5075-VUB
AB169-VUB	100	98.6	100	100	100	100	100	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100	98.6	98.6	100	88.9	98.6	98.6	98.6	100	100	100	100	98.6	98.6	100	100	98.6	100	100	100	100	100
A388	98.6	100	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	97.2	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	100	97.2	98.6	87.5	100	100	97.2	98.6	98.6	98.6	98.6	97.2	97.2	98.6	98.6	100	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
A85	100	98.6	100	100	100	100	100	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100	98.6	98.6	100	88.9	98.6	98.6	98.6	100	100	100	100	98.6	98.6	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100
AB0057	100	98.6	100	100	100	100	100	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100	98.6	98.6	100	88.9	98.6	98.6	98.6	100	100	100	100	98.6	98.6	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100
AB0057	100	98.6	100	100	100	100	100	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100	98.6	98.6	100	88.9	98.6	98.6	98.6	100	100	100	100	98.6	98.6	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100
AB0057	100	98.6	100	100	100	100	100	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100	98.6	98.6	100	88.9	98.6	98.6	98.6	100	100	100	100	98.6	98.6	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100
AB0057	100	98.6	100	100	100	100	100	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100	98.6	98.6	100	88.9	98.6	98.6	98.6	100	100	100	100	98.6	98.6	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100
AB0057	10	98.	10	10	10	10	10	10	10	98.	10	10	10	10	10	10	98.	98.	10	88.	98.	98.	98.	10	10	10	10	98.	98.	10	10	98.	10	10	10	10	10	10

	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6	6	0	9	6	6	6	0	0	0	0	6	6	0	0	6	0	0	0	0	0	0
AB322	100	98.6	100	100	100	100	100	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100	98.6	98.6	100	88.9	98.6	98.6	98.6	100	100	100	100	98.6	98.6	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100
AB43	98.6	97.2	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	100	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	97.2	100	98.6	87.5	97.2	97.2	100	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	100	100	98.6	97.2	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
AB5057-UW	100	98.6	100	100	100	100	100	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100	98.6	98.6	100	88.9	98.6	98.6	98.6	100	100	100	100	98.6	98.6	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100
AB5057-UW	100	98.6	100	100	100	100	100	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100	98.6	98.6	100	88.9	98.6	98.6	98.6	100	100	100	100	98.6	98.6	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100
AB5057-UW	100	98.6	100	100	100	100	100	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100	98.6	98.6	100	88.9	98.6	98.6	98.6	100	100	100	100	98.6	98.6	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100
AB6870155	100	98.6	100	100	100	100	100	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100	98.6	98.6	100	88.9	98.6	98.6	98.6	100	100	100	100	98.6	98.6	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100
AB6870155	100	98.6	100	100	100	100	100	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100	98.6	98.6	100	88.9	98.6	98.6	98.6	100	100	100	100	98.6	98.6	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100
AB6870155	100	98.6	100	100	100	100	100	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100	98.6	98.6	100	88.9	98.6	98.6	98.6	100	100	100	100	98.6	98.6	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100
AR_0083	98.6	100	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	97.2	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	100	97.2	98.6	87.5	100	97.2	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	97.2	97.2	98.6	98.6	100	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
AYE	98.6	97.2	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	100	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	97.2	100	98.6	87.5	97.2	97.2	100	98.6	98.6	98.6	98.6	100	100	98.6	98.6	97.2	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
AYE	100	98.6	100	100	100	100	100	100	98.6	98.6	100	100	100	100	100	100	98.6	98.6	100	88.9	98.6	98.6	98.6	100	100	100	100	98.6	98.6	100	100	98.6	100	100	100	100	100	100
B8342	88.9	87.5	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	87.5	87.5	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	87.5	88.9	88.9	100	87.5	87.5	87.5	88.9	88.9	88.9	88.9	87.5	87.5	87.5	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9
D36	98.6	100	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	97.2	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	100	97.2	98.6	87.5	100	100	97.2	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	97.2	97.2	98.6	98.6	100	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
D36	98.6	100	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	97.2	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	100	97.2	98.6	87.5	100	100	97.2	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	97.2	97.2	98.6	98.6	100	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
DA33382	98.6	97.2	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	100	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	97.2	100	98.6	87.5	97.2	97.2	100	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	100	100	98.6	98.6	97.2	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6

| | | |

1B.d. Matriks tabela CoaB proteina predstavnika D grupe

D grupa	WP4-W18-FSBLL-11	OCU_Ac16a	OC073	NCTC7364	FDAARGOS_533	DETAB-P2	B8300	B8342	Ab105	6200
WP4-W18-FSBLL-11	100	98.8	100	98.8	98.8	97.7	94.2	100	98.8	98.8
OCU_Ac16a	98.8	100	98.8	100	100	98.8	95.4	98.8	100	100
OC073	100	98.8	100	98.8	98.8	97.7	94.2	100	98.8	98.8
NCTC7364	98.8	98.8	98.8	100	100	98.8	95.4	98.8	100	100
FDAARGOS_533	98.8	98.8	98.8	100	100	98.8	95.4	98.8	100	100
DETAB-P2	97.7	98.8	97.7	98.8	98.8	100	94.2	97.7	98.8	98.8
B8300	94.2	95.4	94.2	95.4	95.4	94.2	100	94.2	95.4	95.4
B8342	100	98.8	100	98.8	98.8	97.7	94.2	100	98.8	98.8
Ab105	98.8	98.8	98.8	100	100	98.8	95.4	98.8	100	100
6200	98.8	98.8	98.8	100	100	98.8	95.4	98.8	100	100

1B.e. Matriks tabela CoaB proteina predstavnika E grupe

E grupa	11W359501	A85	AB0057	AB031	AB169-VUB	AB6870155	ATCCBAA1605	FDAARGOS_1036	NCTC13421	VB2486
11W359501	100	98.8	98.8	100	100	100	98.8	100	100	100
A85	96.8	100	98.8	96.8	96.8	96.8	98.8	96.8	96.8	96.8
AB0057	98.8	100	100	98.8	98.8	98.8	100	98.8	98.8	98.8
AB031	100	98.8	98.8	100	100	100	98.8	100	100	100
AB169-VUB	100	98.8	98.8	100	100	100	98.8	100	100	100
AB6870155	100	98.8	98.8	100	100	100	98.8	100	100	100
ATCCBAA1605	98.8	100	100	98.8	98.8	98.8	100	98.8	98.8	98.8
FDAARGOS_1036	100	98.8	98.8	100	100	100	98.8	100	100	100
NCTC13421	100	98.8	98.8	100	100	100	98.8	100	100	100
VB2486	100	98.8	98.8	100	100	100	98.8	100	100	100

1B.f. Matriks tabela CoaB proteina predstavnika F grupe

F grupa	UC23022	UC23022	UC22850	MRSN153131	MRSN153132	AbH120-A2	AB5057-UW	Ab-D10a-a	Ab-B004d-c	17-84	5075-VUB 541	AB5075-VUB 536	AB5075-VUB 533
UC23022	100	100	100	100	100	100	100	89.2	89.2	89.2	100	0	100
UC23022	100	100	100	100	100	100	100	89.2	89.2	89.2	100	0	100
UC22850	100	100	100	100	100	100	100	89.2	89.2	89.2	100	0	100
MRSN15313 1	100	100	100	100	100	100	100	89.2	89.2	89.2	100	0	100
MRSN15313 2	100	100	100	100	100	100	100	89.2	89.2	89.2	100	0	100
AbH120-A2	100	100	100	100	100	100	100	89.2	89.2	89.2	100	0	100
AB5075-UW	100	100	100	100	100	100	100	89.2	89.2	89.2	100	0	100
Ab-D10a-a	89.2	89.2	89.2	89.2	89.2	89.2	89.2	100	100	83.6	89.2	0	89.2
Ab-B004d-c	89.2	89.2	89.2	89.2	89.2	89.2	89.2	100	100	83.6	89.2	0	89.2
17-84	89.2	89.2	89.2	89.2	89.2	89.2	89.2	83.6	83.6	100	89.2	0	89.2
5075-VUB 541	100	100	100	100	100	100	100	89.2	89.2	89.2	100	0	100
AB5075-VUB 536	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
AB5075-VUB 533	100	100	100	100	100	100	100	89.2	89.2	89.2	100	0	100

[1] CoatB nije detektovan u sledećim sojevima za grupu F: XH858, XH1056, BJAB0715.

1B.g. Matriks tabela CoaB proteina predstavnika G grupe

G grupa	YC103	VB16141	31FS3-2
YC103	100	43.2	100
VB16141	47.8	100	47.8
31FS3-2	100	43.2	100

1B.h. Matriks tabela CoaB proteina predstavnika H grupe

H grupa	10_3	10_4 a	10_4 b
10_3	100	100	100
10_4 a	100	100	100
10_4 b	100	100	100

1B.i. Matriks tabela CoaB proteina predstavnika I grupe

I grupa	280820	6080	A1429	ABF9692	AC1633	CIP70.10	DETAB-E51	DETAB-P43	R2091	VB280821
280820	100	71.1	71.1	92.2	100	100	73.3	73.3	100	100
6080	71.1	100	100	67.8	71.1	71.1	76.7	76.7	71.1	71.1
A1429	71.1	100	100	67.8	71.1	71.1	76.7	76.7	71.1	71.1
ABF9692	92.2	67.8	67.8	100	92.2	92.2	72.2	72.2	92.2	92.2
AC1633	100	71.1	71.1	92.2	100	100	73.3	73.3	100	100
CIP70.10	100	71.1	71.1	92.2	100	100	73.3	73.3	100	100
DETAB-E51	73.3	76.7	76.7	72.2	73.3	73.3	100	100	73.3	73.3
DETAB-P43	73.3	76.7	76.7	72.2	73.3	73.3	100	100	73.3	73.3
R2091	100	71.1	71.1	92.2	100	100	73.3	73.3	100	100
VB280821	100	71.1	71.1	92.2	100	100	73.3	73.3	100	100

1B.j. Matriks tabela CoaB proteina predstavnika J grupe

J grupa	DSM486	DSM493
DSM486	100.0	100.0
DSM493	100.0	100.0

1B.k. Matriks tabela analiziranih aminokiselinskih sekvenci CoaB proteina između grupa.

Predstavnici grupa	**280820 (A)**	**AB169-VUB (A)**	**ATCC19606 (A)**	**LMG994 (A)**	NCTC7364 (B)	LMG944 (B)	AbH120-A2 (B)	Ab-D10a-a(B)	A388 (C)	A85 (C)	AB43 (C)	B8342 (C)	WP4-W18-FSBLL-11 (D)	NCTC7364 (D)	B8300 (D)	AbH120-A2 (F)	11W359501 (E)	A85 (E)	**YC103 (G)**	**VB16141 (G)**	10_3 (H)	6080(I)	R2091 (I)
280820 (A)	100	70.7	70.7	93.6	22.2	22.2	29.9		26.6	26.6	26.6	21.7					19.1	19.1				25.2	27.5
AB169-VUB (A)	70.7	100	98.8	68.3					31.9	31.9	31.9						23.4	23.4	21.3	28.4		19.3	20.3
ATCC19606 (A)	70.7	98.8	100	68.3					31.5	31.5	31.5						23.1	23.1	21.3	28		19	19.9
LMG994 (A)	93.6	68.3	68.3	100	21	21	30.1		26.6	26.6	26.6	21.7					19.1	19.1					28.9
NCTC7364 (B)	22.2			21	100	100	90.4	35.6	21.4	21.4	21.4		31.5	32.8	10.7		29.6	29.6			29		
LMG944 (B)	22.2			21	100	100	90.4	35.6	21.4	21.4	21.4		31.5	32.8	10.7		29.6	29.6			29		
AbH120-A2 (B)	26.8			27.1	90.4	90.4	100	34.9	20.3	20.3	20.3	0	34.1	35.2	34.1		32.5	32.5			29.9		
Ab-D10a-a (B)					45.1	45.1	46.7	100													15.8		
A388 (C)	38.8	35.9	35.9	37.5	33.5	33.5	32.6		100	98.6	97.2	87.5									31.6	18.2	18.2
A85 (C)	38.8	35.9	35.9	37.5	33.5	33.5	32.6		98.6	100	98.6	88.9									30.3	18.2	18.2
AB 43(C)	40.1	35.9	35.9	38.8	32.2	32.2	31.3		97.2	98.6	100	87.5									31.6	18.2	19.5
B8342 (C)	35.6	35.9	35.9	35.6	35.2	35.2	32.6		87.5	88.9	87.5	100									26.8	19.6	24.8
WP4-W18-FSBLL-11 (D)					29.8	29.8	34.4						100	98.8	94.2		21.1	21.1				35.3	19.5
NCTC7364 (D)					31	31	35.6						98.8	100	95.4		21.1	21.1				37.8	19.5
B8300 (D)	20.3			20.3	31	31	36.7						94.2	95.4	100		22.2	22.2				36.7	19.5
AbH120-A2 (F)																100					28.2	31.8	20.7
11W359501 (E)	17.8	16.5	16.5	17.8	26.8	26.8	30.4						20.7	20.7			100	98.8	20.1		30.9		
A85 (E)	17.6	16.2	16.2	17.6	26.5	26.5	30.1						20.7	20.7			96.8	100		19.8	27		
YC103 (G)		33.3	20.1														26.1	18.2	100	43.2	24.1		

VB16141 (G)		19.8	27.6													20.4	20.4	47.8	100	28.2		
10_3 (H)	21-Jan	14	14		29.9	29.9	30.9	12.9	7.3	7.3	7.3					28.6	31.9	29.8		25.1	100		
6080(I)													35.3	37.8	34.2	25						100	71.1
R2091(I)		18.2	18.2	24.1					14.1	14.1	15.2		34.2	36.7	18.7	33						71.1	100

Biografija



Jelena Narančić je rođena 17. septembra 1989. godine u Novom Sadu. Osnovnu školu „Branko Radičević“ i gimnaziju „Jovan Jovanović Zmaj“ završila je u Odžacima sa odličnim uspehom. Na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu je 2008. godine upisala osnovne akademske studije, smer Ekolog. Tokom osnovnih studija je dobila stipendiju Ministarstva prosvete Republike Srbije i stipendiju opštine Odžaci putem programa za studente sa visokim prosekom. Na Departmanu za biologiju i ekologiju istog fakulteta je upisala master akademske studije 2013. godine, smer Master profesor biologije i završila 2014. godine odbranom Master rada pod nazivom „Primena problemske nastave u obradi teme životna sredina, zdravlje i kultura življenja u osnovnoj školi“, koji je implementirala tokom nastavnog rada u osnovnoj školi „Petefi Šandor“ u Novom Sadu.

Doktorske akademske studije, takođe na Departmanu za biologiju i ekologiju, smer Doktor bioloških nauka, upisala je 2016. godine i iste godine je izabrana u zvanje istraživača pripravnika na Katedri za mikrobiologiju. Sve predviđene ispite na doktorskim studijama položila je prosečnom ocenom 10,00. Od 2017. godine zaposlena je na projektu Prirodno-matematičkog fakulteta pod nazivom „Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvor novih lekova i dijetetskih suplemenata“ Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, pod rukovodstvom prof. dr Nede Mimice-Dukić. Učestvovala je u izvođenju praktične nastave kurseva Opšta mikrobiologija i Biologija algi i gljiva za studente osnovnih akademskih studija Departmana za biologiju i ekologiju. Godine 2021. izabrana je u zvanje istraživača saradnika za užu naučnu oblast Mikrobiologija, takođe na Katedri za mikrobiologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

Član je Društva mikrobiologa Srbije i Evropskog društva mikrobiologa (*The Federation of European Microbiological Societies* – FEMS). Autor je rada u međunarodnom časopisu sa SCI liste M23 kategorije i koautor radova u istaknutom međunarodnom časopisu M21 kategorije, u međunarodnom časopisu kategorije M23 i četiri saopštenja sa međunarodnog skupa.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Acinetobacter baumannii специфични бактериофаги из фамилије *Inoviridae*
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, Департман за биологију и екологију
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Пројекат Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, број: 172058. Програм научноистраживачког рада Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије
1. Опис података

1.1 Врста студије

Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају

Подаци су анализирани *in silico* ради утврђивања филогенетских односа филаментозних бактериофага специфичних за бактеријску врсту *A. baumannii*, као и за дизајнирање прајмера за PCR. Примењене су и *in vitro* анализе могућности формирања плака од стране умножених филаментозних бактериофага. Анализе *in vitro* су такође примењене и да би се установила промена у осетљивости на антибиотике, у способности формирања биофилма и капсуле, способности раста и кретања и промена у експресији гена за ефлуксне пумпе, након инфекције бактеријских сојева са филаментозним бактериофагима.

1.2 Врсте података

а) квантитативни

б) квалитативни

1.3. Начин прикупљања података

а) текст, преглед дотупне литературе релевантне за истраживање

б) преузимање секвенци генома секвенцираних филаментозних бактериофага из НЦБИ базе

в) ручно претраживање секвенци генома филаментозних бактериофага у оквиру секвенцираних генома референтних бактеријских сојева из НЦБИ базе

г) визуелизација трака ДНК секвенци на агарозном гелу

д) апсорбанце спектрофотометарских мерења

ђ) визуелизација добијених прстенова бактериофага након ултрацентрифугирања

е) електронска микрографија изолованог бактериофага

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека.xlsx

b) SPSS фајл, датотека _____

c) PDF фајл, датотека .pdf

d) Текст фајл, датотека.doc

e) JPG фајл, датотека.jpg

f) Остало,датотека .png фајл

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли od 3 do 6

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) мерење сваког третмана се вршило у три до 5 репликата, а број испитаника је од 3 до 541 у зависности од методе

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент-детекција (про)фага у испитиваним сојевима; изолација фага и успостављање инфекције одабраних сојева фагима; фотометријским читачем апсорбанци за микротитар плоче праћење разлика бактеријских сојева који су инфицирани филаментозним фагима у односу на неинфициране еквиваленте у: расту, способности формирања биофилма и продукције капсуларних сахарида; анализа разлика у трзајућој покретљивости инфицираних бактеријских сојева у односу на неинфициране еквиваленте и анализа разлика у експресији гена за ефлуксне

пумпе код инфицираних сојева у односу на неинфициране еквиваленте.

б) анализа текста, анализирани су доступни постојећи литературни извори ради дефинисања циљева и плана истраживања, као и дискутовања добијених резултата.

б) остало-*in silico* претрага секвенци генома и филогенетске анализе у MEGA X програму

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

Фотометријски читач апсорбанци микротитар плоча, ултрацентрифуга и програмски пакети за *in silico* анализе

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Не

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Статистичким анализама и контролним експериментима

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контролом са другог корисничког налога

3. Третман података и пратећа документација

3.1.Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму докторских дисертација у Универзитету у Новом Саду (CRIS) и Заједничком порталу свих докторских дисертација и иузвештаја комисија о њиховој оцени на универзитетима у Србији (NARDUS).

3.1.2. URL адреса https://www.cris.uns.ac.rs/index.jsf*и* https://nardus.mpn.gov.rs/

3.1.3. DOI: /

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

б) Не

*Ако је одговор не, навести разлог*_____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијуму, али ће бити чувани.

Образложење

Докторска дисертација са прилогом ће бити депонована у Репозиторијуму докторских дисертација у Универзитету у Новом Саду (CRIS) и Заједничком порталу свих докторских дисертација и извештаја комисија о њиховој оцени на универзитетима у Србији (NARDUS).

3.2 Метаподаци и документација података

Нема метаподатака

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? Неограничено

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена? Да **Не**

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности*(https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)* и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Јелена Наранчић, jelenan@dbe.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Јелена Наранчић, jelenan@dbe.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Јелена Наранчић, jelenan@dbe.uns.ac.rs