Archive of SID

DOI: 10.22055/ivj.2019.195428.2169

بررسی پس زمینه‌ی فیلوژنتیکی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* به دست آمده از سگ‌های سالم خانگی و صاحبان آن‌ها در شهر کرمان

اسما عسکری[۱]، رضا قنبرپور[۲*]، محمدرضا افلاطونیان[۳]، بهارک اختردانش[۴]، حمید شریفی[۵] و مازیار جاجرمی[۶]

[۱] پژوهشگر، مرکز تحقیقات بیماری های گرمسیری و عفونی دانشگاه علوم پزشکی کرمان و دانش‌آموخته‌ی دکترای تخصصی باکتری‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

[۲] استاد، گروه تحقیقاتی میکروبیولوژی مولکولی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

[۳] استادیار، مرکز تحقیقات بیماری های گرمسیری و عفونی دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

[۴] استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده ی دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

[۵] استاد، مرکز تحقیقات مراقبت HIV و عفونت های آمیزشی و مرکز همکار سازمان جهانی بهداشت، پژوهشکده آینده پژوهی در سلامت و استاد، گروه اپیدمیولوژی، آمار زیستی و بهداشتی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

[۶] استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۵/۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۱۷

چکیده

نمونه‌گیری بدون در نظر گرفتن مصرف یا عدم مصرف آنتی‌بیوتیک در سگ‌های مورد مطالعه انجام شد و براساس تاریخچه‌ی سگ‌های تحت مطالعه، ۹۰ درصد آن‌ها طی چند ماه اخیر آنتی‌بیوتیک مصرف نکرده بودند. در این مطالعه مجموعاً ۱۶۸ سویه‌ی *اشریشیاکلی* متعلق به سگ‌های خانگی سالم (۴۹ قلاده)، صاحبان آن‌ها (۴۹ نفر) و افراد فاقد حیوان خانگی (۷۰ نفر) مورد بررسی قرار گرفت؛ حضور یا عدم حضور توالی‌های فیلوژنتیکی شامل *chuA*، *yjaA* و TspE4.C2 با کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ردیابی شد. همچنین جدایه‌ها از نظر مقاومت ضدمیکروبی علیه ۱۱ آنتی‌بیوتیک پر مصرف در سگ‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند که این آنتی‌بیوتیک‌ها شامل اریترومایسین، استرپتومایسین، انروفلوکساسین، اکسی‌تتراسایکلین، سفوتاکسیم، آمپی‌سیلین، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول، آموکسی‌سیلین کلاولانیک‌اسید، سفتازیدیم، سفتریاکسون و کانامایسین بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که جدایه‌های *اشریشیاکلی* در فیلوگروه‌های A، D، B_1 و B_2 به ترتیب با فراوانی‌های ۵۵/۹، ۳۰/۳، ۷/۱ و ۵/۳ درصد قابل طبقه‌بندی می‌باشند. مقاومت ضدمیکروبی علیه اریترومایسین و اکسی‌تتراسایکلین به طور قابل ملاحظه‌ای بالا بود، در حالی که کم‌ترین فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه سفتریاکسون، سفتازیدیم، آموکسی‌سیلین کلاولانیک اسید و کانامایسین مشاهده گردید. این مطالعه بر روی سگ‌های به ظاهر سالم انجام شده است بنابراین می‌تواند نقش حاملی آن‌ها را برای سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک تعیین کند. نتایج نشان داد که سگ‌های خانگی باید به عنوان مخازن مهم سویه‌های *اشریشیاکلی* مقاوم به خصوص علیه اریترومایسین، اکسی‌تتراسایکلین، استرپتومایسین، انروفلوکساسین، سفوتاکسیم و آمپی-سیلین که عمدتاً متعلق به گروه‌های فیلوژنتیکی A و D هستند، در نظر گرفته شوند.

کلمات کلیدی: *اشریشیاکلی*، سگ، صاحبان، مقاومت ضدمیکروبی، فیلوژنتیک

*نویسنده مسئول : رضا قنبرپور، استاد، گروه تحقیقاتی میکروبیولوژی مولکولی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

E-mail: ghanbar@uk.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در میان مردم سگ‌ها از محبوب‌ترین حیوانات خانگی و نگهبان محسوب می‌شوند و در ارتباط تنگاتنگی با انسان قرار دارند. سگ‌ها ممکن است مخزن بسیاری از عوامل بیماری‌زای میکروبی برای انسان باشند لذا از نظر بهداشت عمومی دارای موقعیت بسیار مهمی هستند (Zogg et al. 2008; Damborg et al. 2009). باکتری *اشریشیاکلی* به طور معمول از مدفوع انسان و بسیاری از حیوانات خون‌گرم مانند سگ، گربه، گاو، گوسفند و غیره جداسازی می‌شود (Sperandio and Hovde 2015). بنابراین به طور بالقوه میزبانان مذکور می‌توانند مخزن سویه‌های *اشریشیاکلی* بیماری‌زا و یا مقاوم به آنتی‌بیوتیک باشند؛ به طور کلی جمعیت‌های *اشریشیاکلی* در انتشار عوامل حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین میزبانان مختلف دارای نقش کلیدی می‌باشند (Alizade 2018).

آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی در زمینه‌ی درمان و پیشگیری عفونت‌ها در سگ‌ها توسط دامپزشکان مورد تجویز قرار می‌گیرند. در تحقیقی که در ایالات متحده در زمینه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های پرمصرف در سگ‌ها در بیمارستان‌های دامپزشکی انجام شده است، آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر آموکسی‌سیلین کلاولانیک اسید، سفازولین، سفالکسین، انروفلوکساسین، آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین و داکسی‌سیکلین در میان آنتی‌بیوتیک‌های پرمصرف قرار گرفته‌اند (Wayne et al. 2011). درمان‌های آنتی‌بوتیکی باعث ایجاد یک فشار انتخابی می‌شود که به نفع میکروارگانیسم‌های مقاومی است که در میکروبیوتای دستگاه گوارش موجود هستند (Gasparrini et al. 2016). فرضیه بر این است که درمان‌های آنتی‌بیوتیکی در سگ‌های خانگی می‌تواند آن‌ها را به آهستگی به یک منبع سویه‌های مقاوم آنتی‌بیوتیکی برای محیط و افراد، به خصوص برای صاحبان‌شان تبدیل کند.

سویه‌های مقاوم یا غیرمقاوم *اشریشیاکلی* دارای تنوع ژنتیکی می‌باشند ولی از نظر کلونال می‌توانند به چهار گروه اصلی فیلوژنتیکی شامل A، B_1، B_2 و D بر اساس روش PCR طبقه‌بندی شوند (Jang et al. 2017; Clermont et al. 2000; Clermont et al. 2013). فیلوتیپ‌ها ممکن است با خصوصیات اکولوژیکی سویه‌های *اشریشیاکلی* در ارتباط باشد؛ به عنوان مثال فیلوگروه A عمدتاً در انسان وجود دارد، در حالی که B_1 بیش‌تر در حیوانات مشاهده می‌شود (Tenaillon et al. 2010). مطالعات بر روی زمینه‌ی فیلوژنتیکی سویه‌های *اشریشیاکلی* نشان می‌دهد که بیش‌تر سویه‌های اسهال‌زا احتمالاً به گروه‌های A و B_1 و سویه‌های با سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی پایین معمولاً به گروه B_2 تعلق دارند (Girardeau et al. 2005; Escobar-Paramo et al. 2004). بنابراین تعیین گروه فیلوژنتیکی جدایه‌های *اشرشیاکلی* می‌تواند داده‌های مفیدی را در مورد ماهیت اکولوژیکی و بیماری‌زایی آن‌ها در اختیار ما قرار دهد.

این مطالعه در تلاش است تا به بررسی مقاومت فنوتیپی آنتی‌بیوتیکی و پس‌زمینه‌ی فیلوژنتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* که از سگ‌های خانگی سالم و صاحبان شان به دست آمده است، بپردازد. نتایج این پروژه می‌توانند برای آگاهی از موقعیت اپیدمیولوژیکی سگ‌های خانگی سالم به عنوان انتشاردهنده‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مفید باشد و به تعیین استراتژی‌های پیش‌گیرانه و کنترلی در عرصه‌ی دامپزشکی و حتی پزشکی کمک کند.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری بدون در نظر گرفتن فاکتور مصرف یا عدم مصرف آنتی‌بیوتیک در سگ‌های مورد مطالعه انجام شد چرا که بر اساس گفته‌های صاحبان سگ‌های تحت مطالعه، ۹۰ درصد سگ‌ها طی چند ماه اخیر آنتی‌بیوتیک مصرف نکرده بودند. در این مطالعه، ۱۶۸ سواب مقعدی از سگ‌های خانگی سالم (تعداد = ۴۹) و صاحبان‌شان (تعداد = ۴۹) و افراد بدون حیوان خانگی (تعداد = ۷۰) در طول یکسال (بهار ۱۳۹۶ تا بهار ۱۳۹۷) در جنوب شرق ایران، شهرستان

www.SID.ir

Archive of SID

کرمان، جمع‌آوری گردید. در طول مطالعه، فرمی در اختیار صاحبان حیوانات قرار داده شد تا اطلاعاتی از قبیل جنس، نژاد، مکان، سابقه بیماری، سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک و نوع تغذیه را در اختیار ما قرار دهند. همچنین رضایت صاحبان حیوانات برای جمع‌آوری نمونه مدفوعی نیز در نظر گرفته شده بود (کد اخلاق در پژوهش‌های زیستی: IR.KMU.REC.1397.03). سن سگ‌های مورد مطالعه از ۱/۵ ماه تا ۷ سال متغیر بود. از نظر جنسیت، ۲۹ سگ از جنس ماده و ۲۰ قلاده نیز از جنس نر بودند. نژاد سگ‌ها عبارت بودند از اشپیتز (۲ قلاده)، باکسر (۴ قلاده)، ترییر (۱۶ قلاده)، دابرمن (۲ قلاده)، ژرمن شفرد (۱۴ قلاده)، شیتزو (۵ قلاده)، میکس (۲ قلاده)، یورکشایر (۱ قلاده) و تریرپوذل (۳ قلاده). از نظر شرایط نگهداری، ۲۷ مورد، ۷ مورد، ۱۳ مورد و ۲ مورد از سگ‌هایی که از آن‌ها نمونه‌گیری شده بود به ترتیب در شرایط انفرادی در داخل خانه، انفرادی در بیرون از خانه، به همراه چند حیوان خانگی در بیرون از خانه و به همراه چند حیوان خانگی در داخل خانه نگهداری می‌شدند. تغذیه‌ی ۹ مورد از سگ‌ها توسط غذاهای تجاری، ۳۳ مورد توسط غذای پخته‌ی خانگی و ۷ مورد با کمک غذاهای خام انجام می‌شده است. اکثر سگ‌ها از زمان تولد در ارتباط با صاحبان خود بوده‌اند.

سواب‌ها در محیط ایمیس (مرک، آلمان) قرار داده شدند و طی ۱۲ تا ۲۴ ساعت به آزمایشگاه میکروبیولوژی دامپزشکی ارجاع داده شدند. بعد از کشت روتین در محیط مک‌کانکی (مرک، آلمان)، یک کلنی مشکوک به *اشریشیاکلی* انتخاب شده و با تست‌های بیوشیمی تأیید شد (Markey et al. 2013). جدایه‌های *اشریشیاکلی* در محیط لوریا برتانی براث (مرک، آلمان) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد برای یک شب تا صبح انکوبه گردیدند. سپس گلیسرول استریل تا رقت ۲۵ درصد اضافه شد و بعد از ورتکس، بلافاصله در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شدند (Alizade et al. 2018).

در این مرحله، ابتدا استخراج DNA بر روی جدایه‌های *اشریشیاکلی* با روش جوش انجام شد (Amiri et al. 2017). سپس توالی‌های *chuA* (۲۷۹ bp)، *yjaA* (۲۱۱ bp) و TspE4.C2 (۱۵۲ bp) به صورت مولکولی جستجو شدند و زمینه‌ی فیلوژنتیکی سویه‌های *اشریشیاکلی* با استفاده از PCR تریپلکس که پیش از این توسط Clermont و همکاران در سال ۲۰۰۰ ارائه شده است، مشخص گردید (Clermont et al. 2000). کنترل مثبت برای توالی‌های مذکور، سویه EcoR62 و کنترل منفی برای تمام واکنش‌ها آب مقطر بود. محصولات PCR پس از الکتروفورز (۸۵ وات به مدت ۴۵ دقیقه) در ژل آگارز ۱/۵ درصد، و رنگ‌آمیزی با FluoroVue (SMOBio، تایوان) و عکس‌برداری با دستگاه GelDoc۱۰۰۰ (ویلبرلورمات، فرانسه) از نظر حضور یا عدم حضور توالی‌های مورد نظر، تحت بررسی قرار گرفتند.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اشریشیاکلی* با روش دیسک دیفیوژن کربی بائر (Jorgensen and Turnidge 2015)، برای ۱۱ آنتی‌بیوتیک پر مصرف در سگ‌های خانگی شامل اریترومایسین (E، ۱۵ µg)، استرپتومایسین (S، ۱۰ µg)، انروفلوکساسین (NFX، ۵ µg)، اکسی‌تتراسایکلین (T، ۳۰ µg)، سفوتاکسیم (CTX، ۳۰ µg)، آمپی‌سیلین (AM، ۱۰ µg)، تریمتوپریم-سولفامتوکسازول (SXT، ۱/۲۵ µg:۲۳/۷۵)، آموکسی‌سیلین کلاولانیک اسید (AMC، ۲۰ µg:۱۰)، سفتازیدیم (CAZ، ۳۰ µg)، سفتریاکسون (CRO، ۳۰ µg) و کانامایسین (K، ۳۰ µg) (پادتن طب، ایران) مورد ارزیابی قرار گرفتند. از سویه *اشریشیاکلی* ATCC ۲۵۹۲۲ به عنوان کنترل تست‌ها استفاده شد و نتایج بر اساس راهنمای مؤسسه استانداردهای کلینیکی و آزمایشگاهی آنالیز گردیدند (CLSI 2018).

تمامی داده‌های مربوط به حضور یا عدم حضور انواع گروه‌های فیلوژنتیکی و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در هر جدایه وارد برنامه اکسل (مایکروسافت ۲۰۱۶) و برنامه SPSS (SPSS 24; IBM) شد تا درصد شیوع به صورت آمار توصیفی محاسبه شود. نهایتاً، فاصله اطمینان و معنی‌داری تفاوت‌ها بین مقادیر مختلف، با کمک آزمون مربع

www.SID.ir

Archive of SID

کای (سطح اطمینان ۹۵ درصد و مقادیر $p<۰/۰۵$) محاسبه گردید.

نتایج

در این مطالعه، ۱۶۸ جدایه *اشریشیاکلی* که از همین تعداد میزبان جداسازی شده بود، در گروه‌های فیلوژنتیکی A (۵۵/۹ درصد)، D (۳۰/۳ درصد)، B_1 (۷/۱ درصد) و B_2 (۵/۳ درصد) طبقه‌بندی شد؛ هیچ یک از جدایه‌های *اشریشیاکلی* به دست آمده از صاحبان حیوانات در گروه‌های B_1 و B_2 قرار نداشتند (Fig 1).

نتایج آنتی‌بیوگرام نشان داد که ۹۶/۴ درصد (۱۶۲ از ۱۶۸ جدایه) دارای مقاومت چندگانه‌ی دارویی نسبت به بیش از یک عامل آنتی‌بیوتیکی داشته‌اند و بقیه‌ی جدایه‌ها (چهار جدایه؛ ۲/۴ درصد) تنها به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های تحت بررسی مقاومت نشان دادند و تنها دو جدایه (۱/۲ درصد) به هیچ یک از آنتی‌بیوتیک‌های مذکور مقاومت نشان ندادند.

مجموعا، ۱۰۶ الگوی مختلف مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده شد که شیوع هر کدام از آن‌ها بین ۰/۵ تا ۱/۷ درصد بود. همچنین، دو جدایه (به دست آمده از یک سگ و یک کنترل) به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش حساسیت نشان دادند، در حالی که سه جدایه (به دست آمده از کنترل‌ها) به تمام عوامل آنتی‌بیوتیکی مقاوم بودند.

فراوان‌ترین فنوتیپ مقاومت متعلق به اریترومایسین (۸۹/۷ درصد در سگ‌های سالم، ۱۰۰ درصد در صاحبان حیوانات و ۹۵/۷ درصد در کنترل‌ها) و سپس اکسی‌تتراسایکلین (۷۱/۴ درصد از ۱۶۸ جدایه‌ی به دست آمده از هر سه میزبان) بود (جدول ۱ و شکل ۲). کم‌ترین فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب در برابر کانامایسین (۲۵/۵ درصد)، سفتازیدیم (۲۷/۹ درصد)، آموکسی‌سیلین کلاولانیک اسید (۲۸/۵ درصد)، سفتریاکسون (۲۹/۱ درصد) و انروفلوکساسین (۳۸ درصد) ثبت شد (جدول ۱ و شکل ۲). شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر اریترومایسین، استرپتومایسین، سفوتاکسیم و سفتریاکسون در صاحبان بیش از گروه‌های کنترل و سگ‌ها بود، در حالی که میزان تکرار مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به انروفلوکساسین، اکسی‌تتراسایکلین، آمپی‌سیلین و تری‌متوپریم–سولفامتوکسازول در گروه کنترل بیش از صاحبان بود (Table 1 و Fig 2).

در این مطالعه مشاهده شد که از نظر گروه فیلوژنتیکی، ۱۸ جدایه‌ی متعلق به سگ‌های سالم خانگی دارای مشخصات یکسانی با جدایه‌های صاحبان‌شان می‌باشد. اما در هیچ یک از خانه‌های نگهدارنده‌ی سگ، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشترک بین سگ‌ها و صاحبان آن‌ها مشاهده نشد.

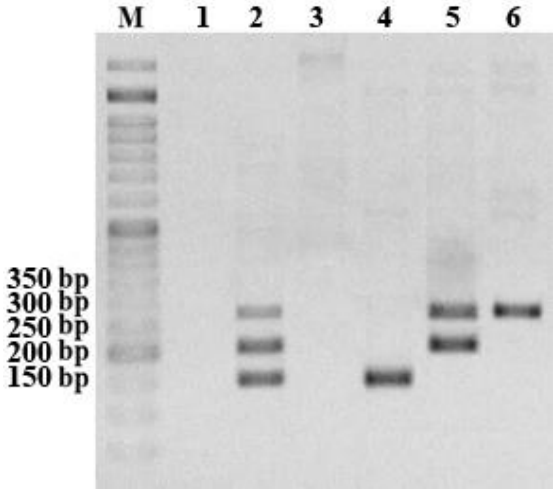

Figure 1: Agarose gel electrophoresis of PCR products to track phylogenetic sequences. M: marker (50 bp), 1: negative control, 2: positive control (EcoR62) including *chuA* (279 bp), *yjaA* (211 bp) and TspE4.C2 (152 bp), 3: Phylo-group A_0, 4: Phylo-group B1, 5: Phylo-group B2, 6: Phylo-group D.

www.SID.ir

Archive of SID

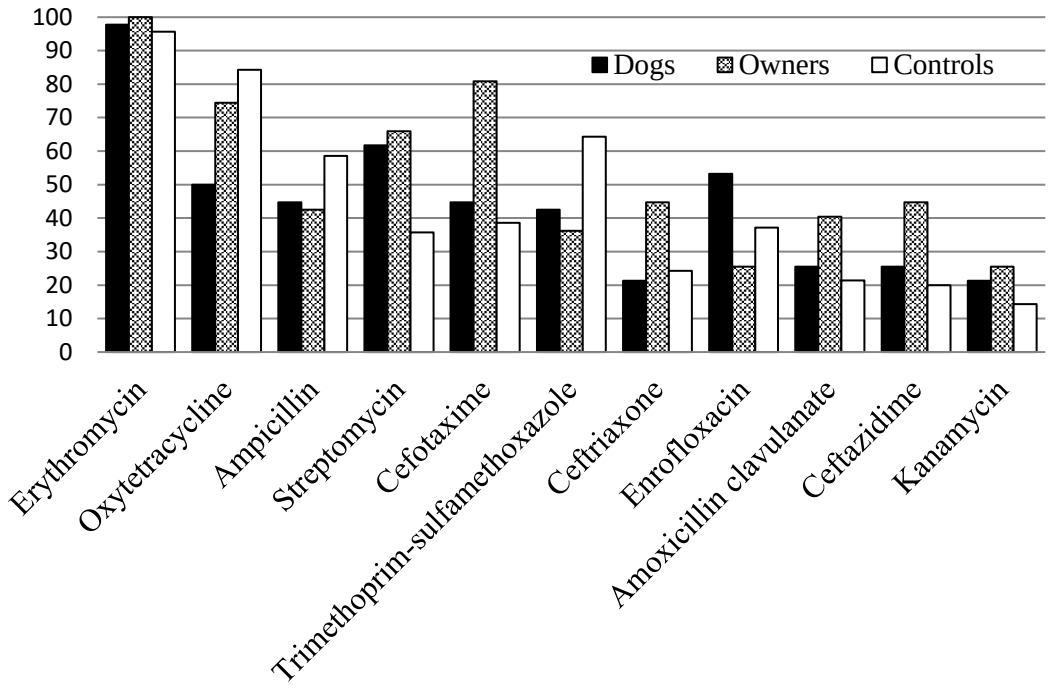

Figure 2: Prevalence rate (percentage) of each antibiotic resistance phenotype among *E. coli* isolates obtained from healthy domestic dogs, their owners and controls group compared to each other

Table 1: Prevalence rate (percentage) of each antibiotic resistance phenotype among *E. coli* isolates obtained from healthy domestic dogs, their owners and controls group

Antimicrobial agent	Dogs	Owners	Controls
Erythromycin	89.7	100	95.7
Oxytetracycline	55.1	71.4	82.8
Ampicillin	42.8	61.2	60
Streptomycin	61.2	65.3	35.7
Cefotaxime	42.8	77.5	40
Trimethoprim-sulfamethoxazole	42.8	34.6	61.4
Ceftriaxone	53	24.4	37.1
Enrofloxacin	18.3	42.8	27.1
Amoxicillin clavulanate	24.4	40.8	22.8
Ceftazidime	24.4	42.8	20
Kanamycin	34.6	30.6	15.7

بحث

میکروارگانیسم‌های به دست آمده از حیوانات خانگی به دلیل انتقال آن‌ها در نتیجه تماس مستقیم یا غیرمستقیم، می‌تواند یکی از نگرانی‌های بهداشت عمومی، به خصوص برای صاحبان‌شان باشد. بررسی زمینه‌ی فیلوژنتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* رهیافتی برای شناسایی منشأهای (ریشه‌های) تکامل این سویه‌ها می‌باشد (Girardeau et al. 2005). فیلوتایپینگ (تعیین ارتباط اجدادی) جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه نشان می‌دهد که الگوی توزیع گروه‌های فیلوژنتیکی در هر سه دسته‌ی سگ‌های سالم، صاحبانشان و افراد بدون ارتباط با حیوان خانگی یکسان بود و اختلاف معنی‌داری نداشت. گروه‌های فیلوژنتیکی A و D در هر سه دسته‌ی تحت مطالعه، فراوان‌ترین فیلوگروه‌ها بودند که این نتایج با نتایج مطالعه‌ی قبلی بر روی گربه‌های خانگی در شهرستان کرمان شباهت دارد

www.SID.ir

Archive of SID

(Akhtardanesh et al. 2016). مطالعات گذشته، گروه‌های فیلوژنتیکی A، B_1 و B_2 را به عنوان شایع‌ترین فیلوگروه‌ها به ترتیب در سگ‌های خانگی سالم، موارد عفونت‌های خارج روده‌ای و انسان سالم، عنوان می‌کنند (Damborg et al. 2009; Harada et al. 2012; Johnsonand Kuskowski 2009) که با نتایج مطالعه‌ی حاضر کمی متفاوت است. در این مطالعه هیچ رابطه‌ی معنی‌داری بین فاکتورهایی که در پرسشنامه‌ی اخذ مشخصات و تاریخچه‌ی دام وجود داشت با الگوی انتشار سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های تحت بررسی و همچنین پس‌زمینه‌ی فیلوژنتیکی سویه‌های *اشریشیاکلی* مشاهده نشد. بعضی از مطالعات بیان کرده‌اند که الگوی توزیع فیلوتیپ‌ها در بین جدایه‌های به دست آمده از سگ‌سانان ممکن است تحت تأثیر وضعیت سلامتی سگ‌ها قرار داشته باشد (Stenske et al. 2009) و لازم به ذکر است که تمام سگ‌های مطالعه‌ی حاضر در ظاهر سالم بودند. نتایج مطالعه‌ی حاضر، با یافته‌های Ghanbarpour و همکاران (۲۰۱۰) که در آن نیز A و D را شایع‌ترین گروه‌های فیلوژنتیکی در بین سگ‌های سالم اعلام کرده بودند در یک راستا می‌باشد (Ghanbarpour et al., 2010). در یک سوم از خانه‌های تحت بررسی، سویه‌ی جدا شده از سگ دارای گروه فیلوژنتیکی یکسان با صاحبش بود که با مطالعه‌ی Harada و همکاران (۲۰۱۲) و Carvalho و همکاران (۲۰۱۶) قابل مقایسه می‌باشد (Harada et al. 2008; Carvalho et al. 2016)، به گونه‌ای که این یافته‌ها می‌تواند انتقال *اشریشیاکلی* بین سگ‌ها و صاحبان‌شان را به عنوان یک فرضیه مطرح کند. به‌طور کلی تفاوت در الگوی توزیع فراوانی فیلوتیپ‌ها ممکن است تحت تأثیر فاکتورهای گوناگونی از قبیل موقعیت‌های جغرافیایی، شرایط اقلیمی، فاکتورهای رژیمی، تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها و خصوصیات ژنتیکی میزبان قرار داشته باشند (Duriez et al. 2001).

در این مطالعه اکثر جدایه‌های *اشریشیاکلی*، دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند که نشان‌دهنده‌ی اهمیت هر سه گروه سگ‌های خانگی سالم، صاحبان‌شان و انسان‌های بدون حیوان خانگی به عنوان منبعی از این سویه‌های مقاوم برای محیط اطراف‌شان می‌باشد. هیچ تفاوت مشخصی در شیوع مقاومت ضد میکروبی در بین آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مورد مطالعه به جز اریترومایسین دیده نشد؛ در گروه سگ‌های خانگی سالم، مقاومت ضد میکروبی به وفور در برابر اریترومایسین، انروفلوکساسین و اکسی‌تتراسایکلین مشاهده گردید. همچنین بیش‌ترین فراوانی مقاومت که در گروه صاحبان ثبت شد، مربوط به چهار آنتی‌بیوتیک اریترومایسین، سفوتاکسیم، اکسی‌تتراسایکلین و استرپتومایسین بود. در گروه کنترل نیز مقاومت علیه اریترومایسین، اکسی‌تتراسایکلین، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول و آمپی‌سیلین به شکل قابل توجهی شایع و فراوان بود که این نتایج تقریباً با برخی از تحقیقات انجام شده در سگ‌ها و انسان به طور جداگانه مشابه می‌باشد (Harada et al. 2011; Unno et al. 2009). شباهت‌هایی بین مطالعه‌ی حاضر و یافته‌هایی در ایالات متحده در زمینه‌ی مقاومت ضد میکروبی در برابر استرپتومایسین و آمپی-سیلین در میان سگ‌ها و صاحبان شان وجود دارد (Skurnik et al. 2005) ولی نتایج ما درباره‌ی مقاومت نسبت به کانامایسین، اکسی‌تتراسایکلین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول و انروفلوکساسین با مشاهدات انجام شده در ژاپن در میان سگ‌ها و صاحبان آن‌ها متفاوت هستند (Harada et al. 2012).

جدایه‌های *اشریشیاکلی* به دست آمده از صاحبان سگ‌ها در مقایسه با جدایه‌های به دست آمده از افراد فاقد حیوان خانگی، نشان‌دهنده‌ی فراوانی بسیار بالاتری از مقاومت ضدمیکروبی در برابر کانامایسین، استرپتوماسین، سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و آموکسی‌سیلین-کلاولانیک اسید می‌باشد. لذا انتشار مقاومت ضد میکروبی در بین جدایه‌های گروه صاحبان ممکن است تحت تأثیر جدایه‌های سگ‌های خانگی آن‌ها باشد که البته این مسأله نیاز به مطالعات بیش‌تری دارد. در مطالعه‌ی حاضر مقاومت در برابر اریترومایسین، استرپتومایسین، انروفلوکساسین و سفوتاکسیم به وفور در جفت نمونه‌های سگ-صاحب

www.SID.ir

Archive of SID

مشاهده شد، و یک چنین مشاهده‌ای را Stenske و همکاران (۲۰۰۹) در مورد سفالوتین، آمپی‌سیلین و استرپتومایسین گزارش نمودند (Stenske et al. 2009). از نظر الگوی توزیع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گروه‌های مختلف فیلوژنتیکی نتایج حاضر نسبتاً شبیه به داده‌هایی بودند که در مطالعه‌ی Skurnik و همکاران (۲۰۰۵) منتشر شده است؛ آن‌ها در مطالعه‌ی خود اعلام کردند که جدایه‌های متعلق به گروه فیلوژنتیکی B_2 از نظر مقاومت ضد میکروبی در مقایسه با دیگر فیلوگروه‌ها دارای فراوانی کم‌تری است (Skurnik et al. 2005).

آنتی‌بیوتیک‌ها در عرصه‌ی دامپزشکی دارای کاربردهای مختلفی می‌باشند که از این میان می‌توان به درمان عفونت ها، پیش‌گیری از بیماری‌های عفونی و حتی محرکی برای رشد اشاره کرد (Xie et al. 2018). آنتی‌بیوتیک‌ها باعث یک فشار انتخابی به نفع باکتری‌های مقاوم در دستگاه گوارش حیوانات می‌شوند، که این منجر به افزایش تعداد این سویه‌های مقاوم در مدفوع حیوانات و متعاقباً در محیط شان می‌گردد (Hutton 2018). نشان داده شده است که مقاومت ضدمیکروبی در جمعیت باکتریایی دستگاه گوارش می‌تواند در اثر فشار انتخابی ناشی از مصرف غذای حاوی باقیمانده‌ی آنتی‌بیوتیکی از قبیل گوشت مرغ و نشخوارکنندگان ایجاد شود (Xie et al. 2018). از طرفی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند در بین جمعیت‌های باکتریایی و میزبان‌های مختلف، با انتقال افقی ژن‌های کدکننده‌ی فنوتیپ مقاومت از طریق عوامل ژنتیکی متحرک گسترش یابد و نهایتاً منجر به کاهش کارآیی عوامل ضدمیکروبی در عرصه‌ی پزشکی و دامپزشکی شود (Stokes and Gillings 2011).

بر اساس آن چه ذکر شد، می‌توان گفت که سگ‌های اهلی و خانگی سالم در شهرستان کرمان منبع مهمی از سویه های *اشریشیاکلی* مقاوم چندگانه دارویی برای محیط اطراف خود به خصوص صاحبان‌شان هستند. از طرفی لازم به ذکر است که اکثر این سویه‌های مقاوم، از نظر فیلوژنتیکی جزو دسته‌ی کامنسال (همزیست) بودند، که این می‌تواند زنگ خطری برای توجه بیش‌تر به اهمیت بهداشتی و اپیدمیولوژیکی سویه‌های غیربیماری‌زا در انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین میزبانان مختلف باشد. بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیاکلی* در حیوانات خانگی می‌تواند به طراحی و پیاده‌سازی استراتژی‌های پیش‌گیرانه، کنترل عفونت‌ها و کاهش انتشار باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها کمک شایانی کند. بنابراین به شدت توصیه می‌شود که تجویزهای غیرضروری یا غیرمعمول آنتی‌بیوتیکی در سگ‌ها به عنوان یک حیوان خانگی، تا جای امکان توسط دامپزشکان و صاحبان حیوانات خانگی کاهش یابد و محدود گردد.

تشکر و قدردانی

در پایان از حمایت‌های آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان و مرکز تحقیقات بیماری‌های گرمسیری و عفونی دانشگاه علوم پزشکی کرمان صمیمانه قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

این پژوهش با هزینه‌های شخصی انجام پذیرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Akhtardanesh, B., Ghanbarpour, R., Ganjalikhani, S., & Gazanfari, P. (2016). Determination of antibiotic resistance genes in relation to phylogenetic background in Escherichia coli isolates from fecal samples of healthy pet cats in Kerman city. *Veterinary Research Forum*, *7*(4), 301-308.

Alizade, H. (2018). Escherichia coli in Iran: An overview of antibiotic resistance: A review article. *Iranian Journal of Public Health*, *47*(1), 1-12.

Alizade, H., Jajarmi, M., Aflatoonian, M. R., Kalantar-Neyestanaki, D., Shoja, S., & Ghanbarpour, R. (2018). Comparative prevalence of $bla_{ctx\text{-}m\text{-}15}$ gene with virulence genes and serotypes in Klebsiella pneumoniae. *Jundishapur Journal of Microbiology, 11*(4), e61285.

Amiri, M., Jajarmi, M., & Ghanbarpour, R. (2017). Prevalence of resistance to quinolone and fluoroquinolone antibiotics and screening of qnr genes among Escherichia coli isolates from urinary tract infection. *International Journal of Enteric Pathogen*, *5* (4), 100-105.

Carvalho, A. C., Barbosa, A. V., Arais, L. R., Ribeiro, P. F., Carneiro, V. C., & Cerqueira, A. M. F. (2016). Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of Escherichia coli from dogs and owners. *Brazilian Journal of Microbiology, 47* (1), 150-158.

Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of theEscherichia coli phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology, 66* (10), 4555-4558.

Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The C lermont E scherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental microbiology reports*, 5 (1), 58-65.

CLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (28^{th} ed). Clinical and Laboratory Standards Institute supplement M100S. Wayne, PA, US. Pp:52-59.

Damborg, P., Nielsen, S. S., & Guardabassi, L. (2009). Escherichia coli shedding patterns in humans and dogs: insights into within-household transmission of phylotypes associated with urinary tract infections. *Epidemiology & Infection, 137* (10), 1457-1464.

Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventre, A., Elion, J. et. al. (2001). Commensal Escherichia coli isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology, 147*(6), 1671-1676.

Escobar-Páramo, P., Grenet, K., Le Menac'h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C. et al. (2004). Large-scale population structure of human commensal Escherichia coli isolates. *Applied and Environmental Microbiology 70* (9), 5698-5700.

Gasparrini, A. J., Crofts, T. S., Gibson, M. K., Tarr, P. I., Warner, B. B., & Dantas, G. (2016). Antibiotic perturbation of the preterm infant gut microbiome and resistome. *Gut Microbes*, *7*(5), 443-449.

Ghanbarpour, R., Akhtardanesh, B., Afsahi, E., & Sookhtanloo, S. (2010). Molecular characterization of Escherichia coli pathotypes from diarrheic and healthy dogs. *Online Journal of Veterinary Research*, *14*(2), 316-324.

Girardeau, J. P., Dalmasso, A., Bertin, Y., Ducrot, C., Bord, S., Livrelli, V., Vernozy-Rozand, C., & Martin, C. (2005). Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(12), 6098-6107.

Harada, K., Morimoto, E., Kataoka, Y., & Takahashi, T. (2011). Clonal spread of antimicrobial-resistant Escherichia coli isolates among pups in two kennels. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *53*(1), 1-7.

Harada, K., Niina, A., Nakai, Y., Kataoka, Y., & Takahashi, T. (2012). Prevalence of antimicrobial resistance in relation to virulence genes and phylogenetic origins among urogenital Escherichia coli isolates from dogs and cats in Japan. *American Journal of Veterinary Research*, *73*(3), 409-417.

Harada, K., Okada, E., Shimizu, T., Kataoka, Y., Sawada, T., & Takahashi, T. (2012). Antimicrobial resistance, virulence profiles, and phylogenetic groups of fecal Escherichia coli isolates: A comparative analysis between dogs and their owners in Japan. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *35*(2), 139-144.

Hutton, R. (2018). Antibiotic resistance in small animal veterinary practice: veterinary nurses as antibiotic guardians. *The Veterinary Nurse*, *9* (1), 4-10.

www.SID.ir

Archive of SID

Jang, J., Hur, H.G., Sadowsky, M.J., Byappanahalli, M.N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *Journal of Aplied Microbiology*, *123*(3), 570-581.

Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Owens, K., Clabots, C., & Singer, R. S. (2009). Virulence genotypes and phylogenetic background of fluoroquinolone-resistant and susceptible Escherichia coli urine isolates from dogs with urinary tract infection. *Veterinary Microbiology*, *136* (1-2), 108-114.

Jorgensen, J. H., & Turnidge, J. D. (2015). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. Manual of clinical microbiology (11th Edition). American Society for Microbiology (ASM). Washington, US. Pp:1253-1273.

Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A. & Maguire, D. (2013). Clinical veterinary microbiology (2nd Edition). Elsevier Health Sciences. Pp: 239-274.

Skurnik, D., Le Menac'h, A., Zurakowski, D., Mazel, D., Courvalin, P., Denamur, E., et al. (2005). Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of Escherichia coli isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49* (7), 3062-3065.

Sperandio, V. & Hovde, C. J. (2015). Enterohemorrhagic Escherichia coli and other Shiga toxin-producing E. coli (1st ed). American Society for Microbiology (ASM). Washington, US. Pp:552-559.

Stenske, K. A., Bemis, D. A., Gillespie, B. E., D'Souza, D. H., Oliver, S. P., Draughon, F. A., et al. (2009). Comparison of clonal relatedness and antimicrobial susceptibility of fecal Escherichia coli from healthy dogs and their owners. *American Journal of Veterinary Research*, *70*(9), 1108-1116.

Stokes, H. W., & Gillings, M. R. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*(5), 790-819.

Tenaillon, O.; Skurnik, D.; Picard, B. & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal Escherichia coli. *Nature reviews microbiology*, *8*(3), 207-217.

Unno, T., Han, D., Jang, J., Widmer, K., Ko, G., Sadowsky, M. J., & Hur, H. G. (2009). Genotypic and phenotypic trends in antibiotic resistant pathogenic Escherichia coli isolated from humans and farm animals in South Korea. *Microbes and Environments*, *26*(3), 198-204.

Wayne, A., McCarthy, R., & Lindenmayer, J. (2011). Therapeutic antibiotic use patterns in dogs: observations from a veterinary teaching hospital. *Journal of Small Animal Practice*, *52*(6), 310-318.

Xie, W.Y., Shen, Q., & Zhao, F. J. (2018). Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. *European Journal of Soil Science*, *69*(1), 181-195.

Zogg, A. L., Zurfluh, K., Schmitt, S., Nüesch-Inderbinen, M., & Stephan, R. (2018). Antimicrobial resistance, multilocus sequence types and virulence profiles of ESBL producing and non-ESBL producing uropathogenic Escherichia coli isolated from cats and dogs in Switzerland. *Veterinary Microbiology*, *216*, 79-84.

www.SID.ir

Archive of SID

Vol. 16, No. 4, Winter, 2021 **Original Article**

DOI: 10.22055/ivj.2019.195428.2169

Study of phylogenetic background and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates obtained from healthy household dogs and their owners in Kerman city

Asma Askari[1], Reza Ghanbarpour[2*], Mohammad Reza Aflatoonian[3], Baharak Akhtardanesh[4], Hamid Sharifi[5] and Maziar Jajarmi[6]

[1] Researcher, Research Center of Tropical and Infectious Diseases, Kerman University of Medical Sciences and PhD Graduated in Bacteriology, Department of Pathobiology, Faulty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

[2] Professor, Molecular Microbiology Research Group, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

[3] Assistant Professor, Research Center of Tropical and Infectious Diseases, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

[4] Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

[5] Professor, HIV/STI Surveillance Research Center, and WHO Collaborating Center for HIV Surveillance, Institute for Futures Studies in Health and Professor, Department of Biostatistics and Epidemiology, Faculty of Public Health, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

[6] Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faulty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Received: 27.07.2019 Accepted: 09.10.2019

Abstract

The dogs' relationship with their owners has made them one of the most popular pets. They can be a reservoir of many microbial pathogens, so they are important for public health. This study was performed to determine the phylogenetic backgrounds and antimicrobial resistance of E. coli isolates from healthy household dogs and their owners in Kerman province, Iran. Samples were taken regardless of antibiotic usage in the dogs. Based on the history of the animals, 90% of them had not used antibiotics during the few months before the study. 168 E. coli strains belonging to feces of healthy household dogs (n=49), their owners (n=49) and the people without a pet (n=70) were studied; phylogenetic sequences including chuA, yjaA and TspE4.C2 were screened by conventional polymerase chain reaction (PCR). The isolates were investigated phenotypically for antimicrobial resistance against 11 commonly used antibiotics in dogs which were erythromycin, streptomycin, enrofloxacin, oxytetracycline, cefotaxime, ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, amoxicillin-clavulanic acid, ceftazidime, ceftriaxone and kanamycin. E. coli isolates were classified into A, D, B1 and B2 phylogroups with the prevalence of 55.9%, 30.3%, 7.1% and 5.3%, respectively. Considerably, antimicrobial resistance to erythromycin and oxytetracycline were predominant while the lowest frequency of antibiotic resistance was detected against ceftriaxone, ceftazidime, amoxicillin-clavulanic acid and kanamycin. This study was performed on apparently healthy dogs so it could determine their carrier role for antibiotic-resistant E. coli strains. This research revealed that healthy household dogs should be considered as the significant reservoir of resistant E. coli isolates especially to erythromycin, oxytetracycline, streptomycin, enrofloxacin, cefotaxime and ampicillin which these resistant strains were mostly belonging to A and D phylogenetic groups.

Key words: *Escherichia coli*, Dog, Owners, Antimicrobial resistance, Phylogenetic

* **Corresponding Author**: Reza Ghanbarpour, Professor, Molecular Microbiology Research Group, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, E-mail: ghanbar@uk.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

www.SID.ir