DOI: 10.22055/ivj.2023.398000.2584

تعیین گروه‌های فیلوژنتیک، شناسایی فنوتیپی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و تعیین پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *اشریشیا کلی* در سگ‌های اسهالی و غیراسهالی

فریال طعیمه‌پور[۱]، بهمن مصلی‌نژاد[۲*]، داریوش غریبی[۳]، محمد خسروی[۴] و مهدی پورمهدی‌بروجنی[۵]

[۱] دانش آموخته دکترای تخصصی بیماری‌های داخلی دام‌های کوچک، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۲] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۳] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۴] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۵] استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۱۶

چکیده

باکتری *اشریشیا کلی*، یکی از اعضای مهم خانواده انتروباکتریاسه است که می‌تواند موجب بیماری در انسان و طیف وسیعی از حیوانات از جمله سگ و گربه شود. هدف از انجام مطالعه حاضر، تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی، شناسایی فنوتیپی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) در جدایه‌های *اشریشیا کلی* حاصل از سگ‌های اسهالی و غیراسهالی و تعیین پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های ESBL مثبت بود. کشت نمونه‌های مدفوع در محیط‌های انتخابی و تأیید جدایه‌های حاصل با انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی تکمیلی حاصل شد. تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی در جدایه‌ها، به روش کلرمونت با استفاده از پرایمرهای *ChuA*، *YjaA*، *TspE4.c2* و *arpA* و شناسایی فنوتیپی ESBL به روش دیسک ترکیبی و مطابق با پروتوکل CLSI صورت گرفت. از ۱۵۰ نمونه مدفوع، در مجموع ۱۸۲ جدایه *اشریشیا کلی* به دست آمد. از این تعداد، ۱۰۰ جدایه، جهت تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی و شناسایی فنوتیپی *اشریشیا کلی* تولید کننده ESBL انتخاب شدند. آنالیزهای فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه‌های *اشریشیا* کلی از سگ‌ها، متعلق به گروه‌های فیلوژنی A، B_1، B_2، D و F و به ترتیب با میزان شیوع ۳۹، ۴۲، ۴، ۹ و ۶ درصد بودند. همچنین فراوانی گروه‌های فیلوژنی در سگ‌های اسهالی در گروه A (۴۲/۳ درصد)، B_1 (۳۸/۵ درصد)، D (۹/۶ درصد)، F (۵/۸ درصد) و B_2 (۳/۹ درصد) به دست آمد. به علاوه در سگ‌های سالم نیز فراوانی گروه‌های فیلوژنی در گروه B_1 (۴۳/۰۷ درصد)، A (۳۹/۲۶ درصد)، D (۷/۷ درصد)، F (۶/۲ درصد) و B_2 (۳/۹۶ درصد) بودند. از ۱۰۰ جدایه‌ی *اشریشیا کلی*، ۳۱ جدایه (۳۱ درصد) از لحاظ فنوتیپی، تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز ESBLs بودند. دوازده جدایه (۳۸/۷ درصد) مربوط به نمونه‌های اسهالی و ۱۹ جدایه (۶۱/۳ درصد) مربوط به سگ‌های سالم بودند. شیوع بالای جدایه‌های *اشریشیا کلی* تولید کننده آنزیم‌های ESBLs در منطقه اهواز، افزایش احتمال خطر گسترش و انتقال سویه‌های تولیدکننده ESBLs در جمعیت حیوانات خانگی و انتقال آن به جمعیت انسانی را به دنبال دارد.

کلمات کلیدی: *اشریشیا کلی*، گروه فیلوژنتیک، بتا لاکتاماز، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سگ، اسهال

مقدمه

تماس نزدیک بین انسان و حیوانات خانگی، همواره می‌تواند صاحبان آن‌ها را در معرض عوامل مختلف بیماری‌زا قرار دهد. باکتری *اشریشیا کلی*، یکی از اعضای مهم خانواده انتروباکتریاسه، جزئی از فلور طبیعی دستگاه

* نویسنده مسئول: بهمن مصلی‌نژاد، استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
E-mail: bmosallanejad@scu.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-Non Commercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

گوارش است که می‌تواند موجب بیماری در انسان و طیف وسیعی از حیوانات خون‌گرم و خونسرد، از جمله سگ و گربه شود (Moxley et al, 2022; Mohseni et al, 2023). سگ‌ها و گربه‌ها همواره به عنوان یکی از مخازن احتمالی سویه‌های *اشریشیا کلی* می‌توانند مطرح باشند؛ که ممکن است موجب عفونت‌های روده‌ای و یا خارج روده‌ای در انسان گردد؛ لذا جنبه‌های زئونوتیک بیماری بسیار حائز اهمیت است. این باکتری در طی چند ساعت بعد از تولد حیوان، در دستگاه گوارش توله‌ها کلونیزه می‌شود. سویه‌های *اشریشیا کلی* با منشاء اسهال[1] (DEC) بر اساس فاکتورهای حدت، پاتوژنز و علائم بالینی یا نشانه‌های موجود به ۶ دسته تقسیم‌بندی می‌شوند:

۱- *اشریشیا کلی* انتروپاتوژنیک (EPEC[2])، ۲- *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک (ETEC[3])، ۳- *اشریشیا کلی* مولد توکسین شیگا (STEC[4])، ۴- *اشریشیا کلی* انترواینویزیو (EIEC[5])، ۵- *اشریشیا کلی* انترواگرگیتیو (EAEC[6]) و ۶- *اشریشیا کلی* چسبنده منتشر (DAEC[7]) (Puno-Sarmiento et al, 2013). برخی از سویه‌های این باکتری، موجب بیماری‌زایی در سگ، گربه، خوک، گوساله، بره و اسب می‌شود. عفونت ناشی از این باکتری، موجب گاستروانتریت حاد[8] می‌گردد. شدت بیماری از محدوده خفیف در بالغین، تا بیماری کشنده در سگ‌های جوان متغیر است. چندین سندرم بالینی در سگ‌ها گزارش شده است از جمله: اسهال متعاقب مسافرت، کولیت هموراژیک و سندرم اورمیک- همولیتیک، اسهال مقاوم و اسهال آبکی در توله‌ها. اسهال انتروتوکسیژنیک توسط سویه‌های *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک ایجاد می‌شود که باعث ایجاد چسبندگی به گلیکوپروتئین‌ها در سطح سلول‌های اپی‌تلیال ژژنوم و ایلئوم می‌شوند. این انتروتوکسین‌ها که بر سلول اپی‌تلیال تأثیر می‌گذارد، منجر به ترشح مایع و اسهال می‌گردد (Bryan et al, 2013; Moxley, 2022). آنالیزهای فیلوژنتیکی نشان داده‌اند که سویه‌های این باکتری می‌تواند به یکی از ۷ گروه فیلوژنتیک شامل A، B_1، B_2، C، D، E و F تقسیم‌بندی شوند که این سویه‌ها در خصوصیات اکولوژی، ویژگی‌های فنوتیپی، توانایی مصرف قندهای مختلف، سرعت رشد، بیماری‌زایی و مقاومت به آنتی بیوتیک‌های خاص متفاوت هستند (Johnson et al, 2003; Bert et al, 2008; Saeed et al, 2009; Carvalho et al, 2021).

سویه‌های بیماری‌زای *اشریشیا کلی* خارج روده‌ای، عمدتاً در گروه‌های B2 و D و سویه‌های بیماری‌زای روده‌ای بیش‌تر در گروه‌های A، B_1 و E قرار دارند. شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی باکتری، این اجازه را فراهم می‌کند که سویه‌های بیماری‌زای آن مشخص گردد (Clermont et al, 2000). افزایش سویه‌های اشریشیا کلی تولیدکننده ESBL غیر پاتوژنیک (کومنسال) و پاتوژنیک از منابع مختلفی مانند انسان، غذا و حیوان منشأ می‌گیرد و انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی میان سایر اعضای انتروباکتریاسه، یک مشکل جهانی در کنترل و درمان عفونت‌ها در انسان و حیوانات می‌باشد (Mesa et al, 2006; Coque et al, 2008; Pitout and Laupland, 2008).

اگرچه درمان بسیاری از عفونت‌های باکتریایی با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها امکان‌پذیر است؛ ولی برخی از آنتی‌بیوتیک‌های به کار برده شده در پزشکی و دامپزشکی، متعلق به خانواده‌های مشابه هستند و فشار انتخابی موجود در محیط ممکن است در گسترش ژن‌های مقاومت، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مشابه نقش داشته باشد. داروهای خانواده بتالاکتام از جمله سفالوسپورین‌های نسل سوم به عنوان داروی انتخابی در درمان بسیاری از عفونت‌های ناشی از

1- Diarrheagenic E. coli
2- Enteropathogenic E. coli
3- Enterotoxigenic E. coli
4- Shiga toxin producing E. coli
5- Enteroinvasive E. coli
6- Entreroaggregative E. coli
7- Disseminated Adhesive E.coli
8- Acute Gastroenteritis

سویه‌های مولد اسهال *اشریشیا کلی* (DEC) مورد استفاده قرار می‌گیرند. تولید گسترده آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط باکتری‌ها، می‌تواند از طریق شکستن حلقه بتالاکتام، منجر به مقاومت نسبت به این گروه از عوامل ضد میکروبی گردد. تشخیص بتالاکتامازهای با طیف گسترده و نظارت بر مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در *اشریشیا کلی* به عنوان باکتری شاخص، ابزار مهمی برای جلوگیری از اشاعه مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی است (De Jong et al, 2009). به علت اهمیت و گستردگی سویه‌های *اشریشیا کلی* بیماری‌زا و نیز تولیدکننده ESBL در حیوانات و مطالعات اندک در این زمینه به خصوص در حیوانات خانگی، هدف از انجام مطالعه حاضر، تعیین گروه‌های فیلوژنتیک، شناسایی فنوتیپی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و تعیین پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *اشریشیا کلی* در سگ‌های اسهالی و غیراسهالی شهرستان اهواز بود.

مواد و روش کار

جمع‌آوری جدایه‌های *اشریشیا کلی* از نمونه‌های مدفوع

در مطالعه حاضر ۱۵۰، نمونه مدفوع (۵۰ مورد از سگ-های اسهالی و ۱۰۰ نمونه غیراسهالی)، با استفاده از سواب استریل، ارجاعی به بیمارستان دامپزشکی اهواز و یا کلینیک‌های مختلف شهرستان اهواز، جمع‌آوری گردید. از ۱۵۰ سگ مورد مطالعه، ۷۶ قلاده سگ نر و ۷۴ قلاده دیگر ماده بودند سگ‌ها همچنین به دو گروه سنی تقسیم‌بندی شدند که ۴۷ قلاده زیر ۱ سال و ۱۰۳ قلاده دیگر بالای ۱ سال بودند (Table 1). به علاوه ۱۱۲ قلاده از سگ‌ها از نژاد بزرگ و ۳۸ قلاده از نژاد کوچک به صورت تصادفی انتخاب شدند. در مجموع، ۷۶ قلاده از سگ‌ها نر و ۷۴ قلاده ماده بودند.

Table 1: Characteristics of studied dogs based on age and gender in Ahvaz region

Age / Gender	≤1 year	>1 year	Total
Male	27	49	76
Female	20	54	74
Total	47	103	150

جهت جداسازی *اشریشیا کلی* از سگ‌های به ظاهر سالم و مبتلا به اسهال به روش (کشت سوآب مخاطی رکتوآنال)[1] نمونه‌های سوآب راست روده‌ای- مقعدی گرفته شده و درون لوله‌های شیشه‌ای استریل حاوی محیط انتقالی (Cary-Blair medium) و بر روی یخ جهت بررسی به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز ارجاع گردید. نمونه‌ها در کوتاه‌ترین زمان ممکن بر روی محیط مک‌کانکی آگار شرکت مرک کشور آلمان کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از اتمام انکوباسیون ۳ تا ۵ کلونی تخمیر کننده لاکتوز انتخاب شده و جدایه‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش‌های کاتالاز و اکسیداز، کشت بر روی EMB آگار، TSI، انجام آزمون‌های بیوشیمیایی معمول و تعیین فرمول IMViC تأیید شدند (Bryan et al, 2013).

تعیین گروه فیلوژنتیکی جدایه‌های *اشریشیا کلی*

پس از استخراج DNA، جدایه‌های حاصل از کشت خالص، به صورت جداگانه بر روی نوترینت آگار و به روش دستی (جوشاندن[2]) قرار گرفتند. سپس تعیین گروه فیلوژنتیکی هریک از جدایه‌ها، توسط روش کلرمونت و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن‌های *ChuA*،

1- Rectoanal Mucosal Swab Culture
2- Boiling extraction method

YjaA، *TspE4.c2* و *arpA* PCR صورت گرفت و به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط واکنشی شامل مستر میکس ۱۲/۵ میکرولیتر (آمپلیکون دانمارک)، یک میکرولیتر از غلظت ۱۰ میکرومولار هر کدام از پرایمرهای اختصاصی، DNA الگو ۴ میکرولیتر و مابقی آب مقطر بود. از سویه استاندارد EcoR64 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. PCR در دستگاه ترمال سایکلر (اپندورف، آلمان) با سیکل‌های دمایی که شامل دناتوره شدن اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل دناتوره شدن در ۹۴ درجه سانتی-گراد ۵ ثانیه، ۳۰ ثانیه در ۵۹ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک سیکل نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصولات PCR در ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی رنگ ایمن[1] (سیناژن، ایران) الکتروفورز شدند (Coque et al, 2008).

شناسایی فنوتیپی جدایه‌های *اشریشیا کلی* تولیدکننده ESBL

بر اساس پروتکول CLSI[2] جهت شناسایی جدایه‌های *اشرشیا کلی* تولیدکننده ESBLs، در مرحله اول جدایه‌ها به وسیله دیسک آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم) و روش انتشار از دیسک (the Kirby-Bauer antibiotic susceptibility test) مورد غربالگری اولیه قرار گرفت. برای انجام این کار، از هر یک از جدایه‌های خالص تأیید شده *اشرشیا کلی* به طور جداگانه، کدورتی معادل نیم مک فارلند (۱/۵×۱۰^۸ واحد تشکیل‌دهنده کلونی در هر میلی‌لیتر محیط کشت یا CFU/ml) تهیه شد. سپس با سواب استریل از هر نمونه بر روی محیط مولرهینتون آگار کشت چمنی داده شد. متعاقباً دیسک آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون به وسیله پنس استریل در وسط پلیت، قرار داده شد و پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت قرار گرفت. پس از گذشت زمان انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک اندازه‌گیری شد. جدایه‌های دارای هاله عدم رشد کوچک‌تر یا مساوی ۲۷ میلی‌متر به عنوان جدایه‌های مشکوک به تولید ESBLs انتخاب شدند (Coque et al, 2008).

ارزیابی فنوتیپی جدایه‌ها جهت تعیین تولید ESBLs با روش دیسک ترکیبی

پس از غربالگری اولیه برای تأیید وجود ESBLs در جدایه‌ها از روش دیسک ترکیبی[3] استفاده شد. هر جدایه در لوله‌های آزمایش حاوی ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی حل شد تا به کدورت نیم مک فارلند رسید. سپس مشابه روش غربالگری اولیه، بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوتاکسیم و سفوتاکسیم به همراه کلاولانیک اسید، سفتازیدیم و سفتازیدیم به همراه کلاولانیک اسید بر روی محیط‌ها قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۶-۱۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. پس از اتمام زمان انکوباسیون، هاله عدم رشد اطراف هر یک از دیسک‌ها اندازه‌گیری شد. جدایه‌های دارای افزایش بیش‌تر یا مساوی ۵ میلی‌متر در اختلاف بین قطر هاله عدم رشد دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی به همراه کلاولانیک اسید (سفوتاکسیم به همراه کلاولانیک اسید و سفتازیدیم به همراه کلاولانیک اسید) در مقایسه با دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی فاقد کلاولانیک اسید (سفوتاکسیم و سفتازیدیم) به عنوان جدایه‌های *اشرشیا کلی* تولیدکننده ESBLs تأیید شدند (Coque et al, 2008).

ارزیابی فنوتیپی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیا کلی* تولیدکننده ESBL

بعد از تعیین و شناسایی جدایه‌های *اشریشیا کلی* تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، مقاومت یا

1- safe stain

2- Clinical and Laboratory Standards Institute

3- combined disk

حساسیت هر یک از جدایه‌های تولید کننده ESBL به طور جداگانه نسبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، نئومایسین (۳۰ میکروگرم)، نیتروفورانتوئین (۳۰۰ میکروگرم)، سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم)، فورازولیدون (۱۰۰ میکروگرم)، تریمتوپریم- سولفامتوکسازول (۱/۲۵ و ۲۳/۷۵ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم) و نالیدیکسیک‌اسید (۳۰ میکروگرم) مربوط به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی (فلوروکینولون‌ها، ماکرولیدها، آمینوگلیکوزیدها، نیتروفوران‌ها، سفالوسپورین‌ها، سولفانامیدها، بتالاکتام‌ها، تتراسیکلین‌ها، کارباپنم‌ها و کینولون‌ها) با رعایت شرایط استاندارد مورد بررسی قرار گرفتند.

بدین منظور از هر یک از جدایه‌های خالص تأیید شده *اشرشیا کلی* تولیدکننده ESBLs به طور جداگانه، کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه شد. سپس با سواب استریل از هر لوله نمونه اخذ شد و بر روی محیط مولرهینتون آگار کشت چمنی داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (پادتن طب، ایران) در سطح محیط کشت مولر هینتون حاوی هر یک از جدایه‌ها قرار داده شد. پلیت‌ها سپس به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. پس از گذشت زمان انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد اطراف هر یک از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی اندازه‌گیری شده و با توجه به جداول استاندارد CLSI، حساسیت یا مقاومت هر جدایه نسبت به هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها تعیین گردید (Coque et al, 2008).

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS شماره ۲۲ استفاده شد. با توجه به توزیع نرمال داده‌ها، از آزمون مربع کای (Chi-square) استفاده گردید. سطح معنی‌دار، نیز کوچک‌تر از P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

تأیید هویت جدایه‌های *اشریشیا کلی*

جهت تأیید *اشریشیا کلی* بودن، جدایه‌ها بر اساس خصوصیات مورفولوژی و واکنش گرم و کاتالاز و اکسیداز و واکنش‌های بیوشیمیایی مورد آزمایش قرار گرفتند. شاخص شناسایی و تأیید جدایه‌های *اشریشیا کلی*، باکتری‌های میله‌ای کوتاه گرم منفی، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت، تولید کلونی‌های صورتی بر روی محیط مک‌کانکی آگار و تولید کلونی با جلای سبز فلزی بر روی محیط ائوزین متیلن بلو و خصوصیات بیوشیمیایی، شامل ایندول مثبت، MR مثبت و VP منفی، واکنش اسید- اسید در محیط TSI، سیترات و اوره‌آز منفی، تولید سولفید هیدروژن و تحرک در محیط SIM بود. بر این اساس از ۱۵۰ نمونه مدفوع سگ‌های اسهالی و غیراسهالی، تعداد ۱۸۲ جدایه *اشریشیا کلی* به دست آمد که تنها ۱۰۰ جدایه مورد بررسی قرار گرفتند (Table 2).

Table 2: Number of samples, health status and *Escherichia coli* isolates obtained from the studied dogs in Ahvaz district

The health status of the dogs	Number	Positive dogs for *Escherichia coli*	Isolates
Diarrheic	50	50	25
Non-diarrheic	100	100	75
Total	150	150	100

نتایج تعیین گروه فیلوژنتیکی جدایه‌های *اشریشیا کلی*

از ۱۸۲ جدایه *اشریشیا کلی*، تعیین گروه فیلوژنتیکی بر روی ۱۰۰ جدایه (۷۵ جدایه از سگ‌های سالم و ۲۵ جدایه از سگ‌های اسهالی) انجام شد. آنالیزهای فیلوژنیکی نشان داد که جدایه‌های *اشریشیا کلی* از مدفوع سگ‌ها متعلق به گروه‌های فیلوژنی A، B_1، B_2، D و F به ترتیب با میزان

شیوع ۳۹ درصد، ۴۲ درصد، ۴ درصد، ۹ درصد و ۶ درصد بودند. همچنین فراوانی گروه‌های فیلوژنی در سگ‌های اسهالی در گروه A (۴۲/۳ درصد)، گروه B_1 (۳۸/۵ درصد)، گروه D (۹/۶ درصد)، گروه F (۵/۸ درصد)، گروه B_2 (۳/۹ درصد) و گروه‌های E و C فاقد فراوانی بودند. به علاوه در سگ‌های سالم نیز گروه‌های فیلوژنی در گروه B_1 (۴۳/۰۷ درصد)، گروه A (۳۹/۲۶ درصد)، گروه D (۷/۷ درصد)، گروه F (۶/۲ درصد) و گروه B_2 (۳/۹۶ درصد) به دست آمد. گروه‌های C و E فاقد فراوانی بودند.

نتایج آزمون فنوتیپی جهت جدایه‌های *اشریشیا کلی* تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف

در غربالگری اولیه برای تأیید جدایه‌های *اشریشیا کلی* با دیسک سفتریاکسون نشان داد که از مجموع ۱۰۰ جدایه *اشریشیا کلی* (۲۵ مورد جداشده از سگ‌های اسهالی و ۷۵ مورد جداشده از سگ‌های به ظاهر سالم)، ۳۶ جدایه (شامل ۱۳ جدایه اسهالی و ۲۳ جدایه به ظاهر سالم) مشکوک به تولید ESBLs بودند. در ادامه، ۳۶ جدایه مشکوک به تولید ESBLs با روش دیسک ترکیبی، جهت تأیید تولید ESBLs مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج حاصل از آن نشان داد که ۳۱ جدایه (شامل ۱۲ جدایه اسهالی و ۱۹ جدایه به ظاهر سالم) توانایی تولید آنزیم‌های ESBL را داشتند. فراوانی تولید ESBL در سگ‌های اسهالی (۴۸ درصد) به طور معنی‌داری بیش‌تر از سگ‌های غیراسهالی (۲۵/۳ درصد) بود ($P<0/05$).

نتایج تعیین حساسیت و الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیا کلی* تولیدکننده ESBLs

نتایج تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های تولید کننده ESBL نشان داد که ۹۱ درصد از جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین مقاوم بودند، در حالی که مقاومت به مروپنم ۳ درصد (۱ جدایه) و به جنتامایسین ۶ درصد (۲ جدایه) بود. تعداد و درصد مقاومت و حساسیت جدایه‌ها به هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها در جداول زیر آورده شده است. الگوهای مقاومت هر یک از جدایه‌ها مشخص گردید. بیست الگوی مقاومت مشاهده شد که مقاومت چندگانه همزمان به ۴ آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول، اریترومایسین و نالیدیکسیک‌اسید، شایع‌ترین الگو بودند (Tables 3 and 4, Figure 1).

Table 3: Results of antibiotic resistance of ESBLs producing *Escherichia coli* isolates

Antibiotics	Amount of disc	Resistant		Relative sensitivity		Sensitive	
		Number	Percent	Number	Percent	Number	Percent
Ciprofloxacin	5	8	26	1	3	22	71
Erythromycin	15	28	91	2	6	1	3
Neomycin	30	3	10	2	6	26	84
Nitrofurantoin	300	3	10	1	3	27	87
Cefoxitin	30	8	26	0	0	23	74
Furazolidone	100	2	6	4	13	25	81
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25-23.75	21	68	1	3	9	29
Ampicillin	10	22	71	3	10	6	19
Gentamicin	10	2	6	0	0	29	94
Tetracycline	30	20	65	1	3	10	32
Meropenem	10	1	3	0	0	30	97
Nalidixic acid	30	15	48	3	10	13	42

Table 4: Antibiotic resistance patterns and the number of *Escherichia coli* strains producing ESBLs with similar antibiotic resistance patterns

The obtained patterns	Resistant antibiotics in every pattern	Number of strains with similar pattern
1	E	2
2	E, AM	1
3	E, TE	1
4	TE, TMP-SMX, AM	1
5	TE, TMP-SMX, E	3
6	E, AM, TE	2
7	E, TMP-SMX, AM	3
8	E, AM, GM, NA	1
9	E, FUZ, AM	1
10	E, TMP-SMX, AM, TE	2
11	E, AM, FUZ, NA	1
12	E, TMP-SMX, AM, TE, FUZ, NA	1
13	E, TMP-SMX, AM, TE, FUZ, NA, MEN	1
14	CP, TMP-SMX, E, NA	4
15	CP, TMP-SMX, N, TE, AM, NA	2
16	CP, E, N, TE, AM, NA	1
17	CP, TMP-SMX, E, FUZ, NA	1
18	TMP-SMX, AM, TE, FUZ, FM	1
19	CP, E, FUZ, TMP-SMX, T, AM, GM, NA	1
20	E, FUZ, TMP-SMX, AM, NA	1

CP: Ciprofloxacin, E: Erythromycin, N: Neomycin, NF: Nitrofurantoin, CF: Cefoxitin, FZ: Furazolidone, SMX: Sulfamethoxazole, AM: Ampicillin, GM: Gentamicin, TE: Tetracycline, MEN: Meropenem, NA: Nalidixic acid.

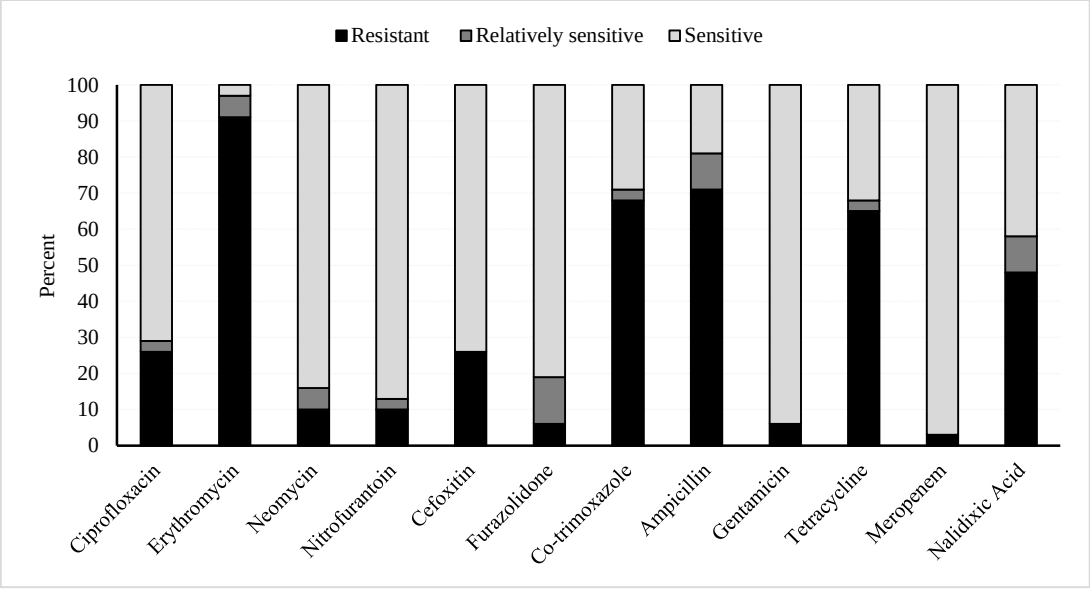

Figure 1: Prevalence rate (percentage) of each of the antibiotic resistance results of ESBLs producing *Escherichia coli* isolates

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیش‌ترین فراوانی گروه‌های فیلوژنی در سگ‌های اسهالی، در گروه A (۴۲/۳ درصد) و B_1 (۳۸/۵ درصد) و در سگ‌های غیراسهالی (سالم)، در گروه B_1 (۴۳/۰۷ درصد) و A (۳۹/۲۶ درصد)

قرار داشتند. گروه‌های فیلوژنتیکی C و E فاقد فروانی بودند. نتایج به دست آمده همچنین نشان داد که از ۱۰۰ جدایه *اشریشیا کلی*، ۳۱ جدایه از لحاظ فنوتیپی، تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز ESBLs بودند که ۱۲ جدایه مربوط به نمونه‌های اسهالی و ۱۹ جدایه مربوط به سگ‌های سالم بودند. نکته مهم دیگر این که فراوانی تولید ESBL در سگ‌های اسهالی (۴۸ درصد) به طور معنی‌داری بیش‌تر از سگ‌های غیراسهالی (۲۵/۳ درصد) بود؛ لذا خطر انتقال بیماری در سگ‌های اسهالی برای صاحبانشان و دیگر حیوانات، به مراتب بیش‌تر خواهد بود. حیوانات خانگی نظیر سگ و گربه، از نظر مخزن بودن و کلونیزاسیون باکتری‌های تولید کننده ESBL خصوصا انتروباکتریاسه و انتقال عفونت به انسان مظنون می‌باشند (Puno-Sarmiento et al, 2013).

در مطالعه Askari و همکاران در سال ۲۰۲۱ در کرمان که بر روی ۱۶۸ سویه *اشریشیا کلای* متعلق به سگ‌های خانگی سالم (۴۹ قلاده)، صاحبان آن‌ها (۴۹ نفر) و افراد فاقد حیوان خانگی (۷۰ نفر) انجام شد، نتایج نشان داد که جدایه‌های *اشریشیا کلای* 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 بودند که با نتایج مطالعات حاضر هم‌خوانی داشت. در تحقیق Akhtardanesh و همکاران در سال ۲۰۱۶، بر روی نمونه‌های مدفوع گربه‌های خانگی در شهرستان کرمان، ۹۰ جدایه *اشریشیا کلی* مورد تأیید قرار گرفت. فیلوتایپینگ نشان داد که جدایه‌ها در گروه‌های فیلوژنتیکی A (۶۶/۷ درصد)، B_1 (۱/۲ درصد)، B_2 (۱۳/۴ درصد) و D (۱۸/۹ درصد) قرار داشتند. بیش‌ترین و کم‌ترین جدایه‌های مقاوم به ترتیب در مقابل تتراسیکلین (۸۲/۳ درصد) و جنتامایسین (۱/۲ درصد) ثبت گردیدند. هم راستا با نتایج حاضر، در بررسی دیگری که بر روی فیلوژنی *اشریشیا کلی* در سگ‌ها انجام گردید، نشان داده شد که عمده گونه‌های *اشریشیا کلی* از فیلوگروه‌های B_2، D و F و از گونه‌های غیر بیماری‌زای A و B_1 مشتق شده‌اند (Kidsley et al, 2020[a])؛ اما در مطالعه دیگری که در استرالیا انجام گرفت، نشان داده شد که جدایه‌های انتخابی در گروه سگ‌های استرالیایی به ترتیب گروه B_2، گروه B_1، گروه D/E، گروه A/C و گروه F، بیش‌ترین شیوع را به خود اختصاص دادند (Kidsley et al, 2020[b]). Derakhshandeh و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که بر اساس منشأ گونه‌های غالب در سگ‌ها، نمونه گروه-های D با شیوع ۵۰ درصد، B_2 ۳۳/۳ درصد و A ۱۶/۷ درصد بودند. تصور می‌شود که تنوع جغرافیایی، شرایط زیست محیطی، وضعیت‌های محیطی و سلامتی، نقش مهمی را در انتشار گروه‌های فیلوژنی *اشریشیا کلی* بازی می‌کنند. علاوه بر آن، شیوع گروه‌های فیلوژنی در حیوانات به حجم بدن و رژیم غذایی میزبان نیز وابسته است (Gordon and Cowling, 2003). با توجه به گسترش سویه‌های *اشریشیا کلی* تولیدکننده ESBLs در عفونت‌های انسانی و دامی و ضرورت پیش‌گیری از این عوامل بیماری-زا، شناخت سویه‌های مختلف و نیز تعیین ارتباطات ژنتیکی بین سویه‌ها، از اهمیت به سزایی برخوردار است.

یکی از شاخص‌هایی که در تحقیق حاضر مورد بحث قرار گرفت، بررسی فنوتیپی جدایه‌های *اشریشیا کلی* تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs بود که خطر کلونیزاسیون آن-ها در سگ و انتشار آن به صاحبان سگ‌ها وجود دارد. در مطالعه حاضر از ۱۰۰ جدایه‌ی *اشریشیا کلی*، ۳۱ جدایه از لحاظ فنوتیپی تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs شناسایی شدند. دوازده جدایه (۳۸/۷ درصد) مربوط به نمونه‌های اسهالی و ۱۹ جدایه (۶۱/۳ درصد) مربوط به سگ‌های سالم بودند. همسو با مطالعات حاضر؛ در تحقیق Marchetti و همکاران در سال ۲۰۲۱ که در کشور آرژانتین بر روی مدفوع ۹۵ قلاده سگ به ظاهر سالم انجام گرفت، نشان داده شد که ۱۲ جدایه *اشریشیا کلی* (۱۲/۶ درصد) از نظر فنوتیپی تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs بودند. از این ۱۲ جدایه، ۱ جدایه مربوط به سگ‌های خانگی و ۱۱ جدایه مربوط به سگ‌های ولگرد بودند.

در مطالعه Aslantas و Yilmaz که در سال ۲۰۱۷ در کشور ترکیه بر روی مدفوع ۴۲۸ قلاده سگ سالم انجام

گرفت نشان داده شد که ۷۲ جدایه *اشریشیا کلی* (۱۶/۸ درصد) از لحاظ فنوتیپی تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs بودند. به علاوه در مطالعه Formenti و همکاران در سال ۲۰۲۱ که بر روی مدفوع ۲۶۶ قلاده سگ سالم صورت پذیرفت، ۶۹ جدایه *اشریشیا کلی* (۲۵/۹ درصد) از نظر فنوتیپی تولید کننده آنزیم‌های ESBLs بودند. در مطالعه Li و همکاران در سال ۲۰۲۰ که در کشور تایوان بر روی ۲۸۳ قلاده سگ و گربه انجام گرفت، ۶۵ جدایه *اشریشیا کلی* از نظر فنوتیپی تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs بودند. از ۲۲۴ نمونه سگ، ۵۴ جدایه از نظر فنوتیپی تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs بودند. در مطالعه Carvalho و همکاران که در سال ۲۰۱۶ در کشور برزیل بر روی ۱۳۴ قلاده سگ و صاحبانشان (۱۳۴ نفر) صورت پذیرفت، ۴۲ جدایه *اشریشیا کلی* مقاوم به جنتامایسین و سفالوتین از سگ‌ها و ۴۲ جدایه نیز از صاحبانشان شناسایی شدند که از این ۴۲ جدایه *اشریشیا کلی* مربوط به سگ‌ها، ۱۲ جدایه (۲۸/۵ درصد) از نظر فنوتیپی تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs بودند و از ۴۲ جدایه مربوط به صاحبان سگ، نیز ۸ جدایه (۱۹ درصد) تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs بودند. تعداد دیگری از مطالعات نشان داده‌اند عفونت‌هایی که توسط باکتری‌های تولید کننده ESBL ایجاد می‌شوند منجر به افزایش هزینه-های درمانی و شیوع مرگ و میر می‌شود. به علاوه مقاومت به دیگر کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی در *اشریشیا کلی* تولیدکننده ESBL بیش‌تر از جدایه‌های غیرتولید کننده ESBL بود (Gniadkowski, 2001; Rupp and Fey, 2003).

در مطالعه حاضر، در میان ۱۰۰ جدایه *اشریشیا کلی* به دست آمده از سگ‌ها، ۳۱ جدایه از لحاظ فنوتیپی، تولید کننده آنزیم‌های ESBLs بودند. همسو با مطالعه حاضر، تحقیق Liu و همکاران در سال ۲۰۱۶ که در کشور چین بر روی ۱۶۵ جدایه خارج روده‌ای *اشریشیا کلی* از ادرار، زخم، دستگاه تناسلی، کیسه مقعدی، ساختار بینی و نمونه‌های بافت نرم سگ‌های مبتلا به عفونت طبیعی انجام شده بودند، نتایج نشان داد که ۴۰ جدایه *اشریشیا کلی* (۲۴/۲ درصد) از لحاظ فنوتیپی تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs بودند. در مطالعه Yu و همکاران نیز در سال ۲۰۲۰ که در کشور چین بر روی ۴۰۰ جدایه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از مرغ، سگ، خوک و گاو انجام گرفت، نشان داده شد که در مجموع، ۶۲ جدایه *اشریشیا کلی* تولید کننده آنزیم‌های ESBLs از تمام حیوانات مشخص شدند. شیوع ESBLs در نمونه‌های اسهالی ۵۵ درصد و در حیوانات سالم ۵/۶ درصد بودند. این مطالعه از نظر شیوع بیش‌تر عفونت در سگ‌های اسهالی، با مطالعه حاضر همخوانی داشت.

در یک تحقیق گذشته‌نگر در کشور کره جنوبی، بر روی ۶۲۸ قلاده سگ ولگرد، نشان داده شد که ۱۲ جدایه *اشریشیا کلی* از نظر فنوتیپی تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs بودند. اختلاف در میزان فراوانی جدایه‌های *اشریشیا کلی* ESBLs مثبت، می‌تواند به دلیل تفاوت در میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در حیوانات مورد مطالعه، منشأ جدایه‌ها (سگ‌های ولگرد، گربه، مرغ، خوک و گاو) و روش‌های مدیریتی در نگهداری حیوانات باشد (Tamang et al, 2012). شیوع بالای جدایه‌های *اشریشیا کلی* تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs در شهرستان اهواز می‌تواند احتمالا به دلیل وضعیت سلامت حیوانات مورد مطالعه (از نظر اسهالی بودن)، تجویز زیاد آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و در نتیجه افزایش میزان فشار انتخابی در بین سویه‌های حیوانی منطقه باشد که این امر می‌تواند باعث افزایش خطر گسترش و انتقال سویه‌های تولیدکننده ESBLs به جمعیت انسانی شود.

شاخص دیگری که در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت، الگوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs بود. در تحقیق حاضر حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۳۱ جدایه *اشریشیا کلی* تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs مورد بررسی قرار گرفتند که بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به اریترومایسین (۹۱ درصد) و کم‌ترین مقاومت مربوط به مروپنم (۳ درصد) بود. همسو با مطالعه حاضر، در مطالعه Yu و همکاران در سال ۲۰۲۰ در کشور چین مشخص گردید که بیش‌ترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۰۰ جدایه *اشریشیا کلی* جداشده از سگ‌ها

مربوط به آمپی‌سیلین (۷۰ درصد) و کم‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به مروپنم (۵ درصد) بود. در مطالعه Formenti و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر روی سگ، حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۶۹ جدایه *اشریشیا کلی* تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs تعیین شد که همه جدایه‌ها حداقل به یک آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به سفوتاکسیم و کم‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به ایمی‌پنم بود. مقاومت به مروپنم در یک جدایه (۱/۴ درصد) تعیین گردید که با تحقیق حاضر همسو بود.

در مطالعه دیگری که بر روی ۲۲۴ قلاده سگ انجام پذیرفت، حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۵۴ جدایه *اشریشیا کلی* تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs، اندازه‌گیری شد. بیش‌ترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آمپی‌سیلین و کم‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به ایمی‌پنم بود (Yu et al, 2020)؛ اما در مطالعه Aslantas و Yilmaz که در سال ۲۰۱۷ در کشور ترکیه بر روی ۴۲۸ قلاده سگ انجام پذیرفت، نشان داده شد که از ۹۵ جدایه *اشریشیا کلی* تولیدکننده ESBLs و pAmpC، همه جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، سفوتاکسیم، سفپودوکسیم و سفتازیدیم مقاوم بودند؛ ولی هیچ جدایه‌ای به ایمی‌پنم و آمیکاسین مقاوم نبود. این پژوهش، با مطالعه حاضر مغایرت داشت؛ از جمله دلایل احتمالی، تفاوت در تعداد نمونه‌ها، جمعیت حیوانات، منطقه مورد مطالعه و نیز روش‌های مدیریتی در نگهداری سگ‌ها می‌باشد. نتایج تحقیق Tamang و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جدایه‌های *اشریشیا کلی* تولیدکننده آنزیم‌های ESBLs مربوط به تتراسیکلین و کم‌ترین مقاومت مربوط به آمیکاسین بود. این مطالعه نیز با تحقیق حاضر مغایرت داشت.

با توجه به مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف، به نظر می‌رسد که انواع و زیرگونه‌های آنزیم ESBL/pAmpC در سویه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده در بین سگ‌ها از نظر منطقه جغرافیایی متفاوت است. دلیل متفاوت بودن الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های ESBL را می‌توان به مناطق مختلف جغرافیایی، رعایت اصول بهداشتی و حضور برخی ژن‌های مقاومتی نسبت داد (Bryan et al, 2013; Gharibi et al, 2025). در شرایطی که امکان تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *اشریشیا کلی* فراهم نباشد، توصیه می‌گردد جهت انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب، از نتایج قبلی به دست آمده در آن منطقه استفاده گردد؛ به عنوان مثال در منطقه اهواز، آنتی-بیوتیک‌های مروپنم و جنتامایسین در اولویت اول قرار می-گیرند و به هیچ وجه نبایستی اریترومایسین تجویز شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که شناخت ساختار فیلوژنی باکتری‌ها و شناسایی باکتری‌های ESBL و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری‌ها، می‌تواند به بررسی اپیدمیولوژی و درمان بیماری‌های عفونی کمک نماید. تجویز آنتی-بیوتیک‌های مروپنم و جنتامایسین، در منطقه اهواز می-بایست در اولویت اول قرار گیرند. با توجه به مطالب ذکر شده، تنوع جغرافیایی، شرایط زیست محیطی، وضعیت‌های محیطی و سلامتی در انتشار جدایه‌ها و تفاوت در فیلوژنی و حساسیت به آنتی‌بیوتیک نقش دارند. علاوه بر آن، شیوع گروه‌های فیلوژنی در حیوانات به رژیم غذایی میزبان نیز وابسته است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز، ابراز می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع مالی

هزینه پایان‌نامه مزبور، در قالب پژوهانه، از دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شده است.

منابع

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

Askari, A., Ghanbarpour, R., Aflatoonian, M. R., Akhtardanesh, B., Sharifi, H., & Jajarmi, M. (2021). Study of phylogenetic background and antibiotic resistance of *Escherichia Coli* isolates obtained from healthy household dogs and their owners in Kerman city. *Iranian Veterinary Journal*, *16*(4), 55-63.

Aslantaş, O., & Yilmaz, E. S. (2017). Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β-Lactamase (ESBL) and plasmidic AmpC β-Lactamase (PAmpC) producing *Escherichia Coli* in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, *79*(6), 1024–1030.

Bert, F., Panhard, X., Johnson, J., Lecuyer, H., Moreau, R., Le Grand, J., Johnston, B., Sinègre, M., Valla, D., & Nicolas-Chanoine, M. H. (2008). Genetic background of *Escherichia Coli* isolates from patients with spontaneous bacterial peritonitis: relationship with host factors and prognosis. *Clinical Microbiology and Infect*ion, *14*(11), 1034–1040.

Bryan, M., Finola, L., Marie, A., Ann, C., & Dores, M. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology*, Mosby Elsevier Health Sciences, London, UK.

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*, 150-158.

Carvalho, I., Carvalho, J. A., Martínez-Álvarez, S., Sadi, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Rabbi, F., Dapkevicius, M. L. N. E., Igrejas, G., & Carmen Torres. (2021). Characterization of ESBL-producing *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* isolated from clinical samples in a Northern Portuguese Hospital: predominance of CTX-M-15 and high genetic diversity. *Microorganisms*, *9*(9), 1914.

Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia Coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(10), 4555-4558.

Coque, T. M., Baquero, F., & Cantón, R. (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *European Communicable Disease Bulletin*, *13*(47), 1-11.

De Jong, A., Bywater, R., Butty, P., Deroover, E., Godinho, K., Klein, U., Marion, H., Simjee, Sh., Smets, K., & Valérie, T. (2009). A Pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *63*(4), 733-744.

Derakhshandeh, A., Firouzi, R., and Naziri, Z. (2014). Phylogenetic group determination of faecal *Escherichia Coli* and comparative analysis among different hosts. *Iranian Journal of Veterinary Research*, *15*(1), 13–17.

Formenti, N., Calò, S., Parisio, G., Guarneri, F., Birbes, L., Pitozzi, A., Scali, F., Tonni, M., Guadagno, F., & Giovannini, S. (2021). ESBL/AmpC-producing *Escherichia Coli* in wild boar: epidemiology and risk factors. *Animals*, *11*(7), 1855.

Gharibi, D., Rezatofighi, S. E., Mosallanejad, B., & Fathian, M. (2025). Presence of certain extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes in fecal strains of Escherichia coli from dogs and the antibiotic sensitivity of the isolates. *Iranian Veterinary Journal*, *21*(3), 11-21.

Gniadkowski, M. (2001). Evolution and epidemiology of extended-spectrum β-Lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clinical Microbiology and Infection*, *7*(11), 597-608.

Gordon, D. M., & Cowling, A., (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia Coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*, *149*(12), 3575-3586.

Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Owens, K., Gajewski, A., & Winokur, P. L. (2003). Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to Fluoroquinolones and/or Extended-spectrum Cephalosporins and Cephamycins among *Escherichia Coli* isolates from animals and humans. *The Journal of Infectious Diseases*, *188*(5), 759-768.

Kidsley, A. K., O'Dea, M., Saputra, S., Jordan, D., Johnson, J. R., Gordon, D. M., Turni, S. P., Djordjevic, C., Abraham, S., & Trott, D. J. (2020a). Genomic analysis of phylogenetic group B_2 Extra intestinal pathogenic *E. coli* causing infections in dogs in Australia. *Veterinary Microbiology*, *248*, 108783.

Kidsley, A. K., White, R. T., Beatson, S. A., Saputra, S., Schembri, M. A., Gordon, D., Johnson, J. R., O'Dea, M., Mollinger, J. L., & Abraham, S. (2020b). Companion animals are spillover hosts of the multidrug-resistant human extra intestinal *Escherichia Coli* pandemic clones ST131 and ST1193. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1968.

Li, Y., Liu, H., Huang, H., Deng, J., Fang, L., Luo, J., Zhang, Sh., Huang, J., Liang, W., & Zheng, J. (2020). A sensitive electrochemical strategy via multiple amplification reactions for the detection of *E. coli* O157: H7. *Biosensors and Bioelectronics*, *147*, 111752.

Liu, X., Liu, H., Li, Y., & Hao, C. (2016). High prevalence of β-Lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia Coli* from dogs in Shaanxi, China. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1843.

Marchetti, L., Buldain, D., Castillo, L. G., Buchamer, A., Trejo, M. Ch., & Mestorino, N. (2021). Pet and stray dogs as reservoirs of antimicrobial-resistant *Escherichia Coli*. *International Journal of Microbiology*, *20*, 3317-3329.

Mesa, R. J., Blanc, V., Blanch, A. R., Cortés, P., Gonzalez, J. J., Lavilla, S., Miro, E., Muniesa, M., Saco, M., & Tórtola, M. T. (2006). Extended-spectrum β-Lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*(1), 211–215.

Mohseni, P., Ghanbarpour, R., Jajarmi, M., & Bagheri, M. (2023). Antibiotic resistance phenotypes and genes of Escherichia coli isolates from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) sold in retail settings in Kerman, Iran. *Iranian Veterinary Journal*, *19*(3), 51-63.

Moxley, R. A. (2022). Enterobacteriaceae. In: McVey, D. S., Kennedy, M., Chengappa, M. M., & Wilkes, R. (Eds), *Veterinary Microbiology*. Fourth edition. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA. pp: 56-74.

Pitout, J. D. D., & Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum β-Lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, *8*(3), 159-166.

Puno-Sarmiento, J., Medeiros, L., Chiconi, C., Martins, F., Pelayo, J., Rocha, S., Blanco, J., Blanco, M., Zanutto, M., & Kobayashi, R. (2013). Detection of diarrhea genic *Escherichia Coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Veterinary Microbiology*, *166*(3-4), 676-680.

Rupp, M. E., & Fey, P. D. (2003). Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL)-Producing Enterobacteriaceae: Considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*, *63*, 353-365.

Saeed, M. A., Haque, A., Mashkoor Mohsin, A. A., Bashir, S., Tariq, A., Amna, A., Iftikhar, T., & Sarwar, Y. (2009). Relationship of drug resistance to phylogenetic groups of *E. coli* isolates from wound infections. *The Journal of Infection in Developing Countries*, *3*(9), 667-670.

Tamang, M. D., Nam, H. M., Jang, G. Ch., Kim, S. R., Chae, M. H., Jung, S. Ch., Byun, J. W., Park, Y. H., & Lim, S. K. (2012). Molecular characterization of extended-spectrum-β-Lactamase-producing and plasmid-mediated Amp C β-Lactamase-producing *Escherichia Coli* isolated from stray dogs in South Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(5), 2705-2712.

Yu, Z. N., Wang, J., Ho, H., Wang, Y. T., Huang, S. N., & Han, R. W. (2020). Prevalence and antimicrobial-resistance phenotypes and genotypes of *Escherichia Coli* isolated from raw milk samples from mastitis cases in four regions of China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *22*, 94-101.

Received: 18.05.2023
Accepted: 08.10.2023

Vol. 21, No. 4, Winter, 2026 **Original Article**
DOI: 10.22055/ivj.2023.398000.2584

Determination of phylogenetic groups, phenotypic identification of broad-spectrum beta-lactamases, and determination of antibiotic sensitivity profiles in *Escherichia coli* isolates in diarrheal and non-diarrheic dogs

Feriyal Toiemehpoor[1], Bahman Mosallanejad[2*], Darioush Gharibi[3], Mohammad Khosravi[4] and Mahdi Pourmahdi Borujeni[5]

[1] PhD Graduated in Small Animal Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[4] Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[5] Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 18.05.2023 Accepted: 08.10.2023

Abstract

Escherichia coli is an important member of the Enterobacteriaceae family, that can cause disease(s) in humans and a wide range of animals, including dogs and cats. The aim of the present study was to determine the phylogenetic groups and phenotypic identification of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* isolates obtained from diarrheal and non-diarrheic dogs and to detect the antibiotic sensitivity profile of positive ESBL isolates. The cultivation of stool samples in selected environments and confirmation of the resulting isolates were obtained by performing additional biochemical tests. Determination of the phylogenetic groups was done in the isolates by the Claremont method using primers *ChuA*, *YjaA*, *TspE4.c2*, and *arpA*; Moreover, phenotypic identification of ESBL was approved by the combined disc method and the CLSI protocol. From one hundred and fifty stool samples, 182 *Escherichia coli* isolates were obtained eventually. From this number, 100 isolates were selected to determine the phylogenetic groups and phenotypic identification of ESBL-producing *Escherichia coli*. Phylogenetic analyses showed that *Escherichia coli* isolates from dogs belonged to phylogeny groups A, B_1, B_2, D and F, with prevalence rates of 39%, 42%, 4%, 9% and 6%, respectively. Also, the frequency of phylogenetic groups in diarrheal dogs was (42.3%) in group A, (38.5%) in B1, (9.6%) in D, (5.8%) in F, and (3.9%) in B2. In addition, in healthy dogs, the phylogeny groups were in (43.07%) in group B1, (39.26%) in A, (7.7%) in D, (6.2%) in F and (3.96%) in B2. Out of 100 *Escherichia coli* isolates, 31 isolates (31%) were phenotypically beta-lactamase ESBLs producers. Twelve isolates (38.7%) were related to diarrhea samples and 19 isolates (61.3%) were related to healthy dogs. The high prevalence of *Escherichia coli* isolates producing ESBL enzymes in Ahvaz district increases the risk of spread and transmission of ESBL-producing strains in the pet population and their transmission to the human population.

Key words: *Escherichia coli*, Phylogenetic group, Beta-lactamase, Antibiotic resistance, Dog, Diarrhea

[*] **Corresponding Author**: Bahman Mosallanejad, Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: bmosallanejad@scu.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/).