

بررسی فراوانی مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها در ایزوله‌های سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا سرووار انتریتیدیس جدا شده از نمونه‌های گاستروانتریت بیمارستانی

چکیده

دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۰ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۷ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۴ آنلاین: ۱۴۰۲/۰۹/۰۱

کسری مردانی^{۱*}، فرهاد نیکخواهی^۱،
فاطمه فردصانعی^{۱*}

۱- مرکز تحقیقات میکروپزشکی، دانشگاه
علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۲- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده
پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین
ایران.

زمینه و هدف: سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا سرووار انتریتیدیس، یکی از مهمترین عوامل بیماری‌های منتقله از غذا است که در اثر مصرف فراورده‌های غذایی آلوده با منشا حیوانی به وجود می‌آید. گاستروانتریت سالمونلایی یک عفونت خود محدود شونده است که بدون نیاز به درمان آنتی‌بیوتیکی بهبود می‌یابد. اما بیماری می‌تواند به بیماری‌های سیستمیک تبدیل شود و این افراد نیاز به درمان دارند. هدف از مطالعه ما بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها می‌باشد.

روش بررسی: در طی این مطالعه در یک مطالعه مقطعی-توصیفی در فاصله زمانی شهریور ۱۴۰۱ تا شهریور ۱۴۰۲، ۴۴ جدایه سالمونلا انتریتیدیس از منابع انسانی مورد بررسی قرار گرفت. پس از تایید ایزوله‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد میکروبیولوژی و مولکولی، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها و فراوانی مقاومت تعیین شد.

یافته‌ها: در این مطالعه از ۴۴ جدایه سالمونلا انتریتیدیس مورد مطالعه، ۱۰۰٪ سویه‌ها به امپی‌پنم و مروپنم حساس بودند و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون، سفنازیدیم و سفوتاکسیم به ترتیب ۹۳٪، ۹۰٪، ۹۴٪ بودند. ۸۱٪ جدایه‌ها به کوتریماکسازول حساس بودند، حساسیت به آمپی‌سیلین ۸۴٪ بود. تنها ۹٪ جدایه‌ها به سیپروفلوکساسین حساس بودند. در بین سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین به روش فنوتیپی هیچ کدام از ژن‌های و *qnrS*، *qnrA*، *qnrB* مشاهده نگردید. تمام سویه‌های مقاوم به نالیدیکسیک اسید دارای ژن *gyrA* بودند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه نشان داده شد، مقاومت به خانواده فلوروکوئینولون‌ها در بین ایزوله‌های سالمونلا انتریتیدیس در حال افزایش می‌باشد. از طرفی شاهد کاهش حساسیت و بروز سویه‌های مقاوم به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف در بین سرووار انتریتیدیس هستیم، که داروی انتخابی عفونت‌های خارج روده‌ای می‌باشد.

کلمات کلیدی: گاستروانتریت، سالمونلا انتریتیدیس، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سیپروفلوکساسین.

* نویسنده مسئول: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین،
مرکز تحقیقات میکروپزشکی.

تلفن: ۰۲۸-۳۳۳۳۶۰۰۸

E-mail: f.fardsanei@qums.ac.ir

مقدمه

گاستروانتریت اپیدمیک و آندمیک در انسان در سرتاسر جهان می‌باشد. سالانه ۱۷ میلیون گاستروانتریت حاد یا اسهال به دلیل سالمونلوزیس غیرتیفوئیدی گزارش می‌شود که سه میلیون از آنها منجر به مرگ می‌شود.^۱ گاستروانتریت شایعترین و متداول‌ترین عفونت سالمونلایی در انسان می‌باشد که توسط سروتیپ‌های

سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا سرووار انتریتیدیس (*Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Enteritidis) با فرمول آنتی ژنیک H:gm O:1,9,12 یکی از مهمترین عوامل

میکروبی و تعیین فراوانی ژن های مقاومت به این آنتی بیوتیک ها می باشد.

روش بررسی

در این مطالعه مقطعی-توصیفی که در فاصله زمانی شهریور ۱۴۰۱ تا شهریور ۱۴۰۲ پس از اخذ کد اخلاق با شماره IR.QUMS.REC.1401.183 از دانشگاه علوم پزشکی قزوین نمونه های مدفوعی از تمام بیماران گاستروانتریت اسپورادیک بیمارستانی مراجعه کننده به بیمارستان های آموزشی شهر قزوین مشکوک به سالمونلوز کشت داده شد.

نمونه ها در آزمایشگاه ابتدا بر روی محیط GN broth کشت داده شده و پس از شش ساعت بر روی محیط های XLD و هکتون انتریک آگار (Hektoen enteric agar) کشت داده شدند. کلنی های سبز متمایل به آبی با کانون سیاه ایجاد شده روی محیط هکتون انتریک آگار و ایزوله جدا شده با ویژگی های بیوشیمیایی لاکتوز منفی، حرکت مثبت، واکنش دکربوکسیلاسیون لیزین مثبت، سترات مثبت، هیدرولیز اوره منفی و متیل رد مثبت به عنوان یک ایزوله متعلق به جنس سالمونلا قلمداد می گردید.^۵ آزمایش های تعیین گروه، پس از تعیین هویت جدایه ها با روش های فنوتیپی، از کلنی باکتری های تایید شده جهت تعیین سرگروپ با استفاده از آنتی سرم های پلی والان شرکت بهار افشان (Baharafshan, Iran) استفاده شد. جهت تعیین گروه از کشت ۲۴ ساعته و خالص باکتری در روی محیط TSI سوسپانسیون غلیظی با سرم فیزیولوژی بر روی یک لام تمیز تهیه کرده پس از مجاور نمودن با آنتی سرم های گروه A تا D آگلوتیناسیون بررسی شد.^۶

تمام جدایه هایی که متعلق به گروه D سالمونلا بودند برای تعیین هویت به روش مولکولی در محیط TSB حاوی ۱۰٪ گلیسرول در دمای ۸۰- ذخیره شدند. هویت جدایه های سالمونلا انتریتیدیس به روش Multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تایید شد. در این واکنش باند ۴۲۹ bp مربوط به 16srRNA و نشان دهنده جنس سالمونلا، باند ۳۱۰ bp مربوط به ژن *sef-A* (فیمبریه ای است که فقط در سالونلا انتریتیدیس دیده می شود) و باند ۲۵۰ bp مربوط به پلاسمید حدت *spv* در جنس سالمونلا می باشد.^۷ توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است. در یک واکنش PCR از هر کدام از مواد واکنش شامل آب مقطر و غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، XI بافر، ۰/۲

سالمونلا به ویژه سالمونلا تیفی موریوم (*Salmonella Typhimurium*) و انتریتیدیس (*Salmonella Enteritidis*) ایجاد می شود. افزایش شیوع سرووار انتریتیدیس به دهه ۱۹۷۰ بر می گردد که این سروتیپ به عنوان اولین عامل ایجادکننده عفونت سالمونلوز، جایگزین سروتیپ تیفی موریوم که قبلا شایعترین سرووار سالمونلا بوده است، گردید.^۲ شیوع عفونت با سالمونلا انتریتیدیس، در بسیاری از کشورها افزایش یافته است و این سروتیپ هم اکنون در اروپا غالبترین سروتیپی است که در جدایه های سالمونلا تعیین گردیده است. به نظر می رسد علت این جایگزینی، استفاده از مواد غذایی به صورت خام و نیم پز مثل گوشت مرغ، تخم مرغ و فرآورده های آن و همچنین صرف غذا در رستوران می باشد. دوره کمون بیماری معمولا ۲۴-۸ ساعت می باشد، ولی گاهی اوقات بسته به تعداد باکتری وارد شده درد، تب و لرز شروع می شود. معمولا اسهال آبکی و گاهی خونی نیز وجود دارد، از دست دادن آب و به هم خوردن تعادل الکترولیت ها از عوارض این بیماری در افراد پیر یا جوان می باشد. سالمونلوزیس حداکثر شیوع را در تابستان دارد. بیماری در شیرخواران، کودکان و همچنین افراد مسن شدت داشته و نگران کننده می باشد. افراد دارای نقص سیستم ایمنی، سوتغذیه، مبتلایان به بیماری های نئوپلاستیک، همچنین افرادی که تحت درمان با آنتی بیوتیک قرار دارند و یا داروهای سرکوب کننده ایمنی مصرف می کنند، همچنین خانم های باردار و افراد مسن از حساسیت بیشتری در برابر عفونت برخوردارند.^۳ فلوروکینولونها (Fluoroquinolones) و نسل سوم سفالوسپورین ها داروهای انتخابی درمان سالمونلوز مهاجم در انسان و نیز حیوانات می باشند. فلوروکینولونها آنتی بیوتیک های وسیع الطیفی هستند و مقاومت به این گروه آنتی بیوتیک ها معمولا به وسیله موتاسیون در ژن های کروموزومی رمزکننده آنزیم های هدف DNA ژیراز (DNA gyrase) و یا DNA توپوایزومراز (DNA topoisomerase) IV اتفاق می افتد و یا حاصل جهش در ژن های تنظیم کننده پروتیین های غشا خارجی و یا موتاسیونی که منجر به تغییر در تجمع دارو و پمپ های ایفلاکس می گردد، می باشد.^۴

اولین مقاومت مرتبط با پلاسمید نسبت به کینولونها، مربوط به ژن *qnrA* می باشد که در سال های اخیر تعیین هویت گردیده است. باتوجه به اهمیت فلوروکینولونها در درمان گاستروانتریت ناشی از سالمونلا انتریتیدیس، هدف از این مطالعه بررسی الگوی حساسیت

(Mueller Hinton Agar) آگار طبق دستورالعمل استاندارد (Clinical & Laboratory Standards Institute, CLSI) استفاده شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۱۸ ساعت قطر هاله عدم رشد به وسیله خطکش اندازه گرفته شد با استفاده از استاندارد جهانی CLSI 2023 به صورت حساس (S)، نیمه حساس (I) و مقاوم (R) تفسیر و ثبت گردید.^۸ سنجش غلظت مهارى سپیروفلوکساسین (MIC) با استفاده از E-Test، برای تمام جدایه‌هایی که به روش فنوتیپی و مولکولی به عنوان سالمونلا انتریتیدیس شناسایی شدند و در روش دیسک دیفیوژن دارای مقاومت و یا حساسیت کاهش یافته به نالیدیکسیک اسید بودند، MIC سپیروفلوکساسین تعیین شد.^۸ شناسایی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، پس از انجام آزمایش حساسیت میکروبی به روش دیسک دیفیوژن و شناسایی جدایه‌های مقاوم به سپیروفلوکساسین، با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی ژن‌های عامل مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها ردیابی شدند.^۹ توالی پرایمرها در جدول ۲ آمده است.

میلی‌مولار dNTP، ۰/۲۵ مولار پرایمر Forward، ۰/۲۵ میلی‌مولار پرایمر Reverse، ۰/۵ یونیت آنزیم Taq polymerase و ۱۰ نانوگرم DNA اضافه شد.^۷ تعیین الگوی حساسیت میکروبی، برای تعیین حساسیت سوش‌های شناسایی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان از روش استاندارد کربی بایر (Kirby Bauer) به روش دیسک دیفیوژن بهره گرفته شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در این پژوهش مربوط به شرکت MAST بوده و عبارتند از، آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۲۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفوروکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفپیم (۳۰ میکروگرم)، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، سپیروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، کوتریماکسازول (۲۵ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۴۰ میکروگرم) مروپنم (۴۰ میکروگرم). برای انجام آنتی‌بیوگرام از سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند و محیط مولر هیتون

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تایید مولکولی ایزوله‌های سالمونلا انتریتیدیس

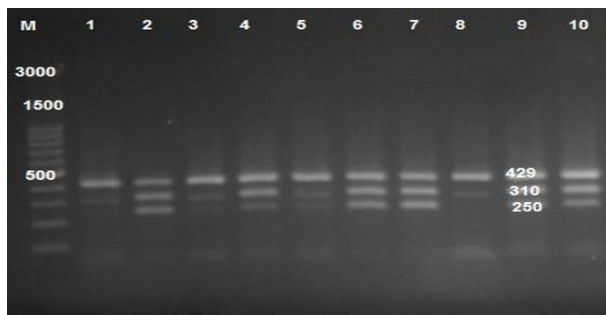
رفرنس	سایز باندها	توالی پرایمر	پرایمر	ژن
Mirzaei و همکاران ^۷	۴۲۹	GCCAACCATTGCTAAATGGCGCA GGTAGAAATTCCCAGCGGTACTGG	ST11 ST14	16srRNA
Mirzaei و همکاران ^۷	۲۵۰	GCCGTAGATACACGAGCTTA ACCTACGGGGACAATAAC	S1 S4	Spv
Mirzaei و همکاران ^۷	۳۱۰	GCAGCGTTACTATTGCAGC TGTGACAGGGACATTTAGCG	SEFA2 SEFA4	sef-A

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت بررسی ژن‌های مقاومت

رفرنس	سایز باندها	توالی پرایمر	نام ژن
Ahmed و همکاران ^۹	۵۱۶	F, ATTTCTCAGCCAGGATTTG R, GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	qnrA
Ahmed و همکاران ^۹	۴۶۹	F, GATCGTGAAAGCCAGAAAGG R, ACGATGCCTGGTAGTTGTC	qnrB
Ahmed و همکاران ^۹	۴۱۷	F, ACGACATTCGTCAACTGCAA R, TAAATTGGCACCCGTAGGC	qnrS
Ahmed و همکاران ^۹	۶۱۰	F: AGAGGATTTCTCAGCCAGG R: TGCCAGGCACAGATCTTGAC	gyrA

یافته‌ها

بر اساس نتایج MIC، ۱۶ ایزوله دارای MIC بین ۰/۰۰۲ تا ۰/۰۶۴ بودند و در منطقه حساس قرار گرفتند. ۲۸ ایزوله دارای MIC بین ۰/۱۲۵ تا ۰/۵ بودند و در منطقه حساسیت کاهش یافته قرار گرفتند. هیچ کدام از سویه‌های مقاوم به روش دیسک دیفیوژن با روش MIC مقاوم نبودند.



شکل ۱: نمایشگر محصولات ۴۲۹، ۳۱۰ و ۲۵۰ جفت‌بازی PCR تایید جدایه‌ها. M، مارکر ۳ کیلوبازی. ۱-۹ جدایه‌های سالمونلا انتریتیدیس. ۱۰، سوش استاندارد سالمونلا انتریتیدیس ATCC۱۳۰۷۶

در طی این مطالعه ۴۴ ایزوله سالمونلا انتریتیدیس به روش مولکولی جداسازی گردید. در تمام جدایه‌های تایید شده به روش فنوتیپی باندهای ۴۲۹ و ۳۱۰ جفت‌بازی مشاهده شدند (شکل ۱). حساسیت آنتی‌بیوتیکی، ۴۴ جدایه بالینی سالمونلا انتریتیدیس برای ۱۴ آنتی‌بیوتیک به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. همانگونه که در جدول ۳ نشان داده شده است، جدایه‌های سالمونلا انتریتیدیس دارای بیشترین حساسیت به ای‌می‌پنم و مروپنم (۱۰۰٪) بودند و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون، سفنازیدیم و سفوتاکسیم به ترتیب ۹۳/۲٪، ۹۰/۹٪، ۹۴/۱٪ بودند. جدایه‌ها به کوتریماکسازول حساس بودند، حساسیت به آمپی‌سیلین ۸۴/۱٪ بود. تنها ۹/۱٪ جدایه‌ها به سیپروفلوکساسین حساس بودند، در حالی که ۷۳/۱٪ جدایه‌ها دارای حساسیت متوسط بودند و ۱۳/۶٪ مقاوم بودند. بیشترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید مشاهده شد که ۶۴/۲٪ جدایه‌ها مقاوم بودند.

جدول ۳: درصد و فراوانی مقاومت ایزوله‌ها

تعداد (درصد)=۴۴		S	آنتی‌بیوتیک (غلظت بر حسب میکروگرم)
R	I		
۶(۱۳/۶)	۳۴(۷۷/۳)	۴(۹/۱)	سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)
۳(۶/۸)	۱(۲/۳)	۴۰(۹۰/۹)	سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)
۰(۰)	۲(۶/۹)	۴۲(۹۴/۱)	سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)
۵(۱۱/۵)	۲۷(۶۱/۵)	۱۲(۲۷)	سفوروکسیم (۳۰ میکروگرم)
۵(۱۱/۴)	۰(۰)	۳۹(۸۸/۶)	سفییم (۳۰ میکروگرم)
۳(۶/۸)	۰(۰)	۴۱(۹۳/۲)	سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)
۷(۱۵/۹)	۰(۰)	۳۷(۸۴/۱)	آمی‌سیلین (۲۰ میکروگرم)
۴(۹/۱)	۲(۴/۵)	۳۸(۸۶/۴)	استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم)
۷(۱۵/۹)	۱(۲/۳)	۳۶(۸۱/۸)	تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم)
۱(۲/۳)	۰(۰)	۴۳(۹۷/۷)	کلرامفنیل (۳۰ میکروگرم)
۸(۱۸/۲)	۰(۰)	۳۶(۸۱/۸)	کوتریماکسازول (۲۵ میکروگرم)
۰(۰)	۰(۰)	۴۴(۱۰۰)	ای‌می‌پنم (۴۰ میکروگرم)
۰(۰)	۰(۰)	۴۴(۱۰۰)	مروپنم (۴۰ میکروگرم)
۳۰(۶۸/۲)	۴(۹/۱)	۱۰(۲۲/۷)	نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)

سرووار انتریتیدیس در تهران از ۰.۵٪ در سال ۱۳۸۸ به ۰.۷۵٪ در سال ۱۴۰۲ هستیم.^۱

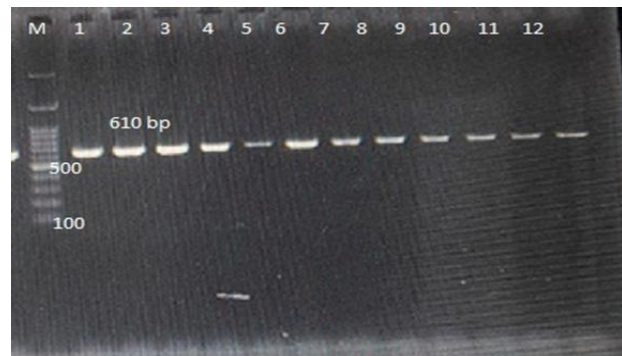
شیوع بالای مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی در پاتوژن‌های منتقل شونده از غذا، در سال‌های اخیر به دلیل استفاده وسیع مواد ضد میکروبی در موارد مختلف از جمله مصارف درمانی در پزشکی و دامپزشکی، مصارف پیشگیری و نیز به‌عنوان فاکتور رشد، گزارش شده است.^{۱۲}

مقاومت رو به افزایش آنتی‌بیوتیکی در سرووارهای سالمونلا غیرتیفوییدی، منجر به افزایش ایجاد سرووارهای دارای مقاومت چندگانه شده و یک مشکل جهانی برای بهداشت عمومی است.^{۱۳} انتقال ژن‌های مقاومت از باکتری‌های آلوده کننده حیوانات مورد استفاده به‌عنوان منبع غذایی انسان از طریق زنجیره غذایی به پاتوژن‌های انسانی خطر جدی برای سلامت انسان است.^{۱۴}

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۴۴ جدایه سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از نمونه‌های بالینی نشان داد که جدایه‌های سالمونلا انتریتیدیس دارای بیشترین حساسیت به ای‌می‌نم و مروینم (۱۰۰٪) بودند و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون، سفتازیدیم و سفوتاکسیم به ۹۳/۲٪، ۹۰/۹، ۹۴/۱٪ بودند. ۸۱/۸٪ جدایه‌ها به کوتریماکسازول حساس بودند، حساسیت به آمپی‌سیلین ۸۴/۱٪ بود. تنها ۹/۱٪ جدایه‌ها به سیپروفلوکساسین حساس بودند، در حالی که ۷۳/۱٪ جدایه‌ها دارای حساسیت متوسط بودند و ۱۳/۶٪ مقاوم بودند. بیشترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید مشاهده شد که ۶۴/۲٪ جدایه‌ها مقاوم بودند. تنها یک ایزوله به کلرامفنیکل مقاوم بود. سالمونلاها از جمله باکتری‌هایی هستند که قادر به کسب مقاومت نسبت به مواد ضد میکروبی از راه‌های مختلف می‌باشند و می‌توانند این صفت را به یکدیگر و سایر باکتری‌های روده‌ای انتقال دهند و بدین طریق می‌توانند منتشر شده و سبب بسیاری از اپیدمی‌ها گردند.^{۱۴}

امروزه فلوروکینولون‌ها و نسل سوم سفالوسپورین‌ها داروهای انتخابی درمان سالمونلوز مهاجم در انسان و نیز حیوانات می‌باشند. متأسفانه در سال‌های اخیر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های فوق در میان سرووارهای سالمونلا بروز نموده که درمان موفقیت‌آمیز موارد سالمونلوز مهاجم را پیچیده و مشکل نموده است.^{۱۴} در مطالعه Eshaghi Zadeh و همکاران در بین ۳۰ سرووار مختلف سالمونلا جدا

در این مطالعه در بین تمام ایزوله‌هایی که دارای مقاومت یا حساسیت کاهش‌یافته به سیپروفلوکساسین بودند، ژن‌های *qnrA*، *qnrB*، *qnrS* مشاهده نگردید. در بین تمام ایزوله‌هایی که دارای مقاومت به نالیدیکسیک اسید بودند ژن *gyrA* مشاهده گردید (شکل ۲).



شکل ۲: نمایشگر محصولات ۶۱۰ جفت‌بازی PCR تایید جدایه‌ها. M، مارکر ۳ کیلوبازی. ۱-۱۲، جدایه‌های سالمونلا انتریتیدیس

بحث

سالمونلوزیس یک گاستروانتریت ناشی از آلودگی با سرووارهای مختلف جنس سالمونلا و شایعترین نوع مسمومیت غذایی در جهان می‌باشد.^{۱۱}

از بین عوامل بیماری‌زایی باکتریایی، سالمونلا جایگاه ویژه‌ای داشته و سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا سرووار انتریتیدیس، یکی از مهمترین عوامل گاستروانتریت اپیدمیک و آندمیک در انسان در سرتاسر جهان می‌باشد. سالمونلا انتریتیدیس جز سه سروتیپ با اهمیت و غالب در اکثر کشورهای جهان در انسان می‌باشد، مخزن اصلی این سروتیپ، گله‌های طیور، گوشت و تخم مرغ خام آلوده است که منبع و ناقل مهمی جهت عفونت‌های انسانی محسوب می‌گردند.^{۱۱}

در این مطالعه، شایعترین سرووار سالمونلا انتریتیدیس با فراوانی ۷۵٪ گزارش شده است. که ما شاهد افزایش عفونت‌های سالمونلا و

Sánchez و همکاران مقاومت آنتی بیوتیکی ۴۹ ایزوله سالمونلا را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های خانواده فلوروکینولون از جمله سیپروفلوکساسین، لوفلوکساسین و انروفلوکساسین به ترتیب ۷۵٪، ۵۷٪/۱ و ۳۸٪/۸ گزارش شده است. در این مطالعه ۲۴/۴۹ دارای ژن *qnrB* بودند.^{۱۷}

Long و همکاران الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی وفاکتورهای ویروالانس سویه های غیر تیپویدی سالمونلا را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه ۸۹٪ سویه ها MDR گزارش شده اند. در این مطالعه ۳۴/۵٪ سویه ها به نالیدیکسیک اسید و ۱۳/۸٪ به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند.^{۱۸} Abdi و همکاران تعداد ۶۱ ایزوله سالمونلا انتریتیدیسی جدا شده را از لحاظ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی مورد بررسی قرار دادند.

نتایج آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که ۴۴ جدایه (۷۳/۳٪) به نالیدیکسیک اسید مقاوم بود. از بین سویه های مورد بررسی به ترتیب فراوانی *qnrB* و *qnrS*، ۶۲/۵٪ و ۳۷/۵٪ گزارش شده است.^{۱۹} در مطالعه ما هیچ کدام از سویه های مقاوم به نالیدیکسیک اسید حاوی ژن های فوق نبودند. ولی ژن *gyrA* در تمام سویه های مقاوم به مشاهده گردید.

مقاومت به سفالوسپورین های با دامنه وسیع در میان سویه های سالمونلا طی دو دهه ی گذشته در حال افزایش بوده است. مطالعه حاضر نشانگر بروز مقاومت در جدایه های سالمونلا نسبت به سفالوسپورین های نسل سوم نظیر سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفنازیدیم می باشد.

مطالعات انجام شده توسط Eshraghi و همکاران، Fardsanei و همکاران نشان دهنده افزایش جدایه های سالمونلا نسبت به سفالوسپورین های نسل سوم می باشد. میزان مقاومت به دست آمده نسبت به آنتی بیوتیک سفنازیدیم ۶/۸٪ به دست آمده است. همچنین ۶/۸٪ جدایه به سفتریاکسون مقاوم بودند.^{۲۰}

ایجاد مقاومت نسبت به سفتریاکسون اهمیت بالینی دارد زیرا سفتریاکسون به عنوان داروی نجات بخش حیات به خصوص در موارد درمان سالمونلوز مهاجم در کودکان محسوب می گردد. مشاهده مقاومت نسبت به سفالوسپورین های نسل سوم، نشان دهنده استفاده بدون نظارت داروهای فوق می باشد که درمان عفونت سالمونلوز را در موارد ضروری مخاطره آمیز می نماید. از طرفی دلیل گسترش روز

شده از کودکان مبتلا به گاستروانتریت از بیمارستان مرکز طی کودکان شایعترین سرووار سالمونلا انتریتیدیسی با فراوانی ۳۶٪ و سپس سالمونلا پاراتیپی B بود. بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی به نالیدیکسیک اسید با فراوانی ۵۳/۳٪ مشاهده شد. ۸۱٪ سویه ها MDR بودند. در مطالعه ما نیز شایعترین سرووار انتریتیدیسی و بیشترین میزان مقاومت به نالیدیکسیک اسید مشاهده گردید.^{۱۵}

با تعیین MIC آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین که نسبت به روش دیسک دیفیوژن از دقت بالاتری برخوردار است، در جدایه هایی که دارای حساسیت کاهش یافته یا مقاومت در روش دیسک دیفیوژن بودند، هیچ کدام از جدایه ها دارای مقاومت نبودند.

و مابقی جدایه ها که دارای حساسیت کاهش یافته در آزمون دیسک دیفیوژن بودند دارای MIC ما بین ۰/۲۵-۰/۰۰۶ μg/ml بودند و طبق پروتکل استاندارد CLSI ۲۰۲۳ دارای حساسیت و یا حساسیت کاهش یافته نسبت به این دارو تشخیص داده شدند. دامنه میزان MIC سیپروفلوکساسین در سایر مطالعات در مناطق مختلف نیز مانند نتیجه ما بود.

در مطالعه حاضر در هیچ کدام از جدایه هایی که دارای مقاومت و یا حساسیت کاهش یافته نسبت به سیپروفلوکساسین بودند ژن های *qnrA*، *qnrB*، *qnrS* مشاهده نگردید. نتیجه به دست آمده در مطالعه حاضر با مطالعه Hur و همکاران در کره مطابقت دارد. در این مطالعه نشان داده شده است که در بین ۴۶ ایزوله ۳۹ ایزوله به نالیدیکسیک اسید و یک ایزوله به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند.

با این حال تنها یک ایزوله ژن *qnr* را حمل می کرد که نشان می دهد مقاومت در سالمونلا انتریتیدیسی به کوئینولون ها وابسته به این ژن نمی باشد. این سطح از مقاومت در مقابل این گروه فلوروکینولون ها، احتمالاً مربوط به موتاسیون در ژن های نظیر *gyrA* و *parC* می باشد و ممکن است حاصل فشار انتخابی بالا ناشی از مصرف زیاد و روزمره آنتی بیوتیک های انروفلوکساسین و دیفلوکساسین در طیور باشد.

امروزه آنتی بیوتیک های انروفلوکساسین و دیفلوکساسین از فلوروکینولون های اصلی هستند که در درمان عفونت های باکتریایی گرم منفی طیور در ایران تجویز می شوند. در مطالعه ما نیز تمام سویه های مقاوم به فلوروکینولون ها دارای ژن *gyrA* بودند.^{۱۶}

افزایش این سروار در جدایه‌های انسانی و غذایی به موازات افزایش آن در سرتاسر جهان هستیم.

فلوروکینولون‌ها و نسل سوم سفالوسپورین‌ها داروهای انتخابی درمان سالمونلوز مهاجم در انسان و نیز حیوانات می‌باشند. متأسفانه در سال‌های اخیر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های فوق در میان سروارهای سالمونلا بروز نموده که درمان موفقیت‌آمیز موارد سالمونلوز مهاجم را پیچیده و مشکل نموده است.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه تحت عنوان "ارزیابی اثر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به عنوان داروی انتخابی در درمان گاستروانتریت‌های ناشی سالمونلا ۱ نتریتیدیس" در مقطع دکتری عمومی در رشته پزشکی در سال ۱۴۰۲ با کد پایان نامه ۱۷۷۶ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی گروه میکروب شناسی اجرا شده است.

افزون این گونه مقاومت‌ها غالباً ژن‌های پلاسمیدی سازنده آنزیم بتالاکتاماز می‌باشند که باعث غیرفعال شدن هسته مرکزی سفالوسپورین‌ها و بی‌اثر شدن دارو می‌شوند.^{۲۱}

باید توجه داشت که الگوی مقاومت دارویی یک پدیده محلی است و استفاده از آنتی‌باکتریال‌ها با توجه به الگوی مقاومت دارویی دیگر مناطق یا کشورها چندان جایز نیست، چرا که بنا به مکان و زمان این الگوها تغییر می‌کنند. بنابراین نظارت و کنترل دقیق مواد غذایی از لحاظ آلودگی به سالمونلا و بررسی الگوی مقاومت دارویی آن یکی از راه‌های مهم پیشگیری و کاهش عفونت‌های انسانی می‌باشد.

نتیجه‌گیری، سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا سروار انتریتیدیس، یکی از مهمترین عوامل گاستروانتریت اپیدمیک و آندمیک در انسان در سرتاسر جهان می‌باشد. در این مطالعه شاهد

References

- Eshraghi S, Dalall MM, Fardsanei F, Salehi TZ, Ranjbar R, Nikmanesh B, Aminharati F, Abdosamadi Z, Akbari A. Salmonella enteritidis and antibiotic resistance patterns: a study on 1950 children with diarrhea. *Tehran University Medical Journal* 2010;67(12):876-82.
- McKelvey JA, Yang M, Jiang Y, Zhang S. Salmonella enterica serovar Enteritidis antimicrobial peptide resistance genes aid in defense against chicken innate immunity, fecal shedding, and egg deposition. *Infect Immun* 2014;82:5185-202.
- Zou M, Keelara S, Thakur S. Molecular characterization of Salmonella enterica serotype Enteritidis isolates from humans by antimicrobial resistance, virulence genes, and pulsed-field gel electrophoresis. *Foodborne Pathog Dis* 2012;9:232-8. [3]
- Herrera-Sánchez MP1, Castro-Vargas RE1, Fandiño-de-Rubio LC2, Rodríguez-Hernández R2, Molecular identification of fluoroquinolone resistance in Salmonella spp. isolated from broiler farms and human samples obtained from two regions in Colombia. *Vet World* 2021
- Washington Winner JR, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, P S, et al. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th edn. Lippincott Williams and Wilkins Press, Philadelphia. 2001.
- Popoff MY, Bockemühl J, Gheesling LL. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Microbiol. Res* 2004;155 (7):568-70.
- Mirzaie S, Hassanzadeh M, Ashrafi I. Identification and characterization of Salmonella isolates from captured house sparrows. *Turk J Vet Anim Sci.* 2010; 34(1):181-6.
- Patel J, Cockerill F, Alder J, Bradford P, Eliopoulos G, Hardy D. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: thirty-three informational supplement. *CLSI standards for antimicrobial susceptibility testing* 2023; 34(1):1-226.
- Ahmed AM, Ishida Y, Shimamoto T. Molecular characterization of antimicrobial resistance in Salmonella isolated from animals in Japan. *Journal of applied microbiology* 2009;106(2):402-9.
- Ayelo Navarro A, Geronimo Pardo M, Torres Lamberti V, Mateo Cerdan CM, Jimenez Vizuete JM, Peyro Garcia R. [Salmonella enteritidis bacteraemia as clinical onset of acquired immune deficiency syndrome]. *Revista espanola de anestesiologia y reanimacion* 2013; 60(2):103-5.
- Taneja N, Appannanavar SB, Kumar A, Varma G, Kumar Y, Mohan B, Sharma M. Serotype profile and molecular characterization of antimicrobial resistance in non-typhoidal Salmonella isolated from gastroenteritis cases over nine years. *Journal of medical microbiology* 2014;63(1):66-73.
- Rayamajhi N, Kang SG, Kang ML, Lee HS, Park KY, Yoo HS. Assessment of antibiotic resistance phenotype and integrons in Salmonella enterica serovar Typhimurium isolated from swine. *Journal of Veterinary Medical Science* 2008;70(10):1133-7.
- Galanis E, Wong DM, Patrick ME, Binsztein N, Cieslik A, Chalermchaikit T, Aidara-Kane A, Ellis A, Angulo FJ, Wegener HC. Web-based surveillance and global Salmonella distribution, 2000-2002. *Emerging infectious diseases* 2006;12(3):381.
- Tack B, Vanaenrode J, Verbakel JY, Toelen J, Jacobs J. Invasive non-typhoidal Salmonella infections in sub-Saharan Africa: a systematic review on antimicrobial resistance and treatment. *BMC medicine* 2020;18:1-22.
- Eshaghi Zadeh SH, Fahimi H, Fardsanei F, Soltan Dallal MM. Antimicrobial resistance and presence of class 1 integrons among different serotypes of Salmonella spp. recovered from children with diarrhea in Tehran, Iran. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)* 2020;20(2) :160-6.
- Hur J, Kim JH, Park JH, Lee YJ, Lee JH. Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant Salmonella enteritidis strains isolated from poultry. *Vet Journal* 2011; 189:306-11.
- Herrera-Sánchez MP, Castro-Vargas RE, Fandiño-de-Rubio LC, Rodríguez-Hernández R, Molecular identification of fluoroquinolone resistance in Salmonella spp. isolated from broiler farms and human samples obtained from two regions in Colombia. *Vet World* 2021
- Long L, You L, Wang D, Wang M, Wang J, Bai G, et al. Highly prevalent MDR, frequently carrying virulence genes and antimicrobial resistance genes in Salmonella enterica serovar 4,[5],12:i:- isolates from Guizhou Province, China. *PLoS ONE*

- 2022; 17(5): e0266443.
19. Hanieh Abdi, Kumars Amini , Akram Sadat Tabatabaee Bafroee. Detection of Quinolone resistance genes in the *Salmonella* enteritidis strains isolated from food samples by Multiplex-PCR method. *Sabzevar University of Medical Sciences* 2018.1-6.
 20. Fardsanei F, Nikkhahi F, Bakhshi B, Salehi TZ, Tamai IA, Dallal MS. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from food and human samples by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profiling, (GTG) 5-PCR and ERIC-PCR. *New microbes and new infections* 2016;14:24-30.
 21. Capuano F, Mancusi A, Capparelli R, Esposito S, Proroga YT. Characterization of drug resistance and virulotypes of *Salmonella* strains isolated from food and humans. *Foodborne Pathogens and Disease* 2013;10(11):963-8.

Investigation of the frequency of resistance to fluoroquinolones in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Enteritidis* isolates isolated from hospital gastroenteritis samples

Kasra Mardani M.D.^{1,2}
 Farhad Nikkhahi Ph.D.¹
 Fatemeh fardsanei Ph.D^{1*}

1- Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
 2- Student Research Committee, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

* Corresponding author: Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
 Tel: +98-28-33336008
 E-mail: f.fardsanei@qums.ac.ir

Abstract

Received: 02 Oct. 2023 Revised: 09 Oct. 2023 Accepted: 15 Nov. 2023 Available online: 22 Nov. 2023

Background: *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype *Enteritidis* (*S. Enteritidis*) is one of the leading causes of food-borne infections associated with the consumption of contaminated food products of animal origin in humans. gastroenteritis due to *Salmonella* is usually a self-limiting disease and does not require antibiotic therapy. However, antibiotic treatment for salmonellosis may be lifesaving for patients with severe infections. The objective of the present study was to examine antimicrobial resistance and determine its genetic basis in recently isolated *S. Enteritidis* strains.


Methods: During this study, in a cross-sectional descriptive study, 44 isolates of *Salmonella enteritidis* from human sources were investigated between September 2021 and September 2022. After identification of the isolates using phenotypic and molecular methods by Multiplex-PCR, antibiotic resistance testing was performed according CLSI 2023. The strains were examined for the presence of *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *gyrA* resistance genes by PCR.

Results: In a cross-sectional descriptive study, 44 isolates of *Salmonella Enteritidis* from human sources were investigated between September 2022 and September 2023. 100% of the strains were sensitive to imipenem and meropenem, and the sensitivity to the antibiotics ceftriaxone, ceftazidime, and cefotaxime were 93.2%, 90.9%, and 94.1%, respectively. 81.8% of isolates were sensitive to cotrimoxazole, sensitivity to ampicillin was 84.1%. Only 9.1% of isolates were sensitive to ciprofloxacin. Based on MIC results, 16 isolates had MIC between 0.002 and 0.064 and were placed in the sensitive area. 28 isolates had MIC between 0.125 and 0.5 and were placed in the area of reduced sensitivity. None of the strains resistant to disk diffusion method were resistant to MIC method. *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* genes were not observed among ciprofloxacin resistant strains. All nalidixic acid resistant strains had *gyrA* gene.

Conclusion: In general, it was shown in this study that the resistance to the fluoroquinolone family is increasing among *Salmonella Enteritidis* isolates. On the other hand, we see a decrease in the sensitivity and prevalence of strains resistant to broad-spectrum cephalosporins among serovar *Enteritidis*, which is the drug of choice for extraintestinal infections.

Keywords: *Salmonella Enteritidis*, antibiotic resistance, gastroenteritis, ciprofloxacin.

Copyright © 2023 Mardani et al. Published by Tehran University of Medical Sciences.

 This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.