



## Detection of T6SS secretory system and membrane purine involved in antibiotic resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates

Tohid Piri Gharaghi<sup>1</sup>, Abbas Doosti<sup>2</sup>, Seyed Abbas Mirzaei<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

<sup>2</sup>Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. <sup>3</sup>Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background & Objectives:** Type 6 secretory system (T6SS) and the presence of a strong efflux pump due to membrane purine are important indicators of pathogenicity of *Acinetobacter baumannii*. This study aimed to track the secretory system of T6SS and membrane purine as well as the pattern of antibiotic resistance in clinical isolates.

**Materials and methods:** This cross-sectional descriptive study was performed on 33 strains of *A. baumannii* isolated from clinical samples including blood, urine, respiratory trachea, and wound. Antibiotic susceptibility of isolates was evaluated by the disk diffusion method according to CLSI protocol. Also, the frequency of genes encoding the effector proteins secreted from the type 6 secretory system and membrane purine was determined using Multiplex PCR.

**Results:** 31 strains of *A. baumannii* were identified, using the molecular method. *A. baumannii* isolates showed 93.55% sensitivity to colistin sulfate. The lowest susceptibility was related to five classes of antibiotics: fluoroquinolones (12.9%), cephalosporins (6.45%), aminoglycosides (6.45%), macrolides (16.1%), and inhibitory antibiotics (12.1%). The results showed that in addition to the MDR phenotype (100% of isolates), 20 isolates (64.52%) had the XDR phenotype. The frequency of the *hcp* gene was confirmed in 18 isolates (58%) and *ompC* in all isolates (100%). Also, the frequency of the *ompC* gene in MDR and XDR isolates was 100%. However, the *hcp* gene was observed only in the XDR phenotype with 90% frequency.

**Conclusion:** The results of this study showed the possible effect of the *hcp* gene on the compatibility of *A. baumannii* isolates with unfavorable conditions and the occurrence of resistance phenotype.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, Resistance to carbapenems, T6SS secretory system, Membrane purine.

Received: 14 October 2020

Revised: 21 January 2021

Accepted: 3 April 2021

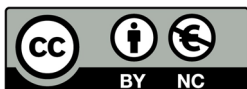
Correspondence to: Abbas Doosti

Tel: +98 38-33361048

E-mail: [biotechnology.97@yahoo.com](mailto:biotechnology.97@yahoo.com)

Journal of Microbial World 2021, 14(1): 47-58

DOI: 10.30495/jmw.2021.690441



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



## شناسایی سیستم ترشحي T6SS و پورین غشایی موثر در مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های اسیتوباکتر بامانی مقاوم به چند دارو

توحید پیری قراقیه<sup>۱</sup>، عباس دوستی<sup>۲\*</sup>، سیدعباس میرزایی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. <sup>۲</sup> مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، انستیتوی علوم پایه بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران. <sup>۳</sup> مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** سیستم ترشحي تیپ ۶ (T6SS) و وجود پمپ افلاکس قوی به واسطه پورین غشایی، از شاخص‌های مهم بیماری‌زایی اسیتوباکتر بامانی میباشند. این مطالعه با هدف ردیابی سیستم ترشحي T6SS و پورین غشایی و همچنین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های کلنیکی انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** این پژوهش به صورت مقطعی - توصیفی بر روی ۳۳ سویه اسیتوباکتر بامانی جدا شده از نمونه‌های بالینی خون، ادرار، تراشه تنفسی و زخم انجام شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با روش دیسک دیفیوژن مطابق پروتکل CLSI مورد بررسی قرار گرفت. همچنین فراوانی ژن‌های کدکننده افکتور پروتین‌های ترشح شده از سیستم ترشحي تیپ ۶ و پورین غشایی با استفاده از آزمون Multiplex PCR انجام شد.

**یافته‌ها:** با استفاده از روش مولکولی، ۳۱ سویه اسیتوباکتر بومانی شناسایی شد. جدایه‌های اسیتوباکتر بامانی حساسیت ۹۳/۵۵٪ به کلیستین سولفات نشان دادند. کمترین میزان حساسیت مربوط به پنج کلاس آنتی‌بیوتیکی فلوروکینولون‌ها (۱۲/۹٪)، سفالوسپورین‌ها (۶/۴۵٪)، آمینوگلیکوزیدها (۶/۴۵٪)، ماکرولیدها (۱/۶۷٪) و آنتی‌بیوتیک مهارکننده (۱۲/۱٪) بود. نتایج نشان داد که علاوه بر فنوتیپ MDR (۱۰۰٪ جدایه‌ها)، ۲۰ جدایه (۶۴/۵۲٪) فنوتیپ XDR دارند. فراوانی ژن *hcp* در ۱۸ جدایه (۵۸٪) و *ompC* در تمامی جدایه‌ها (۱۰۰٪) تایید شد. همچنین فراوانی ژن *ompC* در جدایه‌های MDR و XDR، ۱۰۰٪ بود. اما ژن *hcp* تنها در فنوتیپ XDR با فراوانی ۹۰٪ مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این پژوهش تاثیر احتمالی ژن *hcp* در سازگاری جدایه‌های اسیتوباکتر بامانی با شرایط نامساعد و بروز فنوتیپ مقاومت را نشان داد.

**واژگان کلیدی:** اسیتوباکتر بامانی، مقاومت به کارباپنم‌ها، سیستم ترشحي T6SS، پورین غشایی.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱/۱۴

ویرایش مقاله: ۱۳۹۹/۱۱/۲

دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۷/۲۳

### مقدمه

می‌دهند (۱). مهم‌ترین گونه از این جنس اسیتوباکتر بامانی است که عامل بیماری‌های مختلفی از قبیل پنومونی، سپتیسمی، عفونت‌های دستگاه ادراری، عفونت‌های پوستی و زخم، مننژیت و اندوکاردیت می‌باشد (۲ و ۳). میزان استقرار

اسیتوباکترها کوکوباسیل‌های گرم منفی و هوازی اجباری هستند که زندگی در محیط‌های مرطوب را ترجیح

(\* آدرس برای مکاتبه: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی. تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۶۱۰۴۸. پست الکترونیک: [biotechnology.97@yahoo.com](mailto:biotechnology.97@yahoo.com)



مهمترین ژن شناخته شده این گروه hcp است که به عنوان بیومارکر برای تشخیص سیستم T6SS در *اسیتوباکتر* استفاده می‌شود (۱۵). این مکانیسم در *اسیتوباکتر*های مقاوم، برای پیشی گرفتن از سایر جدایه‌های *اسیتوباکتر* و حتی گونه‌های مختلف باکتریایی، از جمله عوامل بیماری‌زای بیمارستانی *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروجینوسا*، *کلبسیلا* نمونه استفاده می‌شود.

این ظرفیت ممکن است مزیت رقابتی برای همزیستی ایجاد کند (۱۶). همچنین پروتین‌های Omp دسته‌ای از پروتین‌های غشایی مهم از زیررده پورین‌ها می‌باشند. پورین‌های OM، پروتین‌های عرض غشایی با یک ساختار b-barrel هستند، که یک کانال باز پر از آب را تشکیل می‌دهند و امکان انتقال غیرفعال ترکیبات آبگریز را فراهم می‌کنند (۱۷ و ۱۸).

پورین‌ها کانال‌های حمل و نقلی هستند که نقش مهمی در انتشار مولکول‌های کوچک و در هموستاز باکتریایی دارند (۱۹). از آنجاکه پورین‌ها واسطه انتشار منفعل آنتی‌بیوتیک‌ها در سراسر غشای خارجی می‌باشند، به طور مستقیم با ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های گرم منفی نقش دارند. به عنوان مثال کانال پورینی غیراختصاصی OmpC از باکتری گرم منفی به عنوان راه نفوذ بتالاکتام‌ها و فلوروکینولون‌ها شناخته شده است (۲۰). کانال پورینی OmpC به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های گرم منفی مانند *اشریشیا کلی*، *اسیتوباکتر بومانی*، *کلبسیلا* و *سودوموناس آئروجینوسا* مقاوم است (۲۱ و ۲۲). اکثر باکتری‌های گرم منفی (مانند *اسیتوباکتر بامانی*) پورین‌های چندگانه را بیان می‌کنند که بیشترین میزان بیان این پورین‌ها مربوط به OmpC و OmpF می‌باشند که منجر به عفونت‌زایی شدید می‌گردد (۲۳ و ۲۴).

به نظر می‌رسد عوامل ضد میکروبی جدیدی که بتواند در مقابل این باکتری فعالیت مؤثر داشته باشند در آینده نزدیک در دسترس نباشد که این موضوع اهمیت شناسایی عوامل حدت و افزایش مقاومت باکتری به داروهای رایج را بیشتر می‌کند. مطالعه حاضر با هدف ردیابی شایع‌ترین ژن کدکننده سیستم

*اسیتوباکتر بامانی* در افراد بستری شده در بیمارستان به ویژه در آن‌هایی که درمان آنتی‌بیوتیکی وسیع و یا درمان ضدسرطان داشته‌اند، در حال افزایش است (۴ و ۵). یکی از مشکلات موجود در مورد *اسیتوباکتر بامانی* ظهور جدایه‌هایی با مقاومت چند دارویی (MDR) است که به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها مانند بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون‌ها مقاوم هستند (۶).

در بررسی دوره‌ای که از سال ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۴ از منطقه Tshwane آفریقای جنوبی انجام شد، شیوع جدایه‌های MDR این باکتری از میانگین ۵۵٪ در سال ۲۰۰۸ به ۸۵٪ در سال ۲۰۱۴ افزایش یافته بود که به عنوان زنگ خطری برای شروع آخالزمان آنتی‌بیوتیکی این باکتری می‌باشد (۷). جدایه‌های مقاوم به کاربپنم این باکتری تا سال ۲۰۱۴ تقریباً در تمام نقاط جهان با فراوانی ۳۰ تا ۵۰٪ گزارش شد (۸).

اخیراً در مطالعات متعدد افزایش شیوع انواع جدایه‌های مقاوم و ژن‌های مقاومت این باکتری از شهرهای مختلف کشور ایران گزارش شده است (۹ و ۱۰ و ۱۱). در حال حاضر، تمرکز بسیاری از مطالعات علمی بر روی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و اپیدمیولوژی *اسیتوباکتر بومانی* بوده است، اما مطالعات در مورد استراتژی‌های این باکتری در مسیر پیدایش عناصر دقیق درگیر در ایجاد روند و پیشرفت عفونت و همچنین مکانیسم‌های مربوط به ترشح و تحویل عوامل حدت (VF) به سلول‌های میزبان در این زمینه، بسیار اندک است (۱۲).

چندین سیستم ترشحی پروتین که به عنوان سیستم‌های ترشحی نوع ۱، نوع ۲ و نوع ۶ (T6SS) تقسیم می‌شوند، به همراه مکانیسم‌های دیگر مانند پروتین‌های غشای خارجی (omp)، در این فرآیندها مؤثر هستند (۱۳). T6SS یک سیستم پوششی است که پروتین‌های تاثیرگذار سمی را به سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی منتقل می‌کند و نقش محوری در پاتوژنز و رقابت باکتریایی دارد (۱۴). بیشتر گونه‌های *اسیتوباکتر* یک سیستم T6SS خوشه‌ای متشکل از ۱۸ ژن را دارند، که در اکثر جدایه‌ها ۱۳ ژن ثابت هستند.

سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و گسترش نهایی (Final extension) ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. وجود قطعات ۲۰۸ جفت بازی تکثیر یافته در این واکنش نشانگر وجود *اسیتوباکتر بومانی* در کلنی‌های مورد مطالعه بود (۸). از جدایه *Acinetobacter ATCC19606* به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۲۵).

ب) *آزمون تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و فنوتیپ مقاومت در جدایه‌ها*: آزمون حساسیت ضد میکروبی برای همه جدایه‌ها طبق معیارهای (CLSI Clinical and Laboratory Standard Institute) M45, 3rd ed. 2016 با استفاده از روش انتشار دیسک انجام شد. از کشت خالص باکتری‌ها، سه تا پنج کلنی انتخاب شده و به لوله‌ای حاوی ۵ میلی‌لیتر نرمال سالین استریل منتقل شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد تا زمانی که کدورت سوسپانسیون به نیم‌مک‌فارلند برسد. یک سواب پنبه استریل را به سوسپانسیون باکتری آغشته کرده و برای توزیع یکنواخت باکتری‌ها در کل سطح محیط مولر هیتون استفاده شد. پلیت تلقیح شده برای مدت ۳-۵ دقیقه در دمای اتاق باقی ماند، تا خشک شود. سپس دیسک‌های کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی شامل: ایمی‌پنم (IMI) (10 µg) و ارتاپنم (Ert) (5 µg) از کلاس کارباپنم، سپیروفلوکساسین (CIP) (5 µg) از کلاس فلوروکینولون‌ها، اریترومایسین (E) (15 µg) از کلاس ماکرولیدها، آمیکاسین (AK) (10 µg) از کلاس آمینوگلیکوزیدها، تری منوپریم سولفامتوکسازول (SXT) (10 µg)، پیراسیلین-تازوباکتام (Pip-Taz) (10 µg) از کلاس پنی‌سیلین + مهارکننده، سفزازولین (CAZ) (30 µg) از کلاس سفالوسپورین‌ها و کلیستین سولفات (CO) (5 µg) از کلاس کلیستین‌ها (MAST, England) بر روی سطح پلیت قرار داده شد. باکتری *اسیتوباکتر بومانی* ATCC19606 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در این آزمون جدایه‌هایی که حداقل به ۳ کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاوم بودند به عنوان فنوتیپ MDR و جدایه‌هایی که علاوه بر مقاومت به ۳ کلاس آنتی‌بیوتیکی به یکی از کارباپنم‌ها مقاوم بودند، به عنوان فنوتیپ XRD

ترشحی T6SS در جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* مقاوم به چند دارو انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

الف) *جدایه‌های باکتریایی*: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، نمونه‌های بالینی به آزمایشگاه انتقال داده شد. هر نمونه روی محیط‌های مک‌کانکی آگار و بلادآگار کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. پس از ۲۴ ساعت، با روش مستقیم (رنگ آمیزی گرم) وجود کوکوباسیل‌های گرم منفی *اسیتوباکتر* به روش میکروسکوپی تایید شد. سپس، برای تشخیص گونه‌های مختلف *اسیتوباکتر* آزمون‌های بیوشیمیایی IMVIC، اوره‌آز، TSI، OF، MRVP، SIM، کاتالاز و اکسیداز و رشد در ۳۷ و ۴۲ درجه سلسیوس انجام شد. جدایه‌ها در منفی ۷۰ درجه سلسیوس در محیط پیتون واتر که حاوی ۳۰ درصد گلیسرول بود، نگه داری شد. به منظور تایید قطعی جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* در جدایه‌های مورد مطالعه، از آزمایش PCR در حضور زوج پرایمرهایی با ردیابی ژن 16S-23S ribosomal DNA استفاده شد (جدول ۱). برای این منظور، استخراج DNA از هر نمونه مطابق با پروتکل کیت استخراج DNA (سیناکلون، ایران) انجام شد. جذب نوری DNA استخراج شده جهت تعیین کیفیت، توسط دستگاه نانودراپ (thermo مدل NanoDrop One C آمریکا) خوانده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس ۲X (یکتاتجهیز آزما، ایران)، ۱ میکرولیتر از زوج پرایمرهای F و R و ۲ میکرولیتر از DNA مربوط به هر جدایه و ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، تنظیم شد. برنامه حرارتی مورد استفاده در این مرحله شامل یک سیکل واسرشت سازی اولیه (Primarydenaturation) ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه تکراری واسرشت سازی اولیه سیکل (Initial denaturation of the cycle) به مدت ۱ دقیقه و دمای ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال (Annealing) به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۹ درجه سلسیوس، گسترش (extension) در دمای ۷۲ درجه

شناسایی شدند.

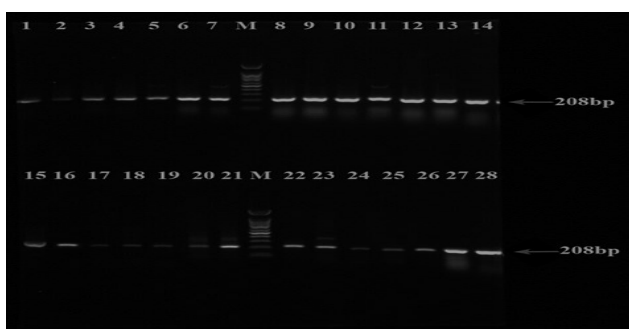
جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

نام ژن	توالی	اندازه محصول (bp)	دمای اتصال (c)
<i>hcp</i>	F: 5'- ATGAAGGACATCTACGTGGAAT -3' R: 5'- GCTGCGTAGCTGGCGGTAT -3'	501	58
<i>ompC</i>	F: 5'- ATGAGCATGAGCTACGACATGG -3' R: 5'- GAACTGGTACACCAGTCCCACG -3'	540	58
16S-23S ribosomal DNA	F: 5'- CATTATCACGGTAATTAGTG -3' R: 5'- AGAGCACTGTGCACTTAAG -3'	208	59

دارای واکنش لاکتوز منفی، غیر متحرک، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، اندول منفی، پیگمان منفی، اوره‌آز مثبت، سیترات مثبت، MR منفی و VP منفی بودند به عنوان جدایه‌های مشکوک به *اسیتوباکتر بامانی* جداسازی شد.

تمام جدایه‌های یاد شده به *اسیتوباکتر بامانی* به منظور تشخیص دقیق به روش PCR مورد سنجش قرار گرفتند. جذب نوری DNA با نسبت ۲۸۰/۲۶۰ بالای ۱/۷ دارای خلوص قابل قبول از نظر کیفیت DNA بود. نتایج شکل ۱ نشان داد که ۳۱ جدایه باند ۲۰۸ جفت بازی را تشکیل دادند که به عنوان جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* شناسایی شدند.

با وجود اینکه نتایج روش PCR با آزمون‌های بیوشیمیایی متفاوت بود، اما تجزیه و تحلیل آماری نتایج نشانگر عدم وجود اختلاف آماری معناداری بود.



شکل ۱: شناسایی مولکولی جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* به روش PCR و پرایمر اختصاصی *16S-23S ribosomal DNA*. مطابق با نتایج، ۳۱ جدایه باند ۲۰۸ جفت بازی که نشانگر جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* بود، را نشان داد. M: نشان دهنده مارکر DNA Ladder 100bp بود. جدایه شماره ۲۸ کنترل مثبت (ATCC19606) بود.

ج) ردیابی ژن‌های *hcp* و *ompC* در جدایه‌های دارای فنوتیپ مقاومت به روش *Multiplex PCR*: برای ردیابی ژن‌های *hcp* و *ompC* از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ به روش PCR استفاده شد. برای این منظور ابتدا DNA ژنومی از جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* جدا شده در مرحله قبل با استفاده از کیت یکتاتجهیز آزما (ایران) استخراج شد.

برای ردیابی ژن‌های مذکور واکنش PCR چندگانه‌ای (Multiplex PCR) در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۳۰ میکرولیتر مسترمیکس (یکتاتجهیز آزما، ایران)، ۱ میکرولیتر از زوج پرایمرهای F و R (مربوط به هر ژن)، ۲ میکرولیتر از DNA مربوط به هر نمونه و ۱۴ میکرولیتر آب مقطر استریل تنظیم شد. برنامه حرارتی مورد استفاده برای تکثیر قطعات ژنی فوق شامل یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۶ دقیقه، ۳۳ سیکل تکراری ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۸۰ ثانیه، ۵۸ درجه به مدت ۷۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۵ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود (۲۶) و (۲۷). برای تکثیر قطعات ژنی مورد مطالعه از دستگاه ترموسایکلر استفاده شد. به منظور ردیابی قطعه ژنی تکثیر یافته در PCR از الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز استفاده شد. در این مرحله ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR مربوط به هر مرحله از آزمایش در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاس - لیتوانی) روی ژل ۱ درصد آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت در حدود ۳۵ دقیقه الکتروفورز شد و پس از مشاهده ژل به دست آمده با دستگاه ترانس لومیناتور UV (UVitech انگلستان) تصویر به دست آمده ثبت شد.

د) تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از نتایج این مطالعه با نسخه شانزدهم نرم افزار SPSS و مدل‌های آماری مربع کای و دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد تحلیل شد.

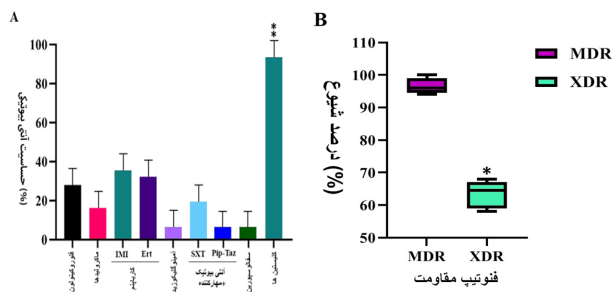
#### یافته‌ها

الف) شناسایی جدایه‌ها: باکتری‌های گرم منفی (۴۳ جدایه) که

جدول ۲: تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و فنوتیپ مقاومت آنتی‌بیوتیکی

جدایه / symbol	فلوروکینولون CIP (mm)	ماکرولید E (mm)	کارباپنم		آمینوگلیکوزید AK (mm)	آنتی‌بیوتیک + مهارکننده		سفالوسپورین CAZ (mm)	کلیستین CL (mm)	فنوتیپ
			Ert (mm)	IMI (mm)		Pip-Taz (mm)	SXT (mm)			
MDR	R(12)	S (15)	I (19)	S(23)	R(9)	S(16)	R(13)	R(11)	S(6)	MDR
MDR, XDR	R(9)	R(9)	R(9)	R(15)	R(9)	S(18)	I(18)	R(13)	S(7)	MDR, XDR
MDR	R(7)	R(12)	S(24)	S(23)	R(11)	R(7)	R(15)	R(10)	S(6)	MDR
MDR	R(12)	R(9)	S(28)	S(28)	I(13)	S(18)	R(15)	I (16)	S(8)	MDR
MDR, XDR	R(10)	R(7)	R(13)	R(15)	R(7)	S(17)	R(13)	R(12)	S(5)	MDR, XDR
MDR	R(8)	R(11)	S(25)	S(24)	R(6)	R(9)	R(16)	R(9)	S(7)	MDR
MDR	R(11)	R(6)	S(27)	S(23)	R(7)	R(5)	R(12)	R(7)	S(7)	MDR
MDR, XDR	R(13)	R(6)	R(12)	R(13)	R(9)	R(6)	R(14)	R(10)	I(3)	MDR, XDR
MDR, XDR	R(10)	R(10)	R(14)	R(9)	R(5)	R(5)	R(8)	R(12)	R(2)	MDR, XDR
MDR	R(12)	R(9)	S (23)	S(26)	R(7)	R(7)	R(15)	R(14)	S(7)	MDR
MDR, XDR	R(14)	R(8)	R(10)	R(13)	R(8)	R(10)	R(16)	R(11)	S(5)	MDR, XDR
MDR, XDR	S(17)	S(16)	R(12)	I (19)	S(16)	R(8)	I(19)	I(16)	S(6)	MDR, XDR
MDR, XDR	S(19)	S(19)	R(14)	R(14)	I(12)	I(12)	S(23)	I(15)	S(7)	MDR, XDR
MDR	R(14)	S (15)	S(26)	S (26)	R(8)	R(7)	R(13)	S (19)	S(8)	MDR
MDR, XDR	R(13)	R(6)	R(17)	R(17)	R(7)	R(9)	R(15)	R(14)	S(7)	MDR, XDR
MDR, XDR	R(10)	R(6)	R(10)	R(10)	R(5)	R(9)	R(11)	R(13)	S(4)	MDR, XDR
MDR, XDR	R(7)	R(12)	R(13)	R(13)	R(11)	R(7)	R(15)	R(10)	S(6)	MDR, XDR
MDR, XDR	R(12)	R(9)	R(10)	R(17)	I(13)	S(18)	R(15)	I (16)	S(8)	MDR, XDR
MDR	R(10)	R(7)	S(22)	S(25)	R(7)	S(17)	R(13)	R(12)	S(5)	MDR
MDR, XDR	R(8)	R(11)	R(10)	R(16)	R(6)	R(9)	R(16)	R(9)	R(2)	MDR, XDR
MDR, XDR	R(11)	R(6)	R(10)	R(12)	R(7)	R(5)	R(12)	R(7)	S(7)	MDR, XDR
MDR, XDR	R(13)	R(6)	R(12)	R(13)	R(9)	R(6)	R(14)	R(10)	S(8)	MDR, XDR
MDR, XDR	R(10)	R(10)	R(14)	R(9)	R(5)	R(5)	R(8)	R(12)	S(3)	MDR, XDR
MDR	R(12)	R(9)	S (20)	S(24)	R(7)	R(7)	R(15)	R(14)	S(7)	MDR
MDR, XDR	R(14)	R(8)	R(10)	I (19)	R(8)	R(10)	R(16)	R(11)	S(5)	MDR, XDR
MDR, XDR	S(17)	S(16)	R(12)	R(16)	S(16)	R(8)	I(19)	I(16)	S(6)	MDR, XDR
MDR	S(19)	R(12)	S(23)	S(26)	I(12)	I(12)	S(23)	I(15)	S(7)	MDR
MDR, XDR	R(14)	S (15)	R(12)	R(12)	R(8)	R(7)	R(13)	S (19)	S(8)	MDR, XDR
MDR	R(13)	R(6)	S(22)	S(23)	R(7)	R(9)	R(15)	R(14)	S(7)	MDR
MDR, XDR	R(10)	R(10)	R(12)	R(10)	R(5)	R(9)	R(11)	R(13)	S(4)	MDR, XDR
MDR, XDR	R(10)	R(10)	I (19)	R(9)	R(5)	R(5)	R(8)	R(12)	I(3)	MDR, XDR
حساسیت										
93.55%    6.45%    6.45%    19.35%    6.45%    32.25%    35.48%    16.1%    12.9%										

فلوروکینولون‌ها، سفالوسپورین‌ها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها و آنتی‌بیوتیک و مهارکننده کمترین میزان حساسیت را علیه *اسیتوباکتر بامانی* ایجاد کردند.



شکل ۲: (A) نتایج مربوط به درصد حساسیت *اسیتوباکتر بامانی* به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی: ۵ کلاس آنتی‌بیوتیکی حساسیت زیر ۴۰٪ ایجاد کردند. (B) درصد شیوع فنوتیپ MDR و XDR در جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* نشان دهنده فراوانی بالای ۶۰٪ فنوتیپ XDR می‌باشد. \*P<0.05, \*\*P<0.01

ب) تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی: آزمون حساسیت در حضور شایع‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک انجام شد (جدول ۲). همان‌گونه که در جدول ۲ ملاحظه می‌گردد، ۱۰۰ درصد جدایه‌ها فنوتیپ MDR را نشان دادند که بیان‌کننده شیوع گسترده مقاومت چند دارویی در *اسیتوباکتر بامانی* می‌باشد. اما تنها ۱۱ جدایه (۳۵/۴۸٪) نسبت به کارباپنم‌ها حساسیت نشان دادند. نتایج نشان داد که ۲۰ جدایه (۶۴/۵۲٪) علاوه بر فنوتیپ MDR، فنوتیپ XDR را نشان دادند.

مطابق با شکل ۲، تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات مربوط به جدول بالا نشانگر وجود اختلاف آماری معنادار بین تمام کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی با کلاس آنتی‌بیوتیکی کلیستین می‌باشد. جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* حساسیت ۹۳/۵۵٪ به کلیستین سولفات نشان دادند (P<0.01). پنج کلاس آنتی‌بیوتیکی

**جدول ۳:** توزیع ژن‌های کدکننده مکانیسم‌های ترشحی در جدایه‌های *اسیتوباکتر بومانی*

کل نمونه	Hcp	ompC	فنوتیپ / ژن
31	18(%58)	31(%100)	MDR
20	18(%90)	20(%100)	XDR

در بررسی فراوانی و ارتباط آماری بین جدایه‌های MDR و XDR با ژن *ompC* و *hcp* مشخص شد که رابطه مستقیم بین فنوتیپ MDR و ژن‌های مذکور وجود دارد. همچنین مشخص شد که بین ژن *hcp* و فنوتیپ XDR در جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* همبستگی وجود دارد، به گونه‌ای ۹۰٪ جدایه‌هایی که دارای ژن *hcp* بودند به کارباینها مقاوم بودند. این نتایج نشان دهنده تاثیر احتمالی ژن *hcp* در سازگاری جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* با شرایط نامساعد و بروز فنوتیپ مقاومت می‌باشد.

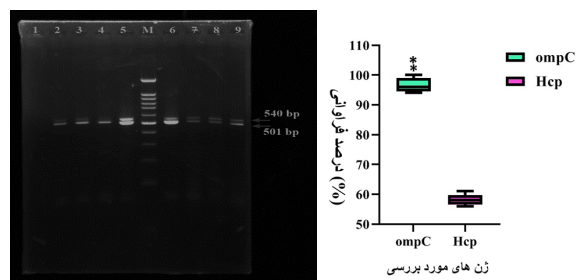
### بحث

امروزه گسترش مکانیسم‌های مقاومت باکتریایی و ژن‌های موثر در این مکانیسم‌ها با ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی چندگانه به مشکل مهمی در درمان عفونت‌های حاصل از *اسیتوباکترها* تبدیل شده است (۲۸). مطالعات مختلف نشان داده که *اسیتوباکتر بامانی* به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و کینولون‌ها مقاوم بوده و مقاومت آن به آمینوگلیکوزیدها نیز در حال افزایش است (۲۹). مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* با دو روش معمول آنتی‌بیوگرام و ردیابی ژن‌های کدکننده مکانیسم‌های موثر در مقاومت (به روش PCR) انجام گرفت و مشخص شد که تمام جدایه‌های مورد بررسی دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه بوده‌اند و به کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی فلوروکینولون‌ها، سفالوسپورین‌ها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها و آنتی‌بیوتیک و مهارکننده مقاوم هستند؛ اما تقریباً ۹۴٪ آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک کلیستین سولفات حساس بودند که در مطالعه انجام شده توسط ساکا (Sacco) و همکاران (۲۰۲۱) این امر به اثبات رسیده و آن‌ها نیز حساسیت جدایه‌های *اسیتوباکتر* به

از طرفی ۲ جدایه (۶/۴۵٪) نسبت به آنتی‌بیوتیک کلیستین سولفات به عنوان آخرین سد دفاعی دارویی مقاوم بودند که نشان دهنده عدم کارایی درمان‌های آنتی‌بیوتیکی فعلی می‌باشد.

این نتایج نشان می‌دهد که مقاومت فراگیر این باکتری نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها است، و باید مطالعات لازم در مورد شناسایی مکانیسم‌های حدت این باکتری جهت ارایه راهکارهای دیگر مبارزه مانند واکسیناسیون، انجام شود.

(ج) نتایج ردیابی ژن‌های *hcp* و *ompC* در جدایه‌های دارای فنوتیپ مقاومت: حضور ژن‌های کدکننده مکانیسم‌های ترشحی T6SS و پورین غشایی موثر در مقاومت به آنتی‌بیوتیک به روش PCR چندگانه‌ای بررسی شدند. همان گونه که در شکل ۳ قابل مشاهده است، حضور ژن *hcp* در ۱۸ جدایه (۵۸٪) و *ompC* در ۳۱ جدایه (۱۰۰٪) تایید شد. تحلیل آماری اطلاعات فوق، نشانگر وجود اختلاف آماری معنادار بین فراوانی حضور ژن‌های *hcp* (58%) و *ompC* (100%) بود ( $P < 0.01$ ).



**شکل ۳:** بررسی حضور ژن‌های *ompC* و *hcp* در ۳۱ جدایه *اسیتوباکتر بومانی* نشان دهنده شیوع ۱۰۰٪ ژن *ompC* و ۵۸٪ ژن *hcp* بود. نتایج در سطح  $P < 0.01$ \*\* معنادار بود. شماره (۱) کنترل منفی.

M: مارکر DNA Ladder 100bp

مطابق با نتایج جدول ۳، فراوانی ژن *ompC* در جدایه‌های MDR و XDR برابر با ۱۰۰٪ بود. اما ژن *hcp* تنها در جدایه‌های با فنوتیپ XDR با فراوانی ۹۰٪ مشاهده شد. شیوع ۹۰ درصدی ژن *hcp* در جدایه‌های XDR نسبت به شیوع ۵۸٪ در جدایه‌های MDR نشان دهنده تاثیر احتمالی این ژن در بروز فنوتیپ XDR در *اسیتوباکتر بومانی* می‌باشد.

مربوط بود. در مقابل کمترین مقاومت نسبت به کلیستین با پراکنش ۶/۵ درصدی مشاهده شد. در این پژوهش آنتی‌بیوتیک کلیستین سولفات فعالیت آنتی‌باکتریال بهتری نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها از خود نشان داد؛ هر چند خود نیز با مقاومت ۶/۵٪ مواجه می‌باشد. کلیستین سولفات آخرین آنتی‌بیوتیک موجود برای درمان عفونت‌های ناشی از *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به چند دارو است که در دهه گذشته مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. این آنتی‌بیوتیک همواره یک گزینه بسیار مهم درمانی برای *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم در برابر کارباپنم‌ها بوده است که با توجه به نتایج این مطالعه باکتری *اسینتوباکتر بامانی* در حال تطابق با آن می‌باشد. با افزایش ظهور مقاومت در برابر کلیستین، گزینه‌های درمانی در برابر این پاتوژن محدودتر می‌شود. از این رو استفاده از ترکیبات آنتی‌باکتریال جدید و یا مکانیسم‌های مبارزه متفاوت مانند استفاده از واکسیناسیون، شناسایی عوامل حدت و ردیابی ژن‌های مکانیسم‌های ترشحی موثر در مقاومت حایز اهمیت است. در این مطالعه ردیابی ژن‌های کدکننده مکانیسم‌های ترشحی دخیل در مقاومت انجام شد. ژن‌های *ompC* و *hcp* به ترتیب فراوانی ۱۰۰٪ و ۵۸٪ در بین جدایه‌های MDR داشتند. ژن *hcp* شایع‌ترین ژن ردیابی شده در جدایه‌های مورد مطالعه با فنوتیپ XDR و فراوانی ۹۰٪ بود. روییز (Ruiz) و همکاران (۲۰۱۵) ساختار کریستالی *hcp* را به عنوان مؤلفه‌ای از نوع سیستم ترشح VI در جدایه‌های *اسینتوباکتر بامانی* بررسی کردند. ساختار این پروتین یک ساختار باریک متشکل از دو ورق  $\beta$  بوده و در یک طرف آن مارپیچ  $\alpha$ -کوتاه وجود دارد. شش مولکول *hcp* برای تشکیل یک هگزامر در ساختار کریستالی قرار می‌گیرند. ساختار ارائه شده در مطالعه این گروه اولین مورد برای تشکیل بخشی از پروتین عملکردی سیستم T6SS از *اسینتوباکتر بامانی* است. نتایج این گروه به درک مکانیسم و عملکرد این سیستم ترشحی در این پاتوژن بیمارستانی فرصت طلب کمک کرده و به بروز فنوتیپ XDR توسط این مکانیسم اشاره دارد (۳۸). تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک و اپیدمیولوژیکی جدایه‌های *اسینتوباکتر*

کلیستین سولفات را گزارش کرده‌اند (۳۰). در مطالعه‌ای که توسط اسماعیل‌زاده آشینینی (Esmailzadeh Ashini) و همکاران (۲۰۱۸) انجام گرفت مشخص شد که بیشترین مقاومت در بین جدایه‌های *اسینتوباکتر بامانی* مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین از گروه فلوروکینولون‌ها بود. همچنین شیوع ژن‌های دخیل در مکانیسم مقاومت در این بررسی در حال افزایش بودند (۳۱). مطالعه‌ای که توسط لاوریننکو (Lavrinenko) و همکاران (۲۰۲۱) به منظور بررسی ویژگی‌های اپیدمیولوژیک جدایه‌های *اسینتوباکتر بامانی* انجام گرفت، نشان داد که از ۷۸٪ جدایه‌های *اسینتوباکتر بامانی* مورد بررسی، به کارباپنم مقاوم بودند که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (۳۲). در مطالعه‌ای که توسط محمودی (Mahmoudi) و همکاران (۲۰۲۰) به منظور بررسی عفونت‌های ناشی از *اسینتوباکتر بامانی* با مقاومت دارویی چندگانه در ایران انجام گرفت مشخص شد که ۹۰ درصد جدایه‌ها به ایمی‌پنم و سیپروفلوکساسین مقاوم می‌باشند (۳۳). در مطالعه کاستیانی (Kostyanev) و همکاران (۲۰۲۱) شیوع مقاومت به کارباپنم در *اسینتوباکتر بامانی* گزارش شد (۳۴). مطالعات آرمین (Armin) و همکاران (۲۰۱۵)، شمسی‌زاده (Shamsizadeh) و همکاران (۲۰۱۷) و وهابی (Vahhabi) و همکاران (۲۰۲۱) نشان دهنده افزایش شیوع مقاومت به کارباپنم‌ها و بروز فنوتیپ XDR از سال ۲۰۱۵ تا ۲۰۲۱ در ایران می‌باشد (۳۵ و ۳۶ و ۳۷). در مطالعه حاضر نیز تنها ۳۴ درصد جدایه‌ها به کلاس آنتی‌بیوتیکی کارباپنم‌ها حساس بودند که در این مورد نتایج پژوهش حاضر با نتایج پژوهش‌های پیشین مطابقت دارد و بیان‌کننده شیوع جدایه‌های XDR می‌باشد. این شواهد نشان می‌دهد که با توجه به ظهور و گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های XDR در سال‌های اخیر در ایران بسیار گسترش یافته‌اند. در مطالعه پیش رو، مقاومت جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی بررسی شد و بیشترین مقاومت با پراکنش ۹۳ درصدی به کلاس‌های سفالوسپورین و آمینوگلیکوزیدها



بیشتر جدایه‌های *Acinetobacter* به سفالوسپورین‌های نسل سوم مقاوم و به کلیستین حساس هستند. با توجه به این که در کشور ما مطالعات کمی در رابطه با ویژگی‌های اپیدمیولوژیک و الگوی مقاومت دارویی جدایه‌های *Acinetobacter baumannii* انجام گرفته است، توجه به نقش این باکتری به عنوان یک عامل بالقوه خطرناک در عفونت‌های بیمارستانی ضروری به نظر می‌رسد.

### ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد کمال امتنان و تشکر را دارند.

### تعارض منافع

وجود ندارد.

و جونز (Jones) و همکاران (۲۰۱۵) نشان می‌دهد که ژن *hcp* دخیل در سیستم خوشه‌ای T6SS تنها در جمعیت‌های خاصی وجود دارد که مکانیسم جدیدی از مقاومت را بروز می‌دهند (۳۹ و ۴۰). همچنین مطالعات ریپزا (Repizo) و همکاران (۲۰۱۷) نشان دهنده افزایش شیوع ژن *hcp* و شناسایی آن در تقریباً یک سوم جدایه‌های مورد مطالعه (۳۲٪) بود (۴۱). از طرفی در مطالعات تیان (Tian) و همکاران (۲۰۲۰) جهش‌هایی در سایت‌های اختصاصی ژن *ompC* در جدایه‌های مقاوم به کاربایم با فنوتیپ XDR مشاهده شد که همبستگی این ژن را با افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلاس کاربایم گزارش کرد (۴۲).

### نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر در جهت تکمیل مطالعات پیشین نشان دهنده افزایش شیوع جدایه‌های دارای مکانیسم T6SS از ۳۲٪ در سال ۲۰۱۷ به ۵۸٪ در سال ۲۰۲۱ می‌باشد. همچنین حضور ۹۰٪ ژن *hcp* در جدایه‌های با فنوتیپ XDR نمی‌تواند تصادفی بوده باشد و از وجود همبستگی بین شیوع این ژن و بروز فنوتیپ XDR گزارش می‌دهد. در پایان به این موضوع باید اشاره کرد که آنچه در بیشتر مطالعات به چشم می‌خورد، این است که

## References

1. Basatian-Tashkan B, Niakan M, Khaledi M, Afkhami H, Sameni F, Bakhti S. Antibiotic resistance assessment of *Acinetobacter baumannii* isolates from Tehran hospitals due to the presence of efflux pumps encoding genes (*adeA* and *adeS* genes) by molecular method. BMC Research Notes. 2020; 13(1):1-6.
2. Almasaudi SB. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi journal of biological sciences. 2018; 25(3):586-96.
3. Gong Y, Shen X, Huang G, Zhang C, Luo X, Yin S, et al. Epidemiology and resistance features of *Acinetobacter baumannii* isolates from the ward environment and patients in the burn ICU of a Chinese hospital. Journal of Microbiology. 2016; 54(8):551-8.
4. Zheng Y, Xu N, Pang J, Han H, Yang H, Qin W. Colonization with extensively drug-resistant *Acinetobacter Baumannii* and prognosis in critically ill patients: an observational cohort study. Frontiers in Medicine. 2021; 8:550-558.

5. Li Y, Ge H, Zhou H, Zhou W, Zheng J, Chen W. Impact of environmental cleaning on the colonization and infection rates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in patients within the intensive care unit in a tertiary hospital. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2021; 10(1):1-9.
6. Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens*. 2021; 10(3):373.
7. Lowe M, Ehlers MM, Ismail F, Peirano G, Becker PJ, Pitout JD, et al. *Acinetobacter baumannii*: epidemiological and beta-lactamase data from two tertiary academic hospitals in Tshwane, South Africa. *Frontiers in microbiology*. 2018; 9:1280.
8. Kim, Uh Jin. Update on the epidemiology, treatment, and outcomes of carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. *Chonnam medical journal*. 2014; 1: 37-44.
9. Nourbakhsh F, Nourbakhsh V, Jafakesh MT. Prevalence of class I, II and III integrons in the antibiotic-resistant isolates of *A. baumannii* detected from patients hospitalized in medical centers of Shahrekord. *KAUMS Journal (FEYZ)*. 2016; 20(5):461-8.
10. Asadi Jouybari M, Goli HR. Frequency of MDR and XDR Strains and Antibiotic Resistance Pattern of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates in Sari Hospitals, Iran. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2020; 30(188):89-99.
11. Babapour E, Haddadi A, Mirnejad R, Angaji SA, Amirmozafari N. Study of drug resistance and ompA gene existence in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *Iranian journal of medical microbiology*. 2017; 11(1):30-8.
12. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nature Reviews Microbiology*. 2018; 16(2):91-102.
13. Weber BS, Kinsella RL, Harding CM, Feldman MF. The secrets of *Acinetobacter* secretion. *Trends Microbiol*. 2017; 25(7):532-45.
14. Monjaras Feria J, Valvano MA. An overview of anti-eukaryotic T6SS effectors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020; 10:601-617.
15. Weber BS, Miyata ST, Iwashkiw JA, Mortensen BL, Skaar EP, Pukatzki. Genomic and functional analysis of the type VI secretion system in *Acinetobacter*. *PloS one*. 2013; 8(1): e55142.
16. Weber BS, Hennon SW, Wright MS, Scott NE, de Berardinis V, Foster LJ, et al. Genetic Dissection of the Type VI Secretion System in *Acinetobacter* and identification of a novel peptidoglycan hydrolase, TagX, required for its biogenesis. *MBio*. 2016; 7: e01253-16;
17. Repizo GD. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* strains expressing the Type 6 secretion system in patients with bacteremia. *Virulence*. 2017; 8(7):1099-101.
18. Jaffe AL, Chabbert YA, Semonin OL. Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of beta-lactams. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1982; 22(6):942-8.

19. Bafna JA, Sans-Serramitjana E, Acosta-Gutiérrez S, Bodrenko IV, Hörömpöli D, Berscheid A, et al. Kanamycin uptake into *Escherichia coli* is facilitated by OmpF and OmpC porin channels located in the outer membrane. *ACS infectious diseases*. 2020; 6(7):1855-65.
20. Tang RJ, Luan M, Wang C, Lhamo D, Yang Y, Zhao FG. Plant membrane transport research in the post-genomic era. *Plant Communications*. 2020; 1(1):100013.
21. Kim SW, Lee JS, Park SB, Lee AR, Jung JW, Chun JH. The importance of Porins and  $\beta$ -lactamase in outer membrane vesicles on the hydrolysis of  $\beta$ -lactam antibiotics. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21(8):2822.
22. Fernández L, Hancock RE. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical microbiology reviews*. 2012; 25(4):661-81.
23. McNeilly O, Mann R, Hamidian M, Gunawan C. Emerging Concern for Silver Nanoparticle Resistance in *Acinetobacter baumannii* and Other Bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12.
24. Masi M, Pagès JM. Structure, function and regulation of outer membrane proteins involved in drug transport in Enterobacteriaceae [sic]: the OmpF/C-TolC case. *Open Microbiol. J*. 2013; 7: 22–33.
25. Chiang MC., Kuo SC., Chen YC., Lee YT., Chen TL., Fung CP. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Acinetobacter baumannii* in endotracheal aspirates from patients in the intensive care unit. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2011; 44(2): 106- 10.
26. Van TT., Chin J., Chapman T., Tran LT., Coloe PJ. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 124(3): 217- 23.
27. Xiang Q, Hu S, Ke Y, Hu S. Multiplex PCR for detection of MCR genes in clinical fecal samples. *InE3S Web of Conferences* 2021; 269: 01019.
28. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*. 2018; 4(3):482.
29. Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens*. 2021; 10(3):373.
30. Sacco F, Visca P, Runci F, Antonelli G, Raponi G. Susceptibility Testing of Colistin for *Acinetobacter baumannii*: How Far Are We from the Truth? *Antibiotics* 2021; 10: 48.
31. Esmaeilzadeh Ashini E, Amini K. Isolation of tetD, tetC, tetB, tetA genes from *Acinetobacter bummani* samples isolated from hospital samples by multiplex PCR method. *medical journal of mashhad university of medical sciences*. 2018; 60(6):734-42.

32. Lavrinenko A, Sheck E, Kolesnichenko S, Azizov I, Turmukhambetova A. Antibiotic Resistance and Genotypes of Nosocomial Strains of *Acinetobacter baumannii* in Kazakhstan. *Antibiotics*. 2021;10(4):382.
33. Mahmoudi H, Zare Fahim N, Alikhani MY, Shokoohezadeh L. Investigation of Antimicrobial Effect of Berberine on Ciprofloxacin and Imipenem Resistance *Acinetobacter baumannii* Isolated from Hamadan Hospitals. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2020; 14(1): 44-54.
34. Kostyanev T, Xavier BB, García-Castillo M, Lammens C, Acosta JB, Rodríguez-Baño J, et al. Phenotypic and molecular characterizations of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected within the EURECA study. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2021; 57(6):106345.
35. Armin S, Karimi A, Fallah F, Rafiei Tabatabaie S, Hoseini Alfatemi SM, Khiabanirad P, et al. Antimicrobial resistance patterns of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolated from patients with nosocomial infections admitted to tehran hospitals. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*. 2015; 3(4).
36. Shamsizadeh Z, Nikaeen M, Esfahani BN, Mirhoseini SH, Hatamzadeh M, Hassanzadeh A. Detection of antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospital environments: potential sources for transmission of *Acinetobacter* infections. *Environmental health and preventive medicine*. 2017; 22(1):1-7.
37. Vahhabi A, Hasani A, Rezaee MA, Baradaran B, Hasani A, Kafil HS, et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from northwest Iran: high prevalence of OXA genes in sync. *Iranian Journal of Microbiology*. 2021; 13(3):282-93.
38. Ruiz FM, Santillana E, Spínola-Amilibia M, Torreira E, Culebras E, Romero A. Crystal structure of Hcp from *Acinetobacter baumannii*: a component of the type VI secretion system. *PloS one*. 2015; 10(6): e0129691.
39. Wright MS, Haft DH, Harkins DM, Perez F, Hujer KM, Bajaksouzian S, et al. New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *mBio* 2014; 5: e00963-13.
40. Jones CL, Clancy M, Honnold C, Singh S, Snedrud E, Onmus-Leone F, et al. Fatal outbreak of an emerging clone of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* with enhanced virulence. *Clin Infect Dis* 2015; 61:145-54.
41. Repizo GD. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* strains expressing the Type 6 secretion system in patients with bacteremia. *Virulence*. 2017; 8(7):1099-101.
42. Tian X, Zheng X, Sun Y, Fang R, Zhang S, Zhang X, et al. Molecular mechanisms and epidemiology of carbapenem-resistant *Escherichia coli* isolated from Chinese patients during 2002–2017. *Infection and drug resistance*. 2020; 13:501.