

شناسایی مولکولی همزمان ژن های مقاومت سولفانامیدی و اینتگرون در پروتئوس میرابیلیس جدا شده از نمونه های ادراری به روش PCR چند گانه و الگوی مقاومت آنتی بیوتیک آن ها

شیمیا احمدی نژاد^۱، کیومرث امینی^{۲*}

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
^۲ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۹/۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۴

چکیده

زمینه و هدف ها: پروتئوس میرابیلیس یکی از عوامل شایع در عفونت های مجرای ادراری (UTI) و گاهی باکتری می باشد. هدف از مطالعه حاضر شناسایی مولکولی ژن های *intI* و *sul* در سویه های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از ادرار بوسیله Multiplex-PCR و بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی این سویه ها می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۲۹۲ نمونه ادرار از بیماران دارای عفونت ادراری بدست آمد. آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش انتشار از ژل و مطابق دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه و بالین (CLSI) بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد. سپس multiplex-PCR برای شناسایی ژن های *intI* و *sul* با استفاده از توالی های الیگونوکلوئیدی ویژه انجام شد.

یافته ها: نتایج تست های روتین بیوشیمیایی و میکروبیولوژی نشان داد که از مجموع ۲۹۲ نمونه ادرار تحت مطالعه، ۶۰ نمونه پروتئوس میرابیلیس بدست آمد. بیشترین میزان حساسیت به آمیکاسین (۱۰۰٪) و جنتامایسین (۹۸/۳٪) مشاهده شد. همچنین ۱۰٪ سویه ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. نتایج آزمون مولکولی نشان داد که بیشترین و کمترین شیوع به ترتیب مربوط به ژن های *intI* و *sul* با پراکندگی ۸۱/۲٪ و ۲۵٪ بود.

نتیجه گیری: با توجه به نقش اینتگرون در گسترش فاکتورهای مقاومتی و فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های پروتئوس میرابیلیس، توجه به مدیریت صحیح در مصرف آنتی بیوتیک ها و اتخاذ تدابیر لازم در رعایت استانداردهای بهداشتی می تواند در جلوگیری از گسترش مقاومت موثر باشد.

کلمات کلیدی: پروتئوس میرابیلیس، *intI* و *sul* و multiplex-PCR.

نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه

۰۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴

Email: dr_kumarss_amin@yahoo.com

مقدمه

پروتئوس ها باسیل های گرم منفی از گروه پروتئوباکتريا، پلی مورف دارای فلاژل، متحرک و هوازی و بیهوازی اختیاری هستند^۱. پروتئوس در انسان گاه موجب عفونت ادراری و عفونت زخم می شود (۹۰٪ پروتئوس میرابیلیس). همچنین آنزیم اوره آز این باکتری در تشکیل سنگ های کلیوی از جنس استروویت مؤثر است^۲. پروتئوس ها به آمپی سیلین و سفالوسپورین ها حساسند. سه گونه پروتئوس ولگاریس، پروتئوس میرابیلیس و پروتئوس پتری پاتوژن های فرصت طلب انسانی هستند. پروتئوس شامل گروه پاتوژن هایی است که عامل بسیاری از عفونت ها در انسان می باشد. بیشتر سویه های پروتئوس میرابیلیس در بین افراد جامعه به آمپی سیلین و سفالوسپورین حساس می باشند. پروتئوس ولگاریس به آنتی بیوتیک ها حساس نیست^۳. با این وجود این ارگانسم معمولاً تنها افرادی را که از لحاظ سیستم دفاعی ضعیف هستند هدف قرار می دهد. حدوداً ۱۰ تا ۱۵٪ سنگ های کلیوی سنگ هایی هستند که به دلیل قلیایی شدن ادرار در اثر عمل آنزیم اوره آز (که اوره را به آمونیاک و CO₂ تجزیه می کند) به وسیله پروتئوس و دیگر باکتری ها بوجود می آید. پروتئوس همچنین در زیستگاه های محیطی متفاوتی از قبیل درمانگاه های پرستاری با مراقبت های طولانی مدت و بیمارستان ها یافت می شوند. در محیط بیمارستان غیر طبیعی نیست که باکتری های گرم منفی هم در پوست و هم در مخاط دهان بیماران و کارکنان کلونیزه شوند و عفونت به صورت اولیه در این قسمت ها وجود دارد. با این وجود، گونه های پروتئوس عمدتاً عامل عفونت بیمارستانی محسوب نمی شوند^۴. پروتئوس میرابیلیس مسئول ایجاد ۹۰٪ از عفونت های ناشی از پروتئوس می باشد و می تواند به عنوان یک عفونت همه گیر محسوب شود. پروتئوس ولگاریس و پروتئوس پتری به سادگی از افراد در بیمارستان ها و اماکن با مراقبت طولانی مدت و از بیماران مبتلا به بیماری های حاد مانند سپتی سمی یا دارای سیستم دفاعی ضعیف جدا می شوند. عفونت های ناشی از پروتئوس میرابیلیس اغلب در بیماران بستری در بیمارستان که به آن ها سوند وصل شده است دیده می شود^۵. این عفونت معمولاً توسط تجهیزات پزشکی از جمله سوند، ونتیلاتور و دستکش معاینه به بیماران منتقل می شوند.

مطالعات متعددی در زمینه تولید بیوفیلم در سویه های مختلف بیمارستانی پروتئوس وجود دارد. این مطالعات نشان می دهد که جنس پروتئوس قادر به ایجاد بیوفیلم روی سطوح پلی استیرن، لاتکس و سیلیکون و همچنین روی سطوح بیولوژیک مانند بافت کلیه، مثانه و همچنین زخم می باشد. این میکروب به هر دو صورت بیوفیلم خالص و میکس یافت می شود. مطالعات نشان داده است که فلاژل این باکتری نقش مهمی در ایجاد بیوفیلم بر روی سطوح جدید دارد^۶. نکته مهم اینکه این باکتری با تشکیل بیوفیلم خود را از اثرات تخریبی آنتی بیوتیک ها مصون می نماید. معمولاً سویه های مولد بیوفیلم مقاومت به داروهای متعددی را از خود نشان می دهند. همچنین تشکیل بیوفیلم در عفونت زخم ایجاد شده توسط پروتئوس سبب مقاومت آن ها به آنتی سبتیک های روتین شده و کمک به انتشار این باکتری ها در نسوج زخمی می نماید. همچنین سویه های مولد بیوفیلم نقش مهمی در عفونت های بیمارستانی مقاوم به چند دارویی پروتئوس از طریق انتقال ژن مقاومت به دارو دارند^{۷،۸}. بیشتر سویه های بیمارستانی پروتئوس، قادر به ایجاد بیوفیلم هستند. تشکیل بیوفیلم یکی از مهمترین فاکتورهای ویروالانس این باکتری ها محسوب می شود^۹. از سوی دیگر در سال های اخیر استفاده از داروهای ضد میکروبی سولفونامیدها و تری متوپریم برای درمان عفونت مجاری ادراری در اکثر کشورها در حال افزایش است و استفاده بیش از حد مجاز از این داروها منجر به ایجاد مقاومت و ناموفق بودن درمان شده است. ظهور و گسترش مقاومت های آنتی بیوتیکی خصوصاً در خانواده انتروباکتریاسه به یک مشکل جهانی تبدیل شده است^{۱۰}. گسترش مقاومت های آنتی بیوتیکی از طریق انتقال افقی ژن ها، منجر به ظهور سریع مقاومت های آنتی بیوتیکی در بین باکتری ها شده است. کسب ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی می تواند از طریق عناصر ژنتیکی متحرک مانند پلاسمیدها، ترانسپوزون ها و ایتنگرون ها صورت پذیرد^{۱۱}. بنابراین با توجه به افزایش مقاومت به سولفانامیدها و مقاومت های دارویی وابسته به ایتنگرون ها در پروتئوس و اهمیت بیمارزایی آن، هدف ما در این مطالعه بررسی مولکولی همزمان ژن های مقاومت سولفانامیدی و ایتنگرون در پروتئوس میرابیلیس جدا شده از نمونه های ادراری به روش PCR چند گانه و الگوی مقاومت آنتی بیوتیک آنها می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی (Cross-sectional) تعداد ۶۰ نمونه پروتئوس میرابیلیس جدا شده از ۲۹۲ بیمار مبتلا به عفونت دستگاه ادراری نمونه ادراری از افراد مبتلا به عفونت دستگاه ادراری جمع‌آوری گردید. نمونه های دارای 10^5 یا بیشتر از باکتری به عنوان عفونت ادراری در نظر گرفته شد. پروتئوس بر روی محیط مک کانکی و EMB کلنی های لاکتوز منفی (بی رنگ) را تولید نمود. تست های روتین بیوشیمیایی و میکروبیولوژیک شناسایی شدند. برای تایید تشخیص روی کلنی های مشکوک صورت گرفت. استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری Invitex (آلمان) انجام شد. پس از استخراج، مقدار غلظت DNA با استفاده از دستگاه HITACHI مدل U1800 (آلمان) طبق دستور العمل سازمان جهانی بهداشت خوانده شد و از غلظت استاندارد ۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر از ژنوم استخراج شده در همه واکنش ها استفاده شد. در مرحله بعدی پرایمرها طراحی و به شرکت پیشگام سفارش داده

شد. پس از BLAST آغازگرهای انتخاب شده در سایت NCBI واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر 5X PCR master mix (سیناکلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (0.05 U/μl)، MgCl₂ (3 mM) و dNTPs (0.4mM)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانو گرم) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۴ سیکل به صورت زیر انجام گرفت؛ با انتخاب برنامه مرتبط به صورت ذیل عمل گردید: گام اول و اسرشت ثانویه ۹۴ درجه سانتیگراد ۵۰ ثانیه، گام دوم اتصال آغازگر ۵۶ درجه برای ۳۰ ثانیه، گام سوم بسط اولیه ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۲ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. در پایان، محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (۰.۵ μg/ml) الکتروفورز گردید.

جدول ۱: شرایط M-PCR

مراحل	دما (درجه سلسیوس)	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه
<i>Initial denaturation</i>	۹۴	۳۰۰	۱
<i>Denaturation</i>	۹۴	۱۵	۳۱
<i>Annealing</i>	۶۹	۳۰	۳۱
<i>Extension</i>	۷۲	۶۰	۳۱
<i>Final Extension</i>	۷۲	۴۲۰	۱

جدول ۲: نحوه تهیه مخلوط واکنش PCR

اجزای واکنش	غلظت	حجم (میکرولیتر)
DNA Template	-	۱
Master Mix & Taq DNA polymerase & dNTP & MgCl ₂	x۲	۹/۵
Of each primers	۱۰ (pmol)	۰/۵
DW	-	۱۰/۵
Total Volume	-	۲۱/۵

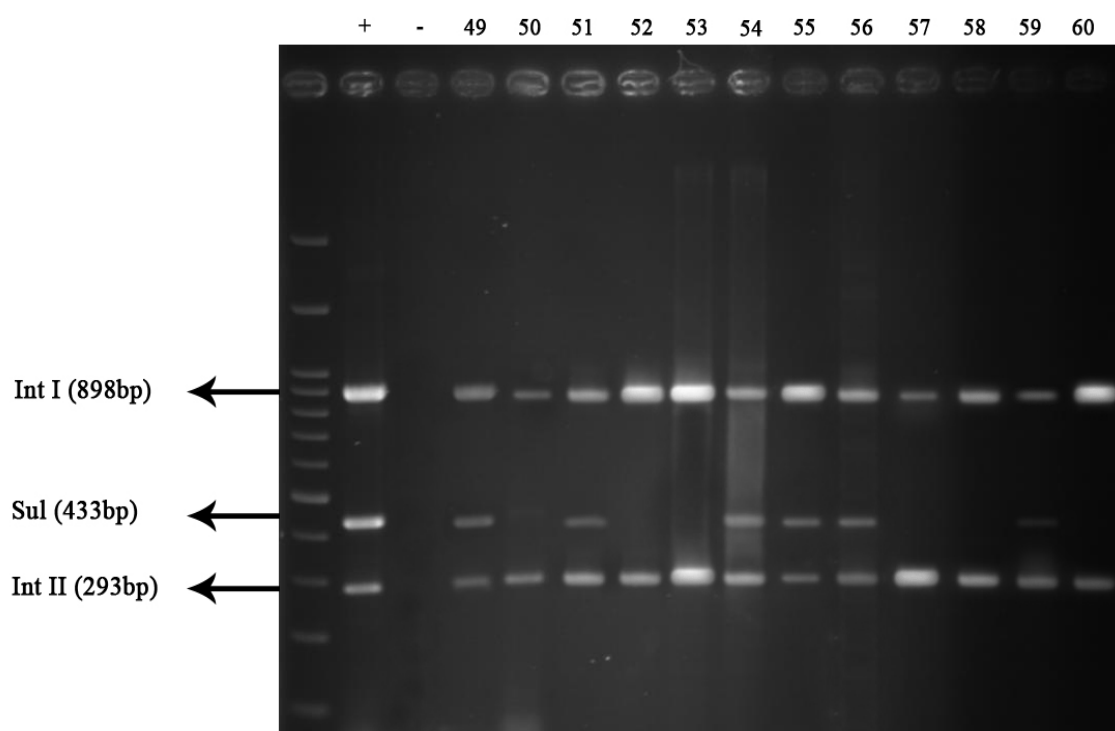
جدول ۳: آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

پرایمر	(۵'→۳' توالی پرایمر)	PCR محصول (bp)
<i>Sul1</i>	CGGCGTGGGCTACCTGAACG-3' F=5'- GCCGATCGCGTGAAGTTCCG-3' R=5'-	433
<i>Sul2</i>	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT-3' F=5'- GGGTTTGATACCGGCACCCGT-3' R=5'-	293
<i>Int</i>	GCCACTGCGCCGTTACCACC-3' F=5'- R=5'-GGCCGAGCAGATCCTGCACG-3'	898

نتایج

تعداد ۶۰ نمونه پروتئوس میرابیلیس جدا شده از ۲۹۲ بیمار مبتلا به عفونت دستگاه ادراری نمونه ادراری از افراد مبتلا به عفونت دستگاه ادراری جمع آوری گردید. در این مطالعه ۴ جفت پرایمر اولیگونوکلئوتیدی شامل *intI*، *intII* و *sulI* مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۶۰ نمونه پروتئوس میرابیلیس جدا شده از ۲۹۲

بیمار مبتلا به عفونت دستگاه ادراری؛ بیشترین و کمترین شیوع به ترتیب مربوط به ژن های *intII* و *sulI* با پراکندگی ۸۱/۲٪ و ۲۵٪ بود (جدول ۱ و ۳). همچنین نتایج حاصل از الکتروفورز محصول M-PCR برای ژن های هدف تحت مطالعه در تصویر شماره ۴-۲ نشان داده شده اند (شکل ۴-۲).



شکل ۱: محصول الکتروفورز واکنش زنجیره پلی مرز چندگانه. M؛ DNA marker 100 bp pulse (سیناکلون، ایران)، کنترل منفی (C⁻) که آب دو بار تقطیر شده (آب مقطر دیونیزه) استریل می باشد، کنترل مثبت (C⁺) که همان پروتئوس میرابیلیس با شماره استاندارد ۱۲۴۵۳ است. سویه های شماره ۴۹-۶۰ همان نمونه های بالینی حاصل از ادرار می باشند و قطعات ژنی 898bp و 433bp، 293bp به ترتیب قطعات حاصل از تکثیر ژن های *intI*، *intII* و *sul* می باشند.

جدول ۴: فراوانی ژن های مورد بررسی در این مطالعه

تعداد(٪) سویه	طول قطعه مورد	نام ژن هدف
های مثبت	نظر	
۳۸ (٪۶۳/۳)	۸۹۸	<i>intI</i>
۴۹ (٪۸۱/۶)	۲۹۳	<i>intIII</i>
۱۵ (٪۲۵)	۴۳۳	<i>sulI</i>

بحث

در مطالعه پیش رو، بعد از کشت دادن نمونه های جمع آوری شده، در نهایت از مجموع ۲۹۲ نمونه ادراری جمع آوری شده تعداد ۶۰ سویه پروتئوس میرابیلیس جداسازی گردید. در این مطالعه از ۲۹۲ بیمار مراجعه کننده تعداد ۱۸۵ مورد (٪۶۳/۳) زن و ۱۰۷ نفر (٪۳۶/۶) مرد بودند. این نتایج با مطالعه شکیبائی و همکاران همخوانی دارد. به منظور بررسی مقاومت های آنتی بیوتیکی سویه ها، آنتی بیوگرام با روش دیسک دیفیوژن انجام شد و میزان درصد حساسیت و مقاومت کلیه سویه ها به آنتی بیوتیک های مورد نظر مشخص گردید. نتایج نشان داد که بیشترین میزان حساسیت به آمیکاسین (٪۱۰۰) و جنتامایسین (٪۹۸/۳) مشاهده شد. همچنین ۱۰٪ سویه ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند^{۱۲}. در مطالعه شیبائی و همکاران از میان ۸۸ ایزوله بیمارستانی پروتئوس، ۶۷٪ (n:59) نسبت به آنتی بیوتیک سفتریاکسون بیشترین مقاومت و ۴۶/۵٪ (n:41) نسبت به کلرامفنیکل کمترین مقاومت را داشتند. پروتئوس های ایزوله شده همچنین MIC کمتری نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین و سفوتاکسیم داشتند. این محققین عنوان نمودند که دلیل مقاومت کمتر ایزوله ها به کلرامفنیکل ممکن است مربوط به عدم استفاده از این دارو به صورت روتین در بیمارستان باشد. در نتیجه میکروب ها تماس کمتری با این دارو داشته و مقاومت کمتری نیز بوجود می آید^{۱۳}.

در سال ۲۰۰۲، مطالعه Lura و همکاران بر روی ۲۸۲ سویه پروتئوس میرابیلیس جدا شده از نمونه های کلینیکی مختلف انجام گرفت، با استفاده از روش تشخیص فنوتیپی نمونه ها ۵۲٪ از این سویه ها به عنوان تولید کننده ESBL تشخیص داده شدند، در حالی که بررسی های هم افزایی و دیسک ترکیبی و روش مولکولی

مشخص کرد که میزان ۴۸٪ این سویه ها مولد ESBL هستند^{۱۴}. Hui و zhao و همکاران در سال ۱۹۹۷ با بررسی عامل بیماری زایی باکتری پروتئوس نمونه های ادراری جمع آوری شده، نشان دادند که اوره آز در بدن وجود دارد و بیان آن با استفاده از GEP به عنوان پروتئین خبرنگار میتواند یک رویکرد قابل بررسی در بیان ژن حدت پروتئوس در داخل بدن باشد^{۱۵}. مرادی و همکاران در سال ۱۳۹۳ با بررسی (مقاومت دارویی و فراوانی ژن های اینتگرون های کلاس I و II در انواع گونه های شیگلا جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های شهر کرمان در ۳۸ نمونه شیگلا، به روش دیسک دیفیوژن و انجام روش PCR) دریافتند که ۲۱ مورد شیگلا فلکسنری (٪۲/۵۵)، ۱۴ شیگلا سونئی (٪۸/۳۶) و ۳ مورد شیگلا بوئیدی (٪۸/۷) مشاهده شد ولی شیگلا دیسانتری وجود نداشت. بیشترین مقاومت نسبت به آمپی سیلین دیده شد و نسبت به سیپروفلوکساسین هیچ مقاومتی مشاهده نگردید. ۲۱ نمونه (٪۲/۵۵) دارای اینتگرون کلاس ۱ و ۳۲ نمونه (٪۲/۸۴) دارای اینتگرون کلاس ۲ بودند. در نتیجه با توجه به فراوانی بالای اینتگرون ها و مقاومت بالا در ایزوله های شیگلا، می توان با رعایت نکات بهداشتی و تجویز صحیح آنتی بیوتیک در بیمارستان ها از شیوع بیماری اسهالی ناشی از شیگلا جلوگیری کرد^{۱۶}. مولازاده و همکاران در سال ۱۳۹۲ با بررسی الگوی آنتی بیوتیکی باکتری های گرم منفی از جمله پروتئوس جدا شده از نمونه ادراری بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان حضرت ولیعصر (عج) فسا نشان دادند بین فراوانی باکتری و جنسیت ارتباط معنی داری (P=0.006) وجود دارد. در این مطالعه، آنتی بیوتیک های آمیکاسین و سفوتاکسیم به عنوان موثرترین داروها برای درمان اکثریت بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری شناخته شدند. البته، با توجه به تفاوت نتایج آنتی بیوگرام در مناطق جغرافیایی مختلف، استفاده از الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی منطقه ای در درمان بیماران ضروری است^{۱۷}.

در این مطالعه ۴ جفت پرایمر اولیگونوکلئوتیدی شامل *intI* و *intIII* و *sulI* مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۶۰ نمونه پروتئوس میرابیلیس جدا شده از ۲۹۲ بیمار مبتلا به عفونت دستگاه ادراری؛ بیشترین و کمترین شیوع به ترتیب مربوط به ژن های *intIII* و *sulI* با پراکندگی ۸۱/۲٪ و ۲۵٪ بود. این گزارشات نشان می دهد شیوع اینتگرون های کلاس ۲ در ایزوله های شیگلا بیشتر است که

مطالعه ما نیز همین نتایج را نشان می دهد. همچنین نتایج تحقیقات دیگران و نتایج مطالعه ما نشان می دهد که مقاومت چندگانه در ایزوله های شیگلا به اکثر آنتی بیوتیک ها از جمله تتراسایکلین، کرامفنیکل، آمپی سیلین، کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید و دیگر فلوروکینولون ها و هم چنین سفالوسپورین های نسل سوم در نقاط مختلف جهان رو به افزایش است. بنابراین بهتر است از مصرف بی مورد آنتی بیوتیک ها در گاستروآنتریت کودکان برای جلوگیری از ایجاد مقاومت های چند دارویی بیش از حدی که در حال حاضر وجود دارد اجتناب شود.^{۱۷}

در مطالعه Amy Gassama-Sow و همکاران روی ایزوله های شیگلا از سنگال، با استفاده از PCR و سکونسیک ۹۲/۸٪ ایزوله ها حامل اینتگرون کلاس ۱، ۵۷/۱٪ ایزوله ها حامل اینتگرون کلاس ۲ و ۵۰٪ ایزوله ها حامل هر دو کلاس اینتگرون گزارش شد. بیشترین مقاومت به آمپی سیلین، تیکارسیلین، تتراسایکلین، تری متوپریم/سولفامتوکسازول گزارش شد.^{۱۸}

نتیجه گیری

اکثر عفونت های ناشی از این باکتری معمولاً در بخش های ICU و بیماران مقیم بیمارستان با بیماری زمینه ای و استفاده کننده از کاتتر رخ می دهد. ایزوله های جدا شده از این بخش ها سطح بالایی از مقاومت را به آنتی بیوتیک های تست شده نشان دادند. با توجه به اینکه اکثریت ایزوله های مورد مطالعه به بتالاکتام ها و سفالوسپورین ها مقاوم بودند، منعکس کننده پیچیدگی درمان عفونت های ناشی از این باکتری است. لذا برای درمان عفونت های

بیمارستانی ناشی از این باکتری استفاده از این گروه از داروها توصیه نمی شود و پزشکان باید از وجود سطح بالای مقاومت به داروهای مذکور و شکست درمانی ناشی از مصرف این داروها مطلع گردند. فرایند درمان بایستی با در نظر گرفتن حساسیت های ایزوله منظور شود و درمان بصورت ترکیبی صورت پذیرد. حضور ژن کد کننده اوره آز در ایزوله ها قابل توجه بود و همانند سایر کشورها ایزوله های مولد این آنزیم می تواند زنگ خطری برای استفاده کننده از سوند ادراری باشد. این باکتری با استفاده از آنزیم اوره آز می تواند اوره را به آمونیاک و CO₂ بشکند که آمونیاک برای سلول های کلیوی سمی است. همچنین به ایجاد سنگ های استروویت و دیگر سنگ های کلیوی کمک می کند. ژن های مقاومت بر روی عناصر ژنتیکی قابل انتقال قرار دارند که می توانند از یک سویه مقاوم به سویه های دیگر منتقل شده و مقاومت را در بیمارستان و سایر محیط ها گسترش دهند. لذا مدیریت صحیح در مصرف آنتی بیوتیک ها و اتخاذ تدابیر لازم در رعایت استانداردهای بهداشتی می تواند در جلوگیری از گسترش مقاومت موثر باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از همکاران و پرسنل محترم بخش میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه تقدیر و تشکر نمایند.

References

1. J.W. Warren, J.H. Tenney, J.M. Hoopes, H.L. Muncie, W.C. Anthony A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters J. Infect. Dis. 1982;146 : 719–723.
2. H.L.T. Mobley, J.W. Warren Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters J. Clin. Microbiol. 1987;25:2216–2217.
3. H.L.T. Mobley, R. Belas Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract Trends Microbiol. 1995;3 : 280–284.
4. B.D. Jones, C.V. Locketell, D.E. Johnson, J.W. Warren, H.L.T. Construction of a urease-negative mutant of *Proteus mirabilis*: analysis of virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection Infect. Immun. 1990;58:1120–1123.
5. D.E. Johnson, R.G. Russell, C.V. Locketell, J.C. Zulty, J.W. Warren, H.L.T. Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistence, urolithiasis, and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending urinary tract infection Infect. Immun. 1993;61:2748–2754.

6. X. Li, H. Zhao, C.V. Lockatell, C.B. Drachenberg, D.E. Johnson, H.L.T. Visualization of *Proteus mirabilis* within the matrix of urease-induced bladder stones during experimental urinary tract infection Infect. Immun. 2002;70:389–394.
7. D.P. Griffith Urease stones Urol. Res. 1979;7 :215–221.
8. H.L.T. Mobley, M.D. Island, R.P. Hausinger Molecular biology of microbial ureases Microbiol. Rev. 1995;59:451–480.
9. M.D. Island, H.L.T. *Proteus mirabilis* urease: operon fusion and linker insertion analysis of ure gene organization, regulation, and function J. Bacteriol. 1995;177 : 5653–5660.
10. D.E. Johnson, F.K. Bahrani, C.V. Lockatell, et al. Serum immunoglobulin response and protection from homologous challenge by *Proteus mirabilis* in a mouse model of ascending urinary tract infection Infect. Immun. 1999;67 : 6683–6687.
11. H. Zhao, X. Li, D.E. Johnson, I. Blomfield, H.L.T. In vivo phase variation of MR/P fimbrial gene expression in *Proteus mirabilis* infecting the urinary tract Mol. Microbiol. 1997;23:1009–1019.
12. Houshang Shikh-Bardsiri and Mohammad Reza Shakibaie Antibiotic Resistance Pattern among Biofilm Producing and Non-Producing Proteus Strains Isolated from Hospitalized Patients; Matter of Hospital Hygiene and Antimicrobial Stewardship.
13. Debabrata Banik, Shibani Banik, Montosh Kumar Mondal. The Challenge of Multi Drug Resistant Bacteria in Intensive Care Patient Management in Bangladesh. JBSA 2014; 27(1): 24-26.
14. Lura, Joanna Kwiecińska-Piróg, Krzysztof Skowron, Katarzyna Zniszczol, and Eugenia Gospodarek. The Assessment of *Proteus mirabilis* Susceptibility to Ceftazidime and Ciprofloxacin and the Impact of These Antibiotics at Subinhibitory Concentrations on *Proteus mirabilis* Biofilms. Biomed Res Int. 2013; 2013: 930876.
15. H Zhao, R.B Thompson, V Lockatell, D.E Johnson, H.L.T Mobley Use of green fluorescent protein to assess urease gene expression by uropathogenic *Proteus mirabilis* during experimental ascending urinary tract infection Infect. Immun. 1998;66:330–335.
16. Hossein Hosseini Nave, Shahla Mansouri, Amin Sadeghi, Mohammad Moradi. Molecular diagnosis and anti-microbial resistance patterns among *Shigella* spp. isolated from patients with diarrhea. Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench.
17. Mojtaba mollazadeh, Hamid Forootanfarb, Yaser Golkaric, Tayebe Mohammadi-Khorsanda, Mohammad Reza Shakibaie. Activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*. 2015; 29: 235–241.
18. Amy Gassama-Sow, Awa Aïdara-Kane, Olivier Barraud, Martine Gatet, François Denis, and Marie-Cécile Ploy. High prevalence of trimethoprim-resistance cassettes in class 1 and 2 integrons in Senegalese *Shigella* spp isolates.

Shima Ahmadi Nejad MSc¹,
Kumarss Amini PhD²

¹ Department of Microbiology,
School of Basic Sciences, Saveh
Branch, Islamic Azad
University, Saveh, Iran.

² Associated Professor,
Department of Microbiology,
School of Basic Sciences, Saveh
Branch, Islamic Azad
University, Saveh, Iran.

Molecular Identification of Integron and Sulfonamide Resistance Genes in the *Proteus mirabilis* Isolated from Urine Samples by Multiplex-PCR and Their Antibiotic Resistance Profile

Received: 29 Nov 2020 ; Accepted: 26 Jul 2021

Abstract

Introduction: *Proteus mirabilis* is a common pathogen responsible for complicated urinary tract infections (UTIs) that sometimes causes bacteremia. The aim of the study was, Molecular identification of virulence genes at the same time *intI*, *intII* and *sul* in *Proteus mirabilis* from urine Multiplex-PCR and Swarming Test.

Methods: In this cross-sectional study, 292 urine samples were collected. Antimicrobial susceptibility test was performed by disk diffusion test according to the clinical laboratory standard institute test (CLSI) on the Muller Hinton agar. Then, multiplex-PCR was achieved for determination of *intI*, *intII* and *sul* genes in the strains by specific oligonucleotides primers.

Results: Of 292 urine specimens, 60 *P. mirabilis* were obtained by standard microbiological and biochemical tests. The antimicrobial susceptibility result showed that the highest susceptibility rate were related to amikacine (100%) and gentamicin (98.3%). so, 10% of strains were resistance to ciprofloxacin. Distribution of these genes showed that 81.2% and 25% isolates were carrying *intII* and *sulI*, respectively.

Discussion and Conclusion: Considering the role of integron in the development of resistance factors and the frequency of antibiotic resistance in *Proteus mirabilis* strains, paying attention to proper management in the use of antibiotics and taking necessary measures in compliance with health standards can be effective in preventing the spread of resistance.

Keywords: *Proteus mirabilis*, *IntI*, *IntII* and *sul*, Multiplex-PCR.

***Corresponding Author:**
Department of Microbiology,
Saveh Branch, Islamic Azad
University, Saveh, Iran.

Tel: 0912545074
E-mail: dr_kumarss_amini@yahoo.com