



Research Paper

Association between Biofilm Production and Virulence Factors in *Proteus mirabilis* Isolates Recovered from Traditional Dairy Products in Shahrekord, Iran

Afrooz Shafiei Lordejani¹, Elaheh Tajbakhsh^{1*}, Faham Khamesipour², Hassan Momtaz¹, Manocher Momeni Shahraki³

¹Department of Biology, ShK.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

²Halal Research Center of the Islamic Republic of Iran, Food and Drug Administration

³Department of Food Hygiene and Quality Control, ShK.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 11/12/2025, Accepted: 07/01/2026

Abstract

Today, one of the significant problems at the level of global health is the increase in the prevalence of antibiotic resistance of pathogens in different human and animal populations and food contamination. *Proteus mirabilis* is an emerging foodborne pathogen of public health importance. In this cross-sectional descriptive study, 480 samples of dairy products, including cow's milk, goat's milk, sheep's milk, cheese, yogurt, buttermilk, and curd, in Shahrekord, Iran in 2021-2022, were examined for *Proteus mirabilis* contamination. The samples were analyzed by biochemical and molecular methods. In order to investigate biofilm reaction, the microtiter plate method was used, and the disk diffusion method was used to determine the sensitivity of bacteria to antibiotics. Using biochemical methods, 59 isolates (12.29%) of *Proteus mirabilis* were isolated, which were also confirmed by molecular methods. Most cases of positive contamination were observed in cow's milk, goat's milk and sheep's milk, respectively. The highest resistance of *Proteus mirabilis* isolates to the antibiotic cotrimoxazole was reported in 35 isolates (59.32%) and the lowest resistance to cephalothin in 14 isolates (23.72%). In the microtiter plate method for biofilm formation, 52 strains (88.12%) were able to produce biofilm, with strong biofilm reaction in 37 strains (71.15%), and moderate biofilm reaction in 11 strains (21.15%) and biofilm reaction Weakness was reported in 4 strains (7.69%). The findings of this study provide robust evidence of the widespread dissemination of antimicrobial resistance among *Proteus mirabilis* isolates, posing a significant threat to public health.

Keywords: Antibiotic Resistance, Biofilm, Dairy products, *Proteus mirabilis*

Citation: Shafiei Lordejani A, Tajbakhsh E, Khamesipour F, Momtaz H, Momeni Shahraki M, Association Between Biofilm Production and Virulence Factors in *Proteus mirabilis* Isolates Recovered from Traditional Dairy Products in Shahrekord, Iran. *Quality and Durability of Agricultural Products and Food Staffs*, 2025;5(2): 72-91.

DOI: <https://doi.org/10.71516/qafj.2025.1227826>



© The Author(s) **Publisher:** Islamic Azad University of Kerman, Iran

* **Corresponding author:** Elaheh Tajbakhsh, **Email:** e.tajbakhsh@iau.ir

Extended Abstract

Introduction

Dairy products, including milk, are a rich source of protein, sugar, minerals, and vitamins and can be considered as an important factor in causing food poisoning and gastrointestinal disorders. The severity of microbial contamination and spoilage in raw milk depends on how hygienically it is prepared, collected, transported, and stored. Microorganisms may be introduced into dairy products during processing, handling, and distribution, and the ingredients used in dairy products can also contaminate the product, resulting in public health hazards such as gastroenteritis in humans. Foodborne microorganisms are the main pathogens that affect food safety, and as a result, the consumption of food, mainly animal products contaminated with pathogens or their toxins, causes human disease worldwide. Outbreaks of foodborne illness following consumption of raw milk and dairy products made from raw milk may be caused by *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Proteus*, and *Yersinia enterocolitica*. Epidemiological studies have shown that meat products, legumes, dairy products, fish, and cold foods are commonly associated with food poisoning caused by *Proteus mirabilis*. Therefore, *Proteus mirabilis* may pose a relatively large threat to food safety and public health. Currently, several resistant forms of this bacterium are emerging, indicating that *Proteus mirabilis* has been found to form biofilms on a wide range of surfaces, including polystyrene, silicone, latex, glass, and various biological surfaces. In recent years, studies have reported a link between biofilm formation and various pathogenicity in human isolates of *Proteus mirabilis*. Over the past two decades, the treatment of *Proteus mirabilis* infections has become increasingly difficult due to the identification of multidrug-resistant

(MDR) and extensively drug-resistant (XDR) isolates of *Proteus mirabilis*. For example, biofilm formation by *Proteus mirabilis* complicates bacterial resistance, prolongs treatment time, and exacerbates infection. In principle, biofilms protect organisms from the host immune system and antimicrobial agents. This study aimed to investigate the prevalence, biofilm-forming ability, and antibiotic resistance patterns of *Proteus mirabilis* isolates from dairy products in Shahrekord.

Methods

In this cross-sectional descriptive study, 480 dairy products were randomly collected from retail outlets in Shahrekord, Iran, during 2021–2022 and examined for *Proteus mirabilis* contamination. Following enrichment in Tryptic Soy Broth and selective culture on Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar, presumptive colonies were confirmed using standard biochemical tests (including urease activity, swarming motility, IMViC, and sugar fermentation profiles) and molecular identification via PCR targeting the *ureR* gene. Biofilm-forming capacity of confirmed isolates was assessed using the 96-well microtiter plate method with crystal violet staining, and antibiotic susceptibility was determined by the Kirby-Bauer disk diffusion technique according to CLSI (2021) guidelines against a panel of 12 antibiotics.

Results and Discussion

In this study, 59 isolates of *Proteus mirabilis* (12.29%) from 480 dairy samples were identified using biochemical tests and confirmed by molecular method. The highest contamination was observed in cow's milk (21.66%), followed by goat and sheep milk. In terms of antibiotic resistance, the highest resistance was to co-trimoxazole (59.32%) and the lowest to cephalothin (23.72%). Also, 88.12% of the isolates were able to form biofilms, most of which (71.15%) produced strong biofilms. These findings indicate a

significant prevalence of multidrug-resistant and biofilm-forming strains of *P. mirabilis* in Shahrekord dairy products, which is a serious risk to public health. The findings of this study indicate that dairy products in Shahrekord, especially raw milk, serve as a potential reservoir for *Proteus mirabilis*. The prevalence of 12.29% of this bacterium, together with the high rate of antibiotic resistance, especially to co-trimoxazole, raises serious concerns about the transmission of multiple resistances through the food chain. This is likely due to the widespread use of antibiotics in livestock farms in the region. On the other hand, the ability of 88% of the isolates to form biofilms, especially strong biofilms in more than 70% of cases, indicates that these bacteria can persist on the surfaces of dairy equipment and processing environments and show increased resistance to disinfectants and antibiotics. The combination of antibiotic resistance and biofilm formation not only reduces the effectiveness of clinical treatments but also increases the risk of foodborne infections. These results highlight the need to review antibiotic use policies in veterinary medicine, improve hygiene conditions in dairy production and distribution, and continuously monitor the quality of dairy products through microbiological monitoring.

Conclusion

The findings of this study also provide a clear picture of widespread antibiotic resistance in *Proteus mirabilis* isolates, which potentially poses a serious threat to public health. This highlights the importance of developing a health management strategy to prevent *Proteus mirabilis* infections in humans and animals and contamination of food products. Genotyping of isolates will help in the above-mentioned cases, as the high genetic similarity between some of the *Proteus mirabilis* isolates isolated from dairy products in Shahrekord, Iran indicates that

they have the same source of contamination. Future studies should investigate the genetic mechanisms underlying multidrug resistance and biofilm formation in isolates of *Proteus sp.* and other bacteria associated with dairy sources. Implementing stricter hygiene protocols throughout the dairy supply chain and monitoring antibiotic use in livestock could significantly reduce the risks of contamination.

Keywords

Antibiotic Resistance, Biofilm, Dairy products, *Proteus mirabilis*

Funding

There was no external funding in this study.

Authors' contribution

All authors contributed equally to the writing of the manuscript.

Conflict of interest

The author declares that there are no competing interests.



مقاله پژوهشی

ارتباط بین تولید بیوفیلیم و فاکتورهای ویروالانس در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از محصولات لبنی سنتی شهرکرد، ایران

افروز شفیعی لردجانی^۱، الهه تاج‌بخش^{۲*}، فهام خامسی پور^۲، حسن ممتاز^۱، منوچهر مومنی شهرکی^۳

^۱ گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

^۲ مرکز تحقیقات حلال جمهوری اسلامی ایران، سازمان غذا و دارو

^۳ گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۲۰ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۱۷

چکیده

امروزه یکی از مشکلات قابل توجه در سطح بهداشت جهانی، افزایش شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی پاتوژن‌ها در جمعیت‌های مختلف انسانی و حیوانی و آلودگی‌های مواد غذایی است. پروتئوس میرابیلیس یک پاتوژن غذایی در حال ظهور است که دارای اهمیت بهداشت عمومی است. در این مطالعه مقطعی - توصیفی ۴۸۰ نمونه محصولات لبنی شامل شیر گاو، شیر بز، شیر گوسفند، پنیر، سرشیر، ماست، دوغ و کشک شهرستان شهرکرد از نظر آلودگی به پروتئوس میرابیلیس مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور بررسی واکنش بیوفیلیم از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد و حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها با روش انتشار دیسک تعیین گردید. با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی ۵۹ ایزوله (۱۲/۲۹ درصد) پروتئوس میرابیلیس جدا شد که با روش مولکولی نیز تأیید شدند. بیشترین موارد مثبت آلودگی به ترتیب در شیر گاو، شیر بز و شیر گوسفند مشاهده شد. بیشترین مقاومت ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس نسبت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول ۳۵ جدایه (۵۹/۳۲ درصد) و کمترین مقاومت به سفالوتین ۱۴ جدایه (۲۳/۷۲ درصد) گزارش گردید. در روش میکروتیتر پلیت به‌منظور تشکیل بیوفیلیم ۵۲ سویه (۸۸/۱۲ درصد) قادر به تولید بیوفیلیم بودند که واکنش بیوفیلیم قوی در ۳۷ سویه (۷۱/۱۵ درصد)، و واکنش بیوفیلیم متوسط در ۱۱ سویه (۲۱/۱۵ درصد) و واکنش بیوفیلیم ضعیف در ۴ سویه (۷/۶۹ درصد) گزارش شد. یافته‌های این مطالعه شواهد محکمی از گسترش گسترده‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های پروتئوس میرابیلیس ارائه می‌دهد که می‌تواند به‌عنوان یک تهدید قابل توجه برای سلامت عمومی مطرح شود.

واژه‌های کلیدی: پروتئوس میرابیلیس، بیوفیلیم، فراورده‌های لبنی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

استناد: افروز شفیعی لردجانی، الهه تاج‌بخش، فهام خامسی پور، حسن ممتاز، منوچهر مومنی شهرکی، ارتباط بین تولید

بیوفیلیم و فاکتورهای ویروالانس در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از محصولات لبنی سنتی شهرکرد، ایران، کیفیت و

ماندگاری تولیدات کشاورزی و مواد غذایی، (۱۴۰۴)، دوره ۵، شماره ۲، صفحات ۹۱-۷۲.

DOI: <https://doi.org/10.71516/qafj.2025.1227826>

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، ایران

© نویسنده‌گان



مقدمه

محصولات لبنی از جمله شیر منبعی غنی از پروتئین، قند، املاح و ویتامین‌ها هستند و می‌توانند به‌عنوان عامل مهمی در ایجاد مسمومیت‌های غذایی و ناراحتی‌های گوارشی محسوب شوند. بسیاری از بیماری‌های واگیردار از جمله سل، تب مالت، تیفوئید، عفونت‌های استریتوکوکوی و غیره از طریق محصولات لبنی منتقل می‌شوند. در حالت معمول نباید انتظار داشت که جمعیت مشخصی از میکروارگانیسم‌ها در شیر وجود داشته و یا این‌که شیر دارای فلور طبیعی باشد چرا که در شرایط ایده‌آل باید استریل باشد. از طرف دیگر شیر با توجه به مغذی بودن، محیط بسیار مناسبی برای رشد و تکثیر انواع میکروارگانیسم‌ها بوده و بنابراین کنترل و نظارت بر موازین بهداشتی شیر بسیار ضروری است (۱). شدت آلودگی و فساد میکروبی در شیر خام بستگی به چگونگی رعایت بهداشت در مسیر تهیه و جمع‌آوری و نیز حمل و نگهداری آن دارد. میکروارگانیسم‌ها ممکن است در طول پردازش، جابه‌جایی و توزیع به محصولات لبنی وارد شوند و همچنین مواد تشکیل دهنده به‌کار رفته در محصولات لبنی باعث آلودگی محصول شده و در نتیجه منجر به خطرات بهداشت عمومی مانند گاستروانتریت در انسان می‌شود (۲). اگرچه پاستوریزاسیون می‌تواند بسیاری از پاتوژن‌های خاص را که برای سلامت عمومی خطرآفرین هستند از بین ببرد، اما ممکن است پس از پاستوریزه کردن، از طریق افزودن مواد آلوده و فرآیند جابه‌جایی نامناسب، یک خطر میکروبی بالقوه وجود داشته باشد. شیر خامی که به‌صورت خام مصرف می‌شود یا در تولید ماست و بستنی استفاده می‌شود ممکن است در شرایط بهداشتی ضعیف با استفاده از روش‌های ابتدایی تولید شود. در چنین شرایطی، محصولات نهایی حاوی تعداد زیادی و انواع مختلفی از آلاینده‌ها، به‌ویژه آلاینده‌های مربوط به میکروارگانیسم‌های روده‌ای هستند (۳). وجود میکروارگانیسم‌های اعضای خانواده انتروباکتریاسه در محصولات لبنی باعث ایجاد تغییرات نامطلوب می‌شود که محصول را به محصولی با کیفیت پایین‌تر، غیرقابل فروش و نامناسب برای مصرف انسان تبدیل می‌کند. علاوه بر این، وجود آن‌ها اغلب به‌عنوان یک شاخص قابل اعتماد از آلودگی مدفوعی در نظر گرفته می‌شود. بنابراین، وجود

انتروباکتریاسه و کلی‌فرم به‌طور معمول برای تعیین کیفیت بهداشتی غذاها، به‌ویژه محصولات لبنی ارزیابی می‌شود. میکروارگانیسم‌های منتقله از غذا، پاتوژن‌های اصلی هستند که بر ایمنی غذا تأثیر می‌گذارند و در نتیجه مصرف مواد غذایی، عمدتاً محصولات حیوانی آلوده به پاتوژن‌ها یا سموم آن‌ها، باعث بیماری انسان در سراسر جهان می‌شوند. شیوع بیماری‌های ناشی از غذا به‌دنبال مصرف شیر خام و محصولات لبنی ساخته شده از شیر خام ممکن است توسط *اشریشیا کلی*، گونه‌های *سالمونلا*، *پروتئوس* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* ایجاد شود (۴). گونه *پروتئوس* باکتری‌هایی، گرم منفی، متحرک و فرصت‌طلب هستند که در شرایط مساعد باعث عفونت‌های مجاری ادراری، عفونت زخم، مننژیت در نوزادان یا آرتریت روماتوئیدی در نوزادان می‌شوند. هر دو گونه *پروتئوس میرابیلیس* و *پروتئوس ولگاریس* به‌طور گسترده در محیط پخش می‌شوند و از دستگاه روده پستانداران، پرندگان و خزندگان جدا شده‌اند. *پروتئوس میرابیلیس* ساکن معمول دستگاه گوارش انسان است. این باکتری همچنین ممکن است تحت شرایط خاص دستگاه ادراری را کلونیزه کند، یک پاتوژن فرصت‌طلب و یکی از علل اصلی عفونت‌های دستگاه ادراری در بیماران بستری در بیمارستان با کاتترهای ادراری محسوب می‌شود. بررسی‌های اپیدمیولوژیک نشان داد که فرآورده‌های گوشتی، محصولات حبوبات، محصولات لبنی، ماهی و غذاهای سرد معمولاً با مسمومیت غذایی مربوط به *پروتئوس میرابیلیس* مرتبط هستند. از این‌رو، *پروتئوس میرابیلیس* ممکن است یک تهدید نسبتاً بزرگ برای ایمنی مواد غذایی و سلامت عمومی باشد در حال حاضر چندین اشکال مقاوم از این باکتری وجود دارد که نشان دهنده یک مشکل عمده غذایی است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی این پاتوژن یک نگرانی مهم برای سلامت عمومی است. استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها برای اهداف درمانی در حیوانات و انسان‌ها منجر به ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این میکروارگانیسم می‌شود. سویه‌های مقاوم به داروی این میکروارگانیسم از نمونه‌های بالینی و مواد غذایی جداسازی شدند. مشکل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروارگانیسم‌ها عمدتاً به‌دلیل مقاومت طبیعی گونه‌های معین به آنتی‌بیوتیک‌های خاص، انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین گونه‌ها و استفاده از دوزهای کمتر از مقدار درمانی آنتی‌بیوتیک در خوراک دام

جدایه‌های پروتئوس میرابیلیس مقاوم به چند دارو (MDR^1) و به‌طور گسترده مقاوم به دارو (XDR^2)، درمان عفونت‌های پروتئوس میرابیلیس به‌طور فزاینده‌ای دشوار شده است. به‌عنوان مثال، تولید بیوفیلیم توسط پروتئوس میرابیلیس پیچیدگی مقاومت باکتریایی را تشدید می‌کند، زمان درمان را طولانی می‌کند و عفونت را تشدید می‌کند. در اصل، بیوفیلیم‌ها از ارگانسم‌ها در برابر سیستم ایمنی میزبان و عوامل ضدمیکروبی محافظت می‌کنند (۸). هدف این مطالعه بررسی شیوع، توانایی تشکیل بیوفیلیم و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های پروتئوس میرابیلیس جداشده از محصولات لبنی در شهرکرد بود.

روش کار

نمونه‌گیری و شناسایی باکتری

در این مطالعه، تعداد ۴۸۰ نمونه شامل شیر گاو، شیر گوسفند، شیر بز، پنیر، سرشیر، ماست، دوغ و کشک (۶۰ نمونه از هر نوع) به‌صورت تصادفی از مراکز عرضه فرآورده‌های لبنی در شهرستان شهرکرد جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از جمع‌آوری، در شرایط استریل و در مجاورت یخ به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردیدند. حجم نمونه‌گیری (۴۸۰ نمونه) بر اساس میانگین شیوع گزارش شده ($\sim 3.5\%$) برای پروتئوس میرابیلیس در مطالعات پیشین و با استفاده از فرمول محاسبه اندازه نمونه تعیین شد.

$$n = z^2 \frac{pq}{d^2}$$

$$n = (1.96 \times 1.96) \times \frac{0.35 \times 0.65}{0.043 \times 0.043} = 472.66 = 480$$

نمونه‌های غیرمایع شامل پنیر، سرشیر، کشک و ماست در شرایط استریل تحت هود لامینار ابتدا با دستگاه استوماکر همگن‌سازی شدند. سپس ۱۰ گرم از هر نمونه به‌طور جداگانه به ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتوز سوی براث اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پس از این مرحله، ۳۰۰ میکرولیتر از هر کشت غنی‌شده روی محیط آگار زایلوز لیزین

برای بهبود بهره‌وری دام و استفاده روتین از آن است (۶). عوامل ضدمیکروبی برای دام‌های خانگی برای پیشگیری و درمان بیماری‌ها، به ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کمک می‌کند که متعاقباً از طریق زنجیره غذایی به انسان منتقل می‌شود. این امر تا حد زیادی مسئول ظهور باکتری‌های مقاوم به دارو در محصولات حیوانی مانند گوشت و فرآورده‌های لبنی خواهد بود. مقاومت در برابر چندین عوامل ضدمیکروبی در گونه‌های پروتئوس جدا شده از دام ثبت شده است. ظهور گونه‌های پروتئوس مقاوم به دارو که به‌طور بالقوه می‌تواند از طریق غذای آلوده به انسان منتقل شود، به‌عنوان یک تهدید بالقوه سلامت عمومی برای انسان شناخته شده است (۷). عوامل بیماری‌زای مختلف در بیماری‌زایی پروتئوس میرابیلیس نقش دارند. این عوامل عبارتند از: حضور فیمبریا و پروتئین‌های غشای خارجی اختصاصی، تحرک مبتنی بر تاژک و حرکت سوارمینگ، فعالیت اوره‌آز، اتصال آهن به محیط، تهاجم سلولی، لیپوپلی ساکاریدها و همولیزین‌ها، که بیشتر آن‌ها در توانایی این باکتری برای چسبیدن، کلونیزه کردن و حمله به بافت‌ها نقش دارند و در نتیجه بیماری‌زایی را افزایش می‌دهند. بیان ژن‌های مرتبط با ویروالانس تنها عامل مسئول بیماری‌زایی پروتئوس میرابیلیس نیست. تشکیل بیوفیلیم پیچیدگی عفونت پروتئوس میرابیلیس را تشدید می‌کند، زیرا بیوفیلیم‌ها به‌عنوان عامل عفونت‌های پایدار و مخرب و فرآیندهای التهابی شناخته می‌شوند. بیوفیلیم مجموعه‌ای از سلول‌های میکروبی است که به سطوح خاص و سلول‌های مجاور می‌چسبند و با یک ماتریکس خارج سلولی پوشیده شده است. بیوفیلیم‌ها به‌طور ناخواسته به بقای باکتری‌ها کمک می‌کنند و در نتیجه سازگاری بهتر با شرایط محیط خارجی و استفاده مؤثرتر از شرایط تغذیه‌ای را ممکن می‌سازند. پروتئوس میرابیلیس برای تولید بیوفیلیم بر روی طیف وسیعی از سطوح، از جمله پلی استایرن، سیلیکون، لاتکس، شیشه و سطوح مختلف بیولوژیکی یافت شده است. در سال‌های اخیر، مطالعات ارتباط بین تشکیل بیوفیلیم و عوامل بیماری‌زای مختلف در جدایه‌های پروتئوس میرابیلیس از انسان را گزارش کرده‌اند. در طول دو دهه گذشته، به‌دلیل شناسایی

¹ Multidrug resistance

² Extensively drug-resistant

میکرولیتتر از این سوسپانسیون غنی شده به چاهک‌های میکروتیتراپلید انتقال داده شد. چاهک‌های شاهد تنها حاوی ۲۰۰ میکرولیتتر محیط تریپتیکاز سوی برات استریل (بدون باکتری) بودند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند تا امکان تشکیل بیوفیلم فراهم گردد. پس از انکوباسیون، محتویات چاهک‌ها دور ریخته شد و چاهک‌ها سه بار با سرم فیزیولوژی استریل شست‌وشو داده شدند تا سلول‌های غیرمتصل حذف گردند. در ادامه، ۲۰۰ میکرولیتتر محلول ۰/۹٪ کریستال ویوله به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در 37°C انکوبه شدند. پس از این مرحله، رنگ‌آمیزی اضافی دور ریخته و چاهک‌ها دوباره سه بار با سرم فیزیولوژی استریل شسته شدند. سپس پلیت‌ها به شدت تکان داده شدند تا هرگونه سلول یا رنگ باقی‌مانده غیرمتصل کاملاً حذف گردد. جهت تثبیت سلول‌های متصل به سطح چاهک‌ها، ۲۰۰ میکرولیتتر اتانول ۹۵٪ به هر چاهک اضافه و پس از ۱۵ دقیقه محتویات تخلیه شد. پلیت‌ها در دمای اتاق کاملاً خشک شدند و در نهایت، جذب نوری رنگ متصل شده به بیوفیلم در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از الیزا ریدر اندازه‌گیری گردید. یافته‌ها بر اساس OD در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه‌بندی شدند. به‌طوری‌که ایزوله‌هایی که $4\text{ODc} < \text{OD}$ به‌عنوان بیوفیلم قوی، در صورتی‌که $2\text{ODc} < \text{OD} \leq 4\text{ODc}$ داشتند به‌عنوان بیوفیلم متوسط، در صورتی‌که $\text{OD} \leq 2\text{ODc}$ به‌عنوان بیوفیلم ضعیف و در صورتی‌که $\text{OD} \leq \text{ODc}$ بیوفیلم منفی نظر گرفته شدند. از سویه‌ی استاندارد کلبسیلا پنومونیه ATCC 1705 تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (پی‌سی‌آر)^۲

استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) و مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده انجام شد. جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. به این منظور ۵ میکرولیتتر از DNA استخراج شده روی ژل یک درصد

دکربوکسیلاز، کشت داده شد و نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، پلیت‌ها از نظر حضور پروتئوس میرابیلیس بررسی شدند و کلونی‌های سیاه رنگ مشاهده شده روی محیط زایلوز لیزین دکربوکسیلاز، انتخاب گردیدند. برای تأیید نهایی هویت باکتریایی، آزمون‌های تشخیصی شامل حرکت سوآرمینگ، تست‌های IMViC، اوره‌آز، تولید سولفید هیدروژن، تخمیر مالتوز و اورنیتین دکربوکسیلاز، انجام شد (۹). از سویه‌های استاندارد پروتئوس میرابیلیس (ATCC12453) و کلبسیلا پنومونیه (ATCC 700603) به‌عنوان کنترل کیفی انجام آزمون‌ها استفاده شد.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، از روش کربی-بائر^۱ مطابق با دستورالعمل‌های CLSI در سال ۲۰۲۱ استفاده گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تهیه شده از شرکت پادتن طب-ایران، شامل: کوتریموکسازول (۱/۲۵ میکروگرم تری‌متوپریم و ۲۳/۷۵ میکروگرم سولفامتوکسازول (SXT)، آمیکاسین (AN 30)، نیتروفورانتین (FM300)، سفوتاکسیم (CTX 30)، سفتازیدیم (CAZ 30)، سفتریاکسون (CRO30) و سفالوتین (CF 30)، سیپروفلوکساسین (CP 5)، نالیدیکسیک اسید (NA30)، نورفلوکساسین (NOR 10)، تراسایکلین (TE30) و جنتامایسین (GM10) مورد استفاده قرار گرفتند (۱۰).

بررسی تشکیل بیوفیلم

برای ارزیابی توانایی اتصال و تشکیل بیوفیلم توسط پروتئوس میرابیلیس، از روش میکروتیتراپلید ۹۶ چاهکی استفاده شد. بدین منظور، ابتدا یک لوپ پر از کلونی باکتریایی به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتیکاز سوی برات تلقیح شد و نمونه‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه گردیدند تا کشت باکتری فعال شود. پس از این مرحله، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی برداشته و به ۱۰ میلی‌لیتر محیط استریل تریپتیکاز سوی برات حاوی ۰/۲۵٪ گلوکز اضافه شد. سپس، ۲۰۰

² Polymerase chain reaction

¹ Kirby Bauer

$\text{DNA} \times (\text{ng}/\mu\text{l}) \times 50 \times \text{OD}_{260}$ (غلظت $\text{ng}/\mu\text{l}$)
رقت فاکتور

از روش پی‌سی‌ار با کاربرد پرایمر اختصاصی (جدول ۱)، جهت ردیابی ژن *ureR* استفاده شد. در این مرحله از سویه استاندارد باکتری پروتئوس میرابیلیس (ATCC 13048) تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

آگارز الکتروفورز گردید. برای تعیین غلظت DNA، استوک تهیه شده ۱:۱۰۰ رقیق شد. میزان جذب نوری در طول موج‌های ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری گردید. جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر بیانگر غلظت DNA در نمونه و جذب نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر نشان‌دهنده غلظت پروتئین در نمونه می‌باشد. در صورتی که جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ باشد DNA دارای کیفیت خوبی جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراس است. پس از خواندن جذب نوری نمونه‌ها، با استفاده از فرمول زیر غلظت DNA تعیین شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *ureR* در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس

اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر (۵' - ۳')	ژن
۲۲۵	F: GGTGAGATTTGTATTAATGG R: ATAATCTGGAAGATGACGAG	<i>ureR</i>

جدول ۲- ترکیب اجزای واکنش پی‌سی‌ار جهت ردیابی ژن *ureR*

حجم نهایی	غلظت نهایی	مواد
۲/۵ میکرولیتر	1X	PCR Buffer 10 X
۰/۵ میکرولیتر	۰/۲ میلی‌مول	dNTPs (10mM)
۰/۷۵ میکرولیتر	۱/۵ میلی‌مول	Mgcl2 (50mM)
۱ میکرولیتر	۱ میکرومول	پرایمر فوروارد (25μM)
۱ میکرولیتر	۱ میکرومول	پرایمر ریورس (25μM)
۰/۲ میکرولیتر	1U	Taq DNA Polymerase (5u/μl)
۱ میکرولیتر	۵۰ نانوگرم	DNA
۱۸/۰۵ میکرولیتر	-	ddH2O
۲۵ میکرولیتر	-	حجم نهایی واکنش

جدول ۳ - برنامه حرارتی برای تکثیر ژن ردیابی ژن *ureR* پروتئوس میرابیلیس

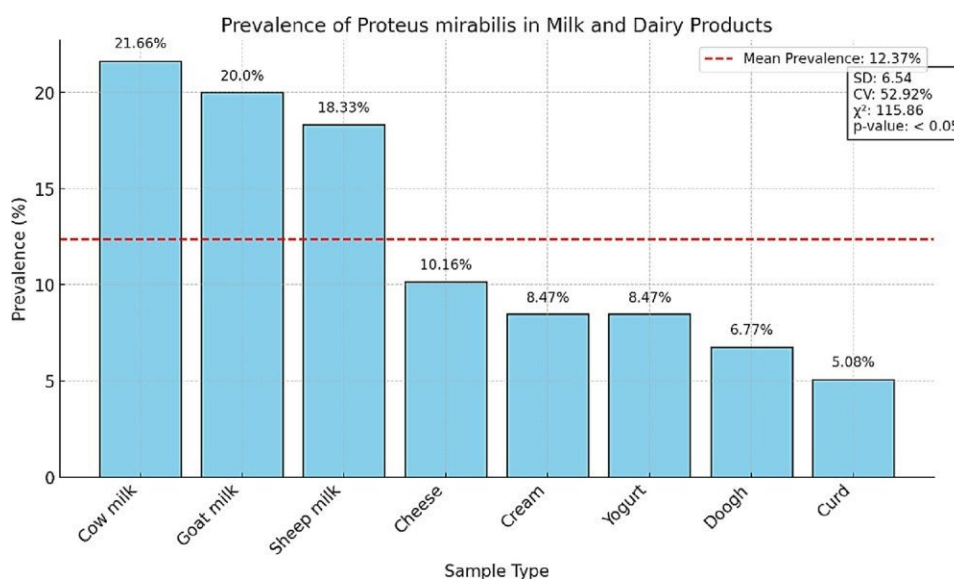
تعداد چرخه	زمان	دما	مرحله
۱	۵ دقیقه	۹۵°C	واسرشت اولیه
۳۵	۶۰ ثانیه	۹۴°C	واسرشت
	۶۰ ثانیه	۵۸°C	اتصال
	۶۰ ثانیه	۷۲°C	گسترش
۱	۱۰ دقیقه	۷۲°C	گسترش نهایی

بررسی آماری

داده‌های حاصل از کشت میکروبی، آزمایش پی‌سی‌ار و ردیابی ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ver. ۱۸ و مدل‌های آماری مربع کای و دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد آنالیز و ارتباط آماری بین فراوانی آلودگی به پروتئوس میرابیلیس در نمونه‌ها و توزیع انواع ژن‌های مورد مطالعه در ایزوله‌های مورد بررسی در سطح $P \leq 0.05$ تعیین گردید.

نتایج

در این تحقیق از مجموع ۴۸۰ نمونه مورد بررسی ۵۹ نمونه (۱۲/۲۹ درصد) از نظر پروتئوس میرابیلیس مثبت بودند. بیشترین میزان آلودگی در شیر گاو (۲۱/۶۶ درصد) و کمترین میزان آلودگی در کشک (۵/۸ درصد) گزارش شد، شکل (۱).



شکل ۱- فراوانی پروتئوس میرابیلیس در نمونه‌های شیر و فراورده‌های لبنی

می‌دهد که ارتباط خطی معناداری ($P\text{-value} = 0.017$) بین آلودگی نمونه با نوع فراورده‌های لبنی وجود دارد. بیشترین موارد مثبت آلودگی به ترتیب در شیر گاو، شیر بز و شیر گوسفند مشاهده شده است. پروتئوس میرابیلیس باسیل گرم منفی، لاکتوز مثبت و متحرک است که تست‌های بیوشیمیایی برای تشخیص این باکتری در جدول (۲)، نشان داده شده است.

وجود قطعه ۲۲۵ جفت‌بازی حاصل از تکثیر ژن *ureR* در این مرحله، نشان‌دهنده حضور قطعی پروتئوس میرابیلیس در نمونه‌های مورد بررسی بود. به‌منظور تأیید محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و اثبات وجود قطعات DNA تکثیرشده، الکتروفورز محصول پی‌سی‌ار روی ژل آگارز ۲٪ انجام شد. برای تهیه ژل، ۲ گرم پودر آگارز در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TBE 1X حاوی Tris Base، Boric Acid و EDTA حل و ذوب گردید. پس از خنک‌شدن نسبی محلول، ۲۰ میکرولیتر از رنگ Safe Stain رنگ‌آمیزی DNA به آن اضافه شد و مخلوط در قالب مناسب ریخته شد تا ژل تشکیل شود. سپس، ۱۵ میکرولیتر از محصول پی‌سی‌ار همراه با مارکرهای DNA با اندازه‌های ۱۰۰ جفت‌باز و ۱ کیلوباز در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت حدود یک ساعت الکتروفورز شد. پس از اتمام فرآیند، ژل در معرض نور فرابنفش قرار گرفت و تصویر نوارهای DNA ثبت گردید (۱۲).

با توجه به آزمون آماری انجام شده در این پژوهش با مقایسه مقادیر معنی‌داری با عدد ۰/۰۵ می‌توان در مورد رد یا پذیرش فرض مورد نظر نتیجه‌گیری کرد. بزرگ‌تر بودن مقدار معنی‌داری از ۰/۰۵ موجب پذیرش فرض استقلال دو متغیر می‌شود و کوچک‌تر بودن مقدار معنی‌داری از ۰/۰۵ موجب پذیرش فرض ارتباط خطی معنی‌دار بین متغیرها می‌شود. نتایج آنالیز آماری نشان

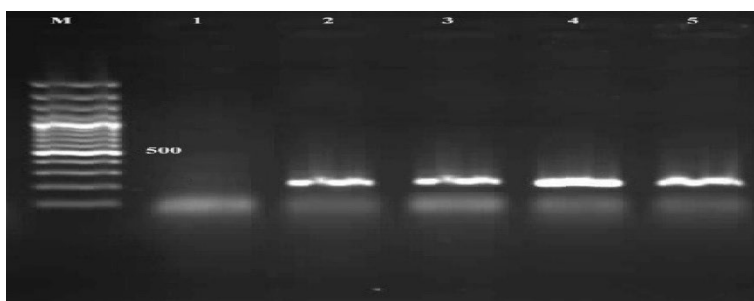
جدول ۴- خصوصیات بیوشیمیایی پروتئوس میرابیلیس

تست	اندول	متیل رد	وژس پروسکائر	سیترات	اسید از مالتوز	اسید از سوکروز	سولفید هیدروژن	اورنیتین دکربوکسیلاز
پروتئوس میرابیلیس	منفی	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	مثبت	مثبت

توالی ژن *ureR* تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۲۲۵ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند.

ردیابی ژن *ureR* پروتئوس میرابیلیس

در این تحقیق پس از انجام آزمون پی‌سی‌ار به‌منظور تشخیص قطعی باکتری پروتئوس میرابیلیس و حضور



شکل ۲. ژل الکتروفورز محصول پی‌سی‌ار ژن *ureR* در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس

بیوفیلیم بودند که واکنش بیوفیلیم قوی در ۳۷ ایزوله (۷۱/۱۵ درصد)، و واکنش بیوفیلیم متوسط در ۱۱ ایزوله (۲۱/۱۵ درصد) و واکنش بیوفیلیم ضعیف در ۴ ایزوله (۷/۶۹ درصد) گزارش شد. واکنش بیوفیلیم منفی در ۷ جدایه گزارش گردید.

تشکیل بیوفیلیم در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از شیر و فرآورده‌های لبنی

در روش میکروتیتر پلیت به‌منظور تشکیل بیوفیلیم از ۵۹ سویه پروتئوس میرابیلیس جدا شده از شیر و فراورده‌های لبنی ۵۲ ایزوله (۸۸/۱۲ درصد) قادر به تولید

جدول ۵- نتایج مربوط به آزمایش تشکیل بیوفیلیم در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از شیر و فراورده‌های لبنی

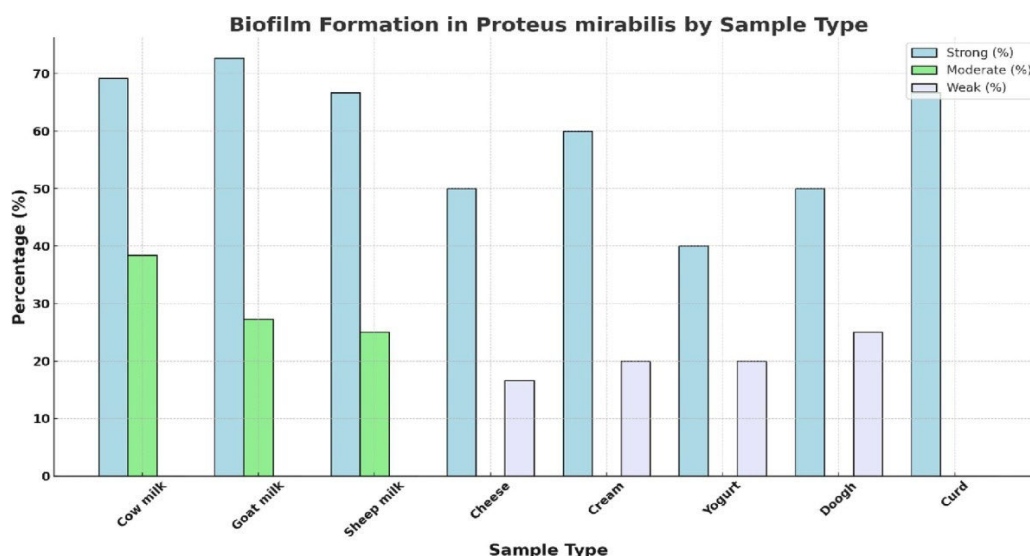
باکتری	واکنش بیوفیلیم					
	قوی		متوسط		ضعیف	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
پروتئوس میرابیلیس	۳۷	۷۱/۱۵	۱۱	۲۱/۱۵	۴	۷/۶۹

شد. از ۱۱ ایزوله پروتئوس میرابیلیس جدا شده از شیر گوسفند، در ۸ ایزوله واکنش بیوفیلیم قوی (۷۲/۷۲ درصد) و در ۳ ایزوله واکنش بیوفیلیم متوسط (۲۷/۲۷ درصد)

از ۱۳ ایزوله پروتئوس میرابیلیس جدا شده از شیر گاو، در ۹ ایزوله واکنش بیوفیلیم قوی (۶۹/۲۳ درصد) و در ۴ ایزوله واکنش بیوفیلیم متوسط (۳۸/۴۶ درصد) گزارش

شد. از ۵ ایزوله پروتئوس میرابیلیس جدا شده از ماست در ۲ ایزوله واکنش بیوفیلم قوی (۴۰ درصد) گزارش شد و در ۱ ایزوله (۲۰ درصد) واکنش بیوفیلم ضعیف گزارش شد. از ۴ ایزوله پروتئوس میرابیلیس جدا شده از دوغ در ۲ ایزوله واکنش بیوفیلم قوی (۵۰ درصد) گزارش شد و در ۱ ایزوله (۲۵ درصد) واکنش بیوفیلم ضعیف گزارش شد. از ۳ ایزوله پروتئوس میرابیلیس جدا شده از کشک در ۲ ایزوله واکنش بیوفیلم قوی (۶۶/۶۶ درصد) گزارش شد.

گزارش شد. از ۱۲ ایزوله پروتئوس میرابیلیس جدا شده از شیر بز، در ۸ سویه واکنش بیوفیلم قوی (۶۶/۶۶ درصد) و در ۴ ایزوله واکنش بیوفیلم متوسط (۲۵ درصد) گزارش شد. از ۶ ایزوله پروتئوس میرابیلیس جدا شده از پنیر، در ۳ ایزوله واکنش بیوفیلم قوی (۵۰ درصد) و در ۱ ایزوله (۱۶/۶۶ درصد) واکنش بیوفیلم ضعیف گزارش شد. از ۵ ایزوله پروتئوس میرابیلیس جدا شده از سرشیر، در ۳ ایزوله واکنش بیوفیلم قوی (۶۰ درصد) گزارش شد و در ۱ ایزوله (۲۰ درصد) واکنش بیوفیلم ضعیف گزارش

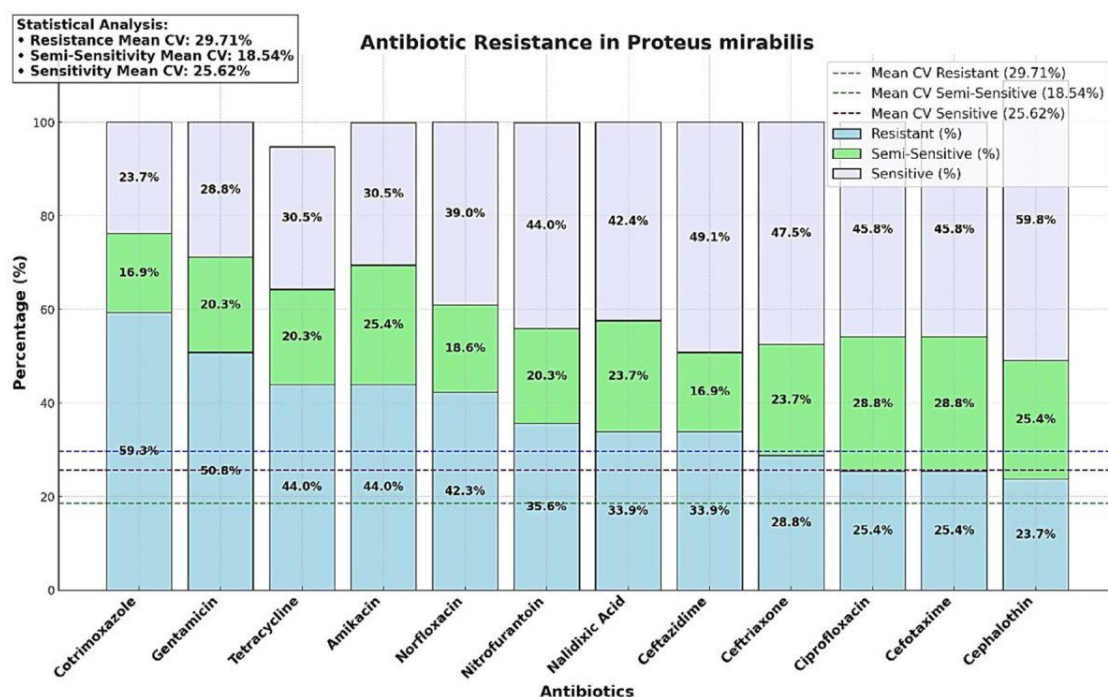


شکل ۳- تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از شیر و فراورده‌های لبنی به تفکیک نمونه

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از شیر و فراورده‌های لبنی

مقاومت نسبت به جنتامایسین در ۳۰ ایزوله (۵۰/۸۴ درصد)، مقاومت نسبت به تتراسایکلین در ۲۸ ایزوله (۴۷/۴۵ درصد)، مقاومت نسبت به آمیکاسین در ۲۶ ایزوله (۴۴ درصد)، مقاومت نسبت به نورفلوکساسین در ۲۵ سویه (۴۲/۳۷ درصد)، مقاومت نسبت به مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید و سفتراییدیم در ۲۰ ایزوله (۳۳/۸۹ درصد)، مقاومت نسبت به سفتریاکسون در ۱۷ ایزوله (۲۸/۸۱ درصد)، مقاومت نسبت به سفوتاکسیم و سیپروفلوکساسین در ۱۵ ایزوله (۲۵/۴۲ درصد) گزارش گردید، شکل (۴).

با توجه به آزمون آماری انجام شده در این پژوهش با مقایسه مقادیر معنی‌داری با عدد ۰/۰۵ می‌توان در مورد رد یا پذیرش فرض مورد نظر نتیجه‌گیری کرد. بزرگ‌تر بودن مقدار معنی‌داری از ۰/۰۵ موجب پذیرش فرض استقلال دو متغیر می‌شود و کوچک‌تر بودن مقدار معنی‌داری از ۰/۰۵ موجب پذیرش فرض ارتباط خطی معنی‌دار بین متغیرها می‌شود. بر اساس نتایج آنالیز آماری نمودار ۳ ارتباط خطی معناداری ($P\text{-value} = 0.032$) بین شدت واکنش بیوفیلم و نوع فراورده لبنی وجود دارد. یعنی بر اساس نوع فراورده‌های لبنی مختلف، شدت واکنش بیوفیلم تغییر می‌کند و احتمال وجود بیوفیلم قوی در نمونه‌های شیر گاو، گوسفند و بز بیشتر است.



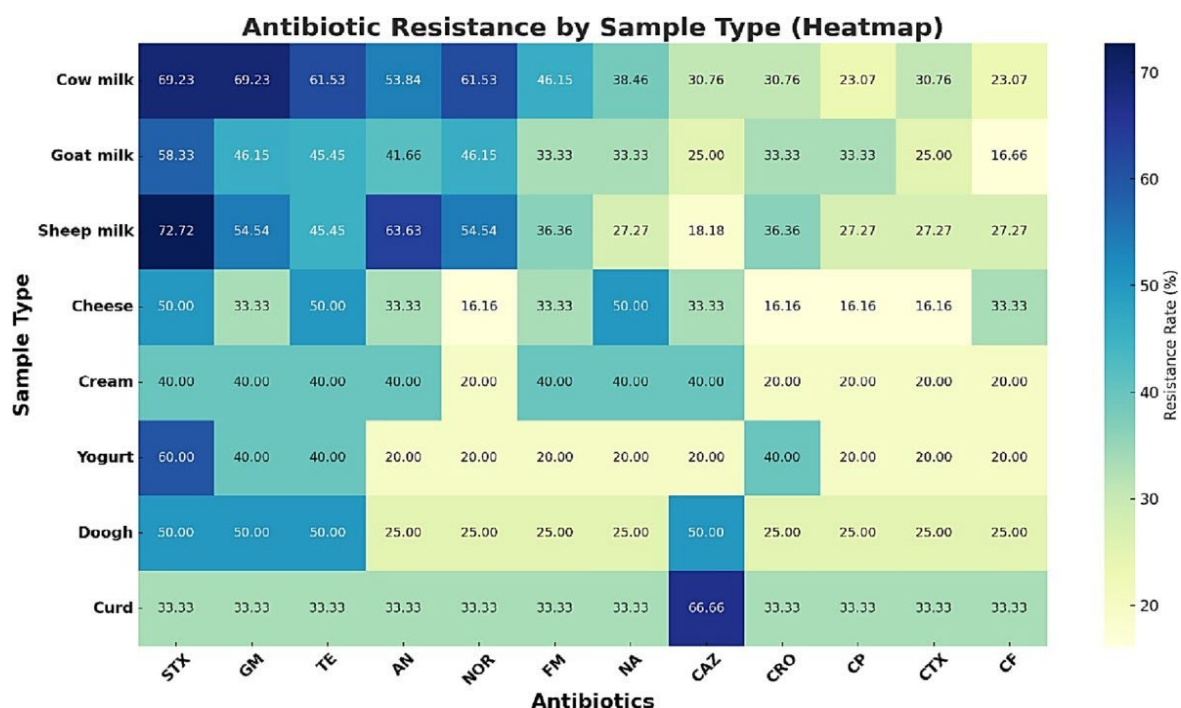
شکل ۴- مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از شیر و فراورده های لبنی

جدول ۶- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس

شماره ایزوله	بیوفیلیم	نوع نمونه	پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی
۱	قوی	شیر گاو	SXT, AN, TE, CTX, CRO, CP
۲	قوی	شیر گاو	SXT, AN, GM, TE, CTX, CRO, CP, NOR
۳	قوی	شیر گاو	SXT, AN, TE, CTX, CRO, CP
۴	قوی	شیر گاو	SXT, AN, GM, TE, CAZ, CRO
۵	قوی	شیر گاو	SXT, AN, TE, FM, CF, NA, NOR
۶	متوسط	شیر گاو	GM, FM, CTX,
۷	قوی	شیر گاو	SXT, AN, TE, CAZ, CP, NOR
۸	متوسط	شیر گاو	SXT, GM, TE, CTX, CRO, NA
۹	قوی	شیر گاو	SXT, AN, GM, TE, CP
۱۰	متوسط	شیر گاو	SXT, AN, TE, CRO, NOR,
۱۱	قوی	شیر گاو	SXT, AN, GM, TE, CAZ, CRO
۱۲	قوی	شیر گاو	GM, TE, NA, CF
۱۳	متوسط	شیر گاو	GM, TE, NA, CTX
۱۴	قوی	شیر گوسفند	GM, TE, NA, CAZ
۱۵	قوی	شیر گوسفند	SXT, AN, CTX, CAZ, CF, CRO, CP, NA, NOR
۱۶	متوسط	شیر گوسفند	SXT, AN, GM, TE, CTX, CAZ, CRO, CP
۱۷	متوسط	شیر گوسفند	SXT, AN, GM, TE, FM, CAZ, CRO, NA
۱۸	قوی	شیر گوسفند	SXT, AN, TE, FM, CF, CP, NA
۱۹	متوسط	شیر گوسفند	SXT, GM, FM, CTX, CRO, NA, NOR
۲۰	قوی	شیر گوسفند	SXT, AN, GM, TE, FM, CAZ, CP, NOR

شماره ایزوله	بیوفیلیم	نوع نمونه	پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی
۲۱	قوی	شیر گوسفند	SXT, AN, TE, CAZ, CP, NA
۲۲	قوی	شیر گوسفند	SXT, AN, GM, TE, FM, CF, NOR
۲۳	قوی	شیر گوسفند	SXT, AN, GM, TE, CTX, CAZ, CRO, CP
۲۴	قوی	شیر گوسفند	SXT, AN, TE, FM, CAZ, CF, CP, NOR
۲۵	قوی	شیر گوسفند	SXT, AN, GM, TE, CTX, CP, NA
۲۶	متوسط	شیر بز	SXT, AN, TE, CAZ, CRO, NA, NOR
۲۷	متوسط	شیر بز	SXT, AN, TE, CTX, CRO, CP
۲۸	متوسط	شیر بز	SXT, AN, GM, TE, CRO, CP, NA
۲۹	قوی	شیر بز	GM, CAZ, NA, NOR
۳۰	قوی	شیر بز	SXT, AN, TE, CP,
۳۱	قوی	شیر بز	SXT, AN, TE, FM, CAZ, CF, NA
۳۲	قوی	شیر بز	SXT, AN, GM, TE, CAZ, CRO, CP, NA
۳۳	قوی	شیر بز	SXT, AN, TE, FM, CF, NA
۳۴	قوی	شیر بز	SXT, GM, TE, CAZ, CF, CP, NA
۳۵	قوی	شیر بز	SXT, AN, TE, CF, NA,
۳۶	قوی	شیر بز	SXT, AN, TE, FM, CP, NOR
۳۷	ضعیف	پنیر	SXT, AN, TE, CTX, CF, NA
۳۸	قوی	پنیر	SXT, AN, TE, CF, CRO, NA
۳۹	قوی	پنیر	SXT, AN, TE, CTX
۴۰	قوی	پنیر	SXT, AN, GM, TE, FM, CF, NA,
۴۱	قوی -	پنیر	SXT, AN, TE, CTX, CF, CP
۴۲	-	پنیر	SXT, AN, TE, CRO, NA
۴۳	قوی	سرشیر	SXT, AN, GM, TE, CTX, CRO, CP
۴۴	قوی	سرشیر	SXT, AN, GM, TE, CAZ, CRO, NA, NOR,
۴۵	قوی	سرشیر	SXT, TE, CTX, CF, N
۴۶	ضعیف	سرشیر	SXT, AN, TE, CF, NA
۴۷	-	سرشیر	SXT, AN, TE, CTX, CF, CP, NA
۴۸	قوی	ماست	SXT, AN, TE, CF, NA
۴۹	ضعیف	ماست	SXT, AN, TE, FM, CF, NA
۵۰	قوی	ماست	GM, CF, CRO, NA, NOR
۵۱	-	ماست	SXT, AN, TE, CAZ, CP
۵۲	-	ماست	SXT, GM, TE, CTX, CRO, NA
۵۳	قوی	دوغ	SXT, AN, GM, TE, FM, CF, NA
۵۴	قوی	دوغ	GM, CAZ, NA, NOR
۵۵	-	دوغ	SXT, AN, GM, TE, CAZ, CRO
۵۶	-	دوغ	SXT, AN, TE, FM, CAZ, CF, NA
۵۷	قوی	کشک	GM, CAZ, NA, NOR
۵۸	قوی	کشک	GM, TE, NA
۵۹	-	کشک	SXT, AN, TE, CRO, NA

نتایج مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از شیر و فراورده های لبنی به تفکیک نمونه در شکل (۵)، نشان داده شده است.

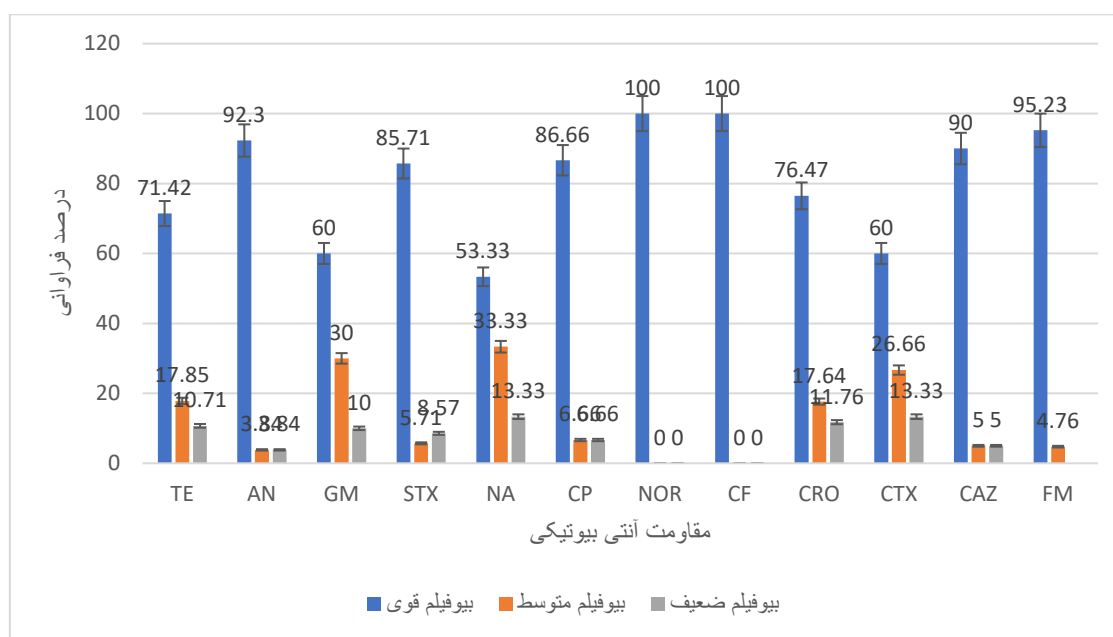


شکل ۵- مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس در نمونه‌های مورد بررسی به تفکیک

بر اساس واکنش بیوفیلیم در شکل (۶)، نشان داده شده است. بر اساس نتایج آنالیز آماری گزارش شده در جدول (۶)، ارتباط خطی معناداری ($P\text{-value} = 0.002$) بین واکنش بیوفیلیم و مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف وجود دارد.

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از شیر و فراورده‌های لبنی در رابطه با توانایی تشکیل بیوفیلیم

نتایج مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از شیر و فراورده‌های لبنی



شکل ۶- نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های پروتئوس/میرابیلیس جدا شده از شیر و فراورده‌های لبنی بر اساس واکنش بیوفیلیم

بحث

چالش‌های جهانی سلامت غذایی پیش‌روی نسل کنونی و آینده پیچیده و چندوجهی هستند. با ادامه رشد جمعیت جهان، یافتن راهکارهای جامع برای مقابله با ناامنی غذایی، بهبود سلامت عمومی و مواجهه با بحران‌های نوظهور از جمله گسترش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ضروری است. هیچ راه حل واحدی برای این مسائل پیچیده وجود ندارد (۱۳). بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، فراورده‌های لبنی از مصرف‌ترین اقلام غذایی در سطح جهانی هستند، اما به دلیل پتانسیل آلودگی میکروبی، در ردیف مواد غذایی پرخطر نیز طبقه‌بندی می‌شوند. هر ساله گزارش‌های متعددی از مسمومیت‌های ناشی از مصرف این فراورده‌ها ثبت می‌شود؛ به طوری که میلیون‌ها نفر در سراسر جهان مبتلا شده، برخی به بستری شدن در بیمارستان می‌کنند و تعدادی جان خود را از دست می‌دهند، زبان‌هایی که سالانه هزینه‌های چندمیلیاردی دلاری به همراه دارد (۱۴). در این راستا، تحقق تولید لبنیات ایمن مستلزم اجرای سیستم‌های مدیریتی مؤثر در سطح مزرعه است؛ از جمله مدیریت پویای تولید لبن، و استفاده هوشمندانه و محتاطانه از عوامل ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها. چنین

رویکردهایی نه تنها تضمین‌کننده تولید فراورده‌های لبنی ایمن و مغذی هستند، بلکه سلامت جامعه را نیز تقویت می‌کنند. این استراتژی‌ها به ویژه در کشورهای در حال توسعه، جایی که نیاز به بهبود تغذیه، سلامت و رفاه عمومی مبرم‌تر است، حیاتی محسوب می‌شوند (۱۵). همین امر زمینه‌ساز مطالعات بیشتر بر روی باکتری‌های بیماری‌زای محصولات لبنی شده است. در همین رابطه استفاده از تست‌های مولکولی برای تشخیص ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژن‌های دخیل در مسیر بیوفیلیم و بیماری‌زایی این باکتری‌ها و حتی ژنوتایپینگ جدایه‌ها در سال‌های اخیر رو به افزایش است. در این پژوهش، از مجموع ۴۸۰ نمونه مورد بررسی ۵۹ نمونه (۱۲/۲۹ درصد) از نظر پروتئوس/میرابیلیس مثبت بودند. بیشترین میزان آلودگی در شیر گاو (۲۱/۶۶ درصد) و کمترین میزان آلودگی در کشک (۵/۸ درصد) گزارش شد. مطالعه مقطعی ریتا و همکاران در سال ۲۰۱۶، در شهر جیجیگا برای ارزیابی آلودگی باکتریایی ۱۲۰ نمونه شیر خام برای مصرف انسان و تعیین الگوهای حساسیت ضد میکروبی جدایه‌ها انجام شد. به طور کلی، ارگانوسم‌های شناسایی شده و میزان شیوع آن‌ها شامل *شریشیا* کلی ۷۰ جدایه (۵۸ درصد)، *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۹ ایزوله

(۲/۲۴ درصد)، شیگلا ۲۱ ایزوله (۵/۱۷ درصد)، پروتئوس *میرابیلیس* ۹ ایزوله (۵/۷ درصد)، سالمونلا ۴ ایزوله (۳/۳ درصد) بود (۱۶). درصد شیوع پروتئوس *میرابیلیس* در مطالعه‌ی حاضر نسبت به مطالعه‌ی ریتا و همکارانش بالاتر گزارش شد. در مطالعه‌ی علی و همکاران در سال ۲۰۱۴، در مجموع ۸۵ نمونه از نمونه‌های مختلف بالینی و فرآورده‌های غذایی شامل ۲۰ نمونه ادرار، ۴۵ نمونه از زخم و ۲۰ نمونه فرآورده‌های لبنی، مرغ و گوشت جمع آوری شد. از مجموع نمونه‌های جمع‌آوری شده، ۱۵ (۶۴/۱۷ درصد) جدایه‌ی پروتئوس *میرابیلیس* تشخیص داده شد (علی و همکاران، ۲۰۱۴). درصد شیوع پروتئوس *میرابیلیس* در مطالعه‌ی حاضر نسبت به مطالعه‌ی علی و همکارانش پائین‌تر گزارش شده است. در مطالعه آل-محامدی و همکاران در سال ۲۰۲۰، ۱۲۰ نمونه ادرار و شیر گاو از مناطق مختلف استان الانبار عراق جمع‌آوری شد. ۸۴ نمونه (۷۰ درصد) از نمونه‌ها از نظر کشت باکتریولوژیک مثبت بودند. در مجموع ۲۸ (۳۳/۲۳ درصد) ایزوله /شریشیا کلی، ۱۸ (۱۵ درصد) ایزوله /استافیلوکوکوس اورئوس، ۱۲ (۱۰ درصد) ایزوله پروتئوس *میرابیلیس*، ۵ (۱۶/۴ درصد)، ایزوله‌ی کلبسیلا و ۴ ایزوله (۳۳/۳ درصد) ایزوله‌ی /ستریپتوکوکوس تشخیص داده شد (۱۷)، درصد شیوع پروتئوس *میرابیلیس* در مطالعه‌ی حاضر نسبت به مطالعه‌ی آل-محامدی و همکارانش بالاتر گزارش شد. در تحقیقات متعدد میزان شیوع باکتری پروتئوس *میرابیلیس* متفاوت گزارش شده است که می‌تواند به دلایل متعدد از جمله موقعیت جغرافیایی، فصل جمع‌آوری نمونه، تعداد نمونه اخذ شده، روش‌های تشخیصی مورد بررسی، رعایت بهداشت و مسائل ایمنی و نحوه‌ی نگهداری فرآورده‌های لبنی و حتی نوع فرآورده‌ی لبنی و غذایی باشد. در مطالعه‌ی حاضر بیشترین موارد مثبت آلودگی به‌ترتیب در شیر گاو، شیر بز و شیر گوسفند مشاهده شده است، در واقع بین آلودگی نمونه با نوع فرآورده‌های لبنی ارتباط خطی معناداری وجود دارد. باکتری‌های موجود در شیر خام از بافت‌های آلوده پستان (مانند باکتری‌های ایجاد کننده ورم پستان)، محیط لبنی (مانند خاک، آب و کود گاوی) و تجهیزات شیردوشی هستند. تعداد بالای باکتری در شیر خام فقط نشان دهنده سلامت ضعیف حیوانات و بهداشت ضعیف مزرعه است (۱۸)، که این موضوع یافته‌های پژوهش ما را تایید

می‌کند، که شیوع پروتئوس *میرابیلیس* در شیر خام بیشتر از سایر فرآورده‌های لبنی است. در واقع مطالعه‌ی حاضر و سایر مطالعات مشابه ذکر شده در این زمینه نشان دادند که پاتوژن‌های نوظهور منتقله از فرآورده‌های لبنی مانند پروتئوس *میرابیلیس* از نگرانی‌های عمده بهداشت غذایی هستند و مسئول ایجاد شیوع مسمومیت‌های غذایی و انتقال باکتری‌های مقاوم به چند دارو به انسان هستند. این مطالعه شیوع بالای پروتئوس *میرابیلیس* مقاوم به چند دارو را در نمونه‌های شیر و سایر فرآورده‌های لبنی نشان داده است. نسبت کلی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مطالعه‌ی حاضر بالا بود. در نتیجه، این مطالعه نشان می‌دهد که خطر انتشار گونه‌های مقاوم پروتئوس *میرابیلیس* در شهرکرد وجود دارد. با توجه به میزان بالای آلودگی شیر خام به باکتری پروتئوس *میرابیلیس*، رعایت بهداشت در هنگام جمع‌آوری، حمل و نقل و جابه‌جایی توصیه می‌شود، زیرا مصرف شیر آلوده ممکن است خطرات مهمی را برای سلامت عمومی به همراه داشته باشد. مطالعات گزارش یافته در زمینه بیوفیلیم در پروتئوس نشان داده که فلاژل باکتری نقش مهمی را در ایجاد بیوفیلیم بر روی سطوح جدید ایفا می‌کند. نکته مهم این‌که با تشکیل بیوفیلیم این باکتری خود را از اثر تخریبی آنتی‌بیوتیک‌ها مصون می‌نماید. معمولاً سویه‌های تولید کننده بیوفیلیم مقاومت به داروهای متعددی را از خود نشان می‌دهند. هم‌چنین سویه‌های تشکیل دهنده بیوفیلیم نقش مهمی در عفونت‌های مقاوم به چند دارویی پروتئوس از طریق انتقال ژن مقاومت به دارو دارند (۱۹). مطالعات مختلفی در زمینه‌ی تولید بیوفیلیم در سویه‌های مختلف پروتئوس *میرابیلیس* جدا شده از فرآورده‌های لبنی وجود دارد، که می‌توان به مطالعه‌ی اجاز و همکاران در سال ۲۰۲۲ و مطالعه‌ی ادريس و همکاران در سال ۲۰۲۳ اشاره کرد. در مطالعه‌ای که بر روی سویه‌های پروتئوس تولید کننده بیوفیلیم در کشور آرژانتین انجام شده، سویه‌های تولید کننده بیوفیلیم اغلب به داروی سیپروفلوکساسین مقاوم بوده و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون هیدروژناز سطح بالاتری در مقایسه با سویه‌های پلانتوتیک برخوردار بودند (کوکس و همکاران، ۱۹۸۹). چریف و همکاران در سال ۲۰۱۶ عنوان کردند که باکتری‌ها ممکن است به ساختارهای بیوفیلیم روی سطوح لبنی بچسبند و در تلاش برای محافظت از

خود در برابر شرایط نامطلوب مانند فرآیندهای پاستوریزاسیون باشند. بنابراین، بیوفیلم‌ها منابع رایج آلودگی مواد غذایی با باکتری‌های نامطلوب در نظر گرفته می‌شوند (۲۲-۲۰). در مطالعه‌ای را به منظور ارزیابی تنوع میکروبیوتای متصل به سطوح فولادی ضد زنگ در خطوط لوله قبل و بعد از پاستوریزاسیون یک کارخانه فرآوری شیر انجام دادند. ۷۰ ایزوله گرم مثبت به‌عنوان گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس هومینیس*، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس آئروس* شناسایی شدند. ۵۵ جدایه گرم منفی به‌عنوان گونه‌های *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *اسینتوباکتر کالکواستیکوس*، *سراتیا مارسنس*، گونه‌های *انتروباکتر سودوموناس آئروژینوزا*، *پروتئوس میرابیلیس* شناسایی شد. این مطالعه تاکید می‌کند که دانش میکروارگانیسم‌های متصل به سطوح لبنی ممکن است به توسعه استراتژی‌هایی برای بهبود پارامترهای عملیاتی بهینه برای فرآیندهای پاستوریزاسیون در کارخانه‌های لبنی کمک کند (۲۳). در مطالعه‌ی حاضر نیز آزمایش تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیت‌رپلیت در سویه‌های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از شیر و سایر فرآورده‌های لبنی نشان داد ۵۲ سویه (۸۸/۱۲ درصد) قادر به تولید بیوفیلم بودند که واکنش بیوفیلم قوی در ۳۷ سویه (۷۱/۱۵ درصد)، و واکنش بیوفیلم متوسط در ۱۱ سویه (۲۱/۱۵ درصد) و واکنش بیوفیلم ضعیف در ۴ سویه (۷/۶۹ درصد) گزارش شد. واکنش بیوفیلم منفی در ۷ جدایه گزارش گردید، مطابق با نتایج چریف و همکاران در مطالعه‌ی ما نیز اکثر سویه‌های پروتئوس میرابیلیس توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند و با توجه به آلودگی قابل توجه فرآورده‌های لبنی در شهرکرد به میکروارگانیسم پروتئوس میرابیلیس توسعه استراتژی‌هایی برای بهبود پارامترهای عملیاتی بهینه، برای فرآیندهای تهیه‌ی لبنیات در کارگاه‌های لبنی شهرکرد نیز توصیه می‌شود. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی فرآورده‌های لبنی نسبت به کوتریموکسازول در ۳۵ سویه (۵۹/۳۲ درصد) و کم‌ترین مقاومت نسبت به سفالوتین در ۱۴ سویه (۲۳/۷۲ درصد) گزارش شد. وجود مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در پاتوزن‌های غذایی یکی از نگرانی‌های بزرگ و اساسی جامعه امروزی است. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جدید و

گسترش باکتری‌های مقاوم در بین فرآورده‌های غذایی که معمولاً از طریق عدم رعایت بهداشت در حین پروسه‌های جمع‌آوری و فرآوری محصولات رخ می‌دهند، احتمال دارد که در بین افراد جامعه نیز پخش شوند، که از پیامدهای این معضل است (۲۴). بسیاری از باکتری‌های خانواده‌ی انتروباکتریاسه از عوامل شایع آلودگی‌های فرآورده‌های لبنی بوده و مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در این باکتری‌ها شده است که مقاومت آن‌ها به بتالاکتام‌ها (مثل آمپی‌سیلین و سفوتاکسیم) و نیز سایر آنتی‌بیوتیک‌های دیگر مثل کوتریموکسازول و سولفونامیدها در بسیاری از مناطق دنیا گزارش شده است (۲۵). مطالعات نشان می‌دهد صرف نظر از الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توانند در ایجاد مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها نقش داشته باشند، از این رو، در مطالعه‌ی حاضر علاوه بر تست‌های فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، جدایه‌ها از نظر حضور ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز بررسی شده‌اند. پژوهش رونانکی و همکاران در سال ۲۰۲۳، برای شناسایی باکتری‌های پروتئوس میرابیلیس و پروتئوس ولگاریس مقاوم به چند دارو از نمونه‌های شیر خام و گوشت تهیه شده برای حدود ۴ هفته از ۵۰ بخش مختلف تیروپاتی، آندرا پرادش انجام شد. تمامی جدایه‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن در معرض ۱۴ دیسک آنتی‌بیوتیکی قرار گرفتند. تمامی جدایه‌های پروتئوس میرابیلیس از نمونه‌های شیر و گوشت مقاومت ۱۰۰ درصدی به تتراسایکلین، کولیستین، اریترومايسين و پنی سیلین G نشان دادند. تمام جدایه‌های پروتئوس ولگاریس از شیر به تتراسایکلین، کولیستین، اریترومايسين، پنی سیلین G-، آمپی سیلین و پلی میکسین B مقاومت ۱۰۰ درصد نشان داده‌اند. جدایه‌های پروتئوس ولگاریس از گوشت نسبت به تتراسایکلین، کولیستین، اریترومايسين، پنی سیلین G، آمپی سیلین و وانکومايسين ۱۰۰ درصد مقاومت نشان داده‌اند. تمامی جدایه‌های پروتئوس میرابیلیس و پروتئوس ولگاریس به جنتامایسین حساسیت نشان داده‌اند (۲۶)، نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی پژوهش رونانکی و همکاران با مطالعه‌ی حاضر مطابقت ندارد، برخلاف مطالعه‌ی رونانکی و همکاران در پژوهش حاضر مقاومت ۱۰۰ درصدی به هیچ آنتی‌بیوتیکی مشاهده نشده است و بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی فرآورده‌های لبنی

شده است. برخلاف مطالعه‌ی آن‌ها جدایه‌های ما بیشترین مقاومت را به کوتریموکسازول نشان داده‌اند و مقاومت به تتراسایکلین در پژوهش ما ۴۷/۴۵ درصد گزارش شده است. در تضاد با مطالعه‌ی آن‌ها که همه‌ی جدایه‌ها به آمیکاسین حساس بوده‌اند در پژوهش ما، مقاومت به آمیکاسین ۴۴ درصد گزارش شده است. با توجه به این‌که مطالعه‌ی ما شیوع قابل توجهی از پروتئوس میرابیلیس را در فرآورده‌های لبنی شهرکرد نشان داده است، رعایت اقدامات بهداشتی ذکر شده، در منطقه ما نیز توصیه می‌شود. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف براساس الگوهای درمانی و مصرف آنتی‌بیوتیک که در مناطق مختلف صورت می‌گیرد، متفاوت است که می‌تواند به دلایل متعدد از جمله مکان جغرافیایی، تعداد نمونه گرفته شده، تفاوت در نوع محصول لبنی یا غذایی و سلیقه تجویز دامپزشکان در یک منطقه خاص باشد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه همچنین تصویر واضحی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی گسترده را در جدایه‌های پروتئوس میرابیلیس نشان می‌دهد که به طور بالقوه تهدیدی جدی برای سلامت عمومی است. این امر اهمیت تدوین یک استراتژی مدیریت سلامت را برای پیشگیری از عفونت‌های عفونت‌های پروتئوس میرابیلیس در انسان و حیوان و آلودگی محصولات غذایی برجسته می‌کند. ژنوتایپینگ جدایه‌ها به موارد ذکر شده کمک خواهد کرد، به این دلیل که وجود شباهت‌های بالای ژنتیکی بین برخی از جدایه‌های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از محصولات لبنی شهرکرد نشان‌دهنده یکسان بودن منبع آلودگی آن‌ها است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

مربوط به کوتریموکسازول ۵۹/۳۲ درصد می‌باشد. هم-چنین برخلاف مطالعه‌ی آن‌ها که همگی سویه‌ها به جنتامایسین حساس بودند، در مطالعه‌ی حاضر مقاومت به این آنتی‌بیوتیک ۵۰/۸۴ درصد گزارش شده است. مطالعه‌ی اوسنی و همکاران در سال ۲۰۲۱، به بررسی مقاومت ضد میکروبی و مشخصات حدت گونه پروتئوس از محیط و محصولات چهار مزرعه طیور و دام منتخب در لافیا، ایالت ناساراوا پرداختند. نمونه‌های مزرعه (n=۲۱۶) شامل شیر (۶۴ نمونه)، آب آشامیدنی (۶۴ نمونه) و سواب از پوسته تخم مرغ (۸۸ نمونه) جمع‌آوری و برای شناسایی گونه‌های پروتئوس با استفاده از تکنیک‌های کشت، بیوشیمیایی و میکروسکوپی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. از کل نمونه‌های مورد مطالعه، ۳۴/۲۶ درصد (۷۴/۲۱۶) برای گونه پروتئوس مثبت بودند. گونه پروتئوس در نمونه‌های آب آشامیدنی (۳۷/۸۴ درصد) و نمونه‌های شیر (۳۳/۷۸ درصد) بیشترین شیوع و در پوسته تخم مرغ (۲۸/۳۸ درصد) کمترین شیوع را داشتند. گونه‌های پروتئوس شامل ۷۸ درصد پروتئوس میرابیلیس و ۲۲ درصد پروتئوس و لگاریس بودند. پروتئوس میرابیلیس به طور قابل توجهی بالاتر از پروتئوس و لگاریس در نمونه‌های هر چهار مزرعه بود. مزارع A و D بیشترین شیوع گونه‌های پروتئوس را داشتند، در حالی که مزارع A و C (۸۰ درصد) و مزرعه D (۲۵ درصد) به ترتیب بیشترین شیوع پروتئوس میرابیلیس و پروتئوس و لگاریس را داشتند. ایزوله‌ها ۱۰۰ درصد به آمیکاسین حساس بودند و بیشترین مقاومت (۲۵/۷ درصد) را به تتراسایکلین نشان دادند. داده‌ها نشان‌دهنده سطح بالایی از سویه‌های بیماری‌زای مقاوم به چند دارو پروتئوس است که در مزارع دام و طیور در لافیا، نیجریه در گردش هستند، که خطر قابل توجهی از انتقال پروتئوس بیماری‌زا از طریق زنجیره غذایی را تقویت می‌کند (۲۷)، در مقایسه با مطالعه‌ی اوسنی و همکارانش میزان شیوع پروتئوس در مطالعه‌ی حاضر پائین‌تر گزارش

References

1. Vásquez-Jaramillo L, Ramírez NF, Akineden Ö, Fernández-Silva JA. Presence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in bulk-tank milk of bovine dairy farms in Antioquia, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pec.* 2017;30(2):85–100.
2. Armbruster CE, Smith SN, Johnson AO, DeOrnellas V, Eaton KA, Yep A, et al. The pathogenic potential of *Proteus mirabilis* is enhanced by other uropathogens during polymicrobial urinary tract infection. *Infect Immun.* 2017;85(2): e0010-17.
3. Habibi M, Karam MRA, Bouzari S. Construction and evaluation of the immune protection of a recombinant divalent protein composed of the MrpA from MR/P fimbriae and flagellin of *Proteus mirabilis* strain against urinary tract infection. *Microb Pathog.* 2018; 117:348–55.
4. Ramos GLDPA, dos Santos Nascimento J. Antibiotic resistance profile and detection of degradative enzymes by Enterobacteriaceae isolated from raw goat milk. *Germes.* 2021;11(2):211.
5. Al-Hamdani H, Al-Hashimy A. Molecular detection of UREC, HPMa, RSBA AND MRPA genes of *Proteus mirabilis* urinary tract infection in patient with rheumatoid arthritis. *Iraqi J Agric Sci.* 2020; 51:245–51.
6. Naidu S, Bodempudi B, Chinnam B, Nelapati S, Tummati S, Cherukuri N. Study of virulence genes, antibiotic and beta-lactamase profiles of *Proteus mirabilis* isolated from livestock and livestock products. *Int J Livest Res.* 2020;10(12):201–9.
7. Shelenkov A, Petrova L, Fomina V, Zamyatin M, Mikhaylova Y, Akimkin V. Multidrug-resistant *Proteus mirabilis* strain with cointegrate plasmid. *Microorganisms.* 2020;8(11):1775.
8. White AN, Learman BS, Brauer AL, Armbruster CE. Catalase activity is critical for *Proteus mirabilis* biofilm development, extracellular polymeric substance composition, and dissemination during catheter-associated urinary tract infection. *Infect Immun.* 2021;89(10): e00177-21.
9. Kim SHE, We CH, Haeiune AN. Molecular characterization of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates from retail meat products. *J Food Prot.* 2005;68(7):1408–13.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne, PA: CLSI; 2021.
11. Torshizi R, Zamanzad B, Mokhtareyan K, Karimi A. Determination of CTX-M genes in enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase using PCR method. *J Shahrekord Univ Med Sci.* 2011;13(3):9–17.
12. Ali TH, Jasim HM. Detection of virulence factors of local isolates of *Proteus mirabilis*. *Al-Nahrain J Sci.* 2014;17(4):71–8.
13. Garcia SN, Osburn BI, Cullor JS. A one health perspective on dairy production and dairy food safety. *One Health.* 2019; 7:100086.
14. Grout L, Baker MG, French N, Hales S. A review of potential public health impacts associated with the global dairy sector. *GeoHealth.* 2020;4(2): e2019GH000213.
15. Hernández-Castellano LE, Nally JE, Lindahl J, Wanapat M, Alhidary IA, Fanguero D, et al. Dairy science and health in the tropics: challenges and opportunities for the next decades. *Trop Anim Health Prod.* 2019; 51:1009–17.
16. Reta MA, Bereda TW, Alemu AN. Bacterial contaminations of raw cow's milk consumed at Jigjiga city of Somali regional state, Eastern Ethiopia. *Int J Food Contam.* 2016;3(1):1–9.
17. Al-Mahemdy HQ, Abdullah AH. Molecular detection of *Proteus vulgaris* isolated from urine of cow in AL-anbar province of Iraq. *Plant Arch.* 2020;20(2):1234–8.

18. Mokgaotsi GF. Assessment of bacteriological quality and handling of bovine raw milk collected from communal areas in Mahikeng, South Africa [PhD thesis]. North-West University (South Africa); 2019.
19. Shikh Bardsiri H, Shekibaei MR, Amini Kafiabadi S. Plasmid pattern of biofilm producing *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* among clinical isolates in Kerman university hospitals during 2011–2012. J Kerman Univ Med Sci. 2013;20(6):146–57.
20. Ejaz H, Junaid K, Yasmeen H, Naseer A, Alam H, Younas S, et al. Multiple antimicrobial resistance and heavy metal tolerance of biofilm-producing bacteria isolated from dairy and non-dairy food products. Foods. 2022;11(18):2728.
21. Edris SN, Hamad A, Awad DA, Sabeq II. Prevalence, antibiotic resistance patterns, and biofilm formation ability of Enterobacterales recovered from food of animal origin in Egypt. Vet World. 2023;16(2):403.
22. Cox AJ, Hukins DW. Morphology of mineral deposits on encrusted urinary catheters investigated by scanning electron microscopy. J Urol. 1989;142(5):1347–50.
23. Cherif-Antar A, Moussa-Boudjemâa B, Didouh N, Medjahdi K, Mayo B, Flórez AB. Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. Dairy Sci Technol. 2016; 96:27–38.
24. Yelin I, Snitser O, Novich G, Katz R, Tal O, Parizade M, et al. Personal clinical history predicts antibiotic resistance of urinary tract infections. Nat Med. 2019;25(7):1143–52.
25. Yuan F, Huang Z, Yang T, Wang G, Li P, Yang B, et al. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* in catheter-associated urinary tract infections. Urol Int. 2021;105(5–6):354–61.
26. Ronanki SP, Ramya P, Babu AJ, Sreedevi B. Epidemiological surveillance, molecular characterisation and virulent gene expression of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* from milk and meat samples. J Food Saf. 2023;43(4): e12987.
27. Owoseni MC, Oyigye O, Sani B, Lamin J, Chere A. Antimicrobial resistance and virulence genes profiling of proteus species from poultry farms in Lafia, Nigeria. BioRxiv. 2021 :2021-01.