مقاله کامل

دوره نوزدهم ـ شماره ۲ ـ تابستان ۱۴۰۲

DOI: 10.22055/IVJ.2021.264973.2338
DOR: 20.1001.1.17356873.1402.19.2.17.4

تعیین فراوانی آلودگی به *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سگ‌های اسهالی شهرستان اهواز

بهمن مصلی‌نژاد[۱*]، داریوش غریبی[۲]، رضا آویزه[۱] و محب نریمی‌زاده[۳]

[۱] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۲] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۳] دانش‌آموخته دکتری عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۹ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۴

چکیده

انتروکوکوس‌ها، بخشی از پاتوژن‌های فرصت‌طلب بوده که در پزشکی، بسیار حائز اهمیت می‌باشند. این باکتری‌ها می‌توانند موجب بیماری‌های مختلف در انسان و سگ‌ها شوند. هدف از انجام مطالعه حاضر، تعیین فراوانی *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم*، در سگ‌های خانگی شهرستان اهواز و بررسی فاکتورهای خطر نظیر سن، جنس، نژاد و وضعیت اسهالی بودن حیوانات بود. همچنین شیوع ژن‌های حدت شامل ژلاتیناز (*gelE*) و *ccf* و سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های به دست آمده، بررسی شدند. نمونه‌گیری از رکتوم ۱۵۰ قلاده سگ (۳۶ قلاده اسهالی و ۱۱۴ مورد غیر اسهالی) صورت گرفت. نمونه‌ها به دو روش کشت باکتریایی و PCR ارزیابی شدند. در کشت باکتریایی، ۱۲۲ جدایه مشکوک به *انتروکوکوس*، جداسازی و متعاقباً توسط PCR، ژن *SodA* اختصاصی باکتری‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم*، مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع، ۴۵ جدایه مثبت تشخیص داده شدند که از این تعداد، ۳۴ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* (۷۵/۵ درصد) و ۱۱ جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* (۲۴/۵ درصد) بودند. جهت شناسایی ژن‌های حدت (*gelE* و *ccf*)، از ۴۵ جدایه، ۳۶ مورد، از نظر وجود ژن‌های حدت، مثبت بودند. ۲۶ جدایه (۵۷/۷۷ درصد) دارای هر دو ژن حدت، ۵ جدایه (۱۱/۱۱ درصد) دارای ژن *ccf* و ۵ جدایه (۱۱/۱۱ درصد) نیز دارای ژن *gelE* بودند. در مجموع، ۹ جدایه (۲۰ درصد) نیز فاقد ژن حدت بودند. به منظور تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها، از ۱۴ آنتی‌بیوتیک استفاده گردید که تمام جدایه‌ها به آزیترومایسین، استرپتومایسین، آمپی‌سیلین و ایمی‌پنم مقاوم بودند. بعد از آن، بیشترین مقاومت مربوط به اریترومایسین و سفالکسین (۹۵/۵ درصد)، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول (۸۴/۴ درصد) و جنتامایسین (۸۰ درصد) بود. همچنین بیشترین حساسیت به ترتیب مربوط به نیتروفورانتوئین (۶۲/۲ درصد)، پنی‌سیلین G (۶۰ درصد) و انروفلوکساسین (۵۵/۵ درصد) بود. ارتباط معنی‌داری بین فاکتورهای خطر نظیر سن، جنس، نژاد و وضعیت اسهالی، با حضور باکتری *انتروکوکوس*، در سگ‌های مورد مطالعه وجود نداشت. نتایج نشان داد که درصد شیوع *انتروکوکوس*، از شیوع نسبتا قابل توجهی (۳۰ درصد) در سگ‌های منطقه اهواز برخوردار است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در دو گونه *انتروکوکوس*، قابل توجه بودند. با توجه به اهمیت بسیار بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تجویز مناسب آنتی‌بیوتیک‌ها توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: *انتروکوکوس*، *فکالیس*، *فاسیوم*، ژن حدت، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

انتروکوکوس‌ها، بخشی از میکروفلور دستگاه گوارش در انسان و حیوانات محسوب می‌شوند. این باکتری‌ها از نظر مورفولوژی، از استرپتوکوکوس‌ها قابل تفریق نیستند. انتروکوکوس‌ها قبلا در *استرپتوکوکوس* گروه D قرار

*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-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

می‌گرفتند؛ اما آنالیز ژنومی آن‌ها نشان داد که متفاوت از آن‌ها هستند. در حال حاضر، این باکتری‌ها در خانواده *انتروکوکاسه* از راسته *لاکتوباسیلالز*[1] قرار دارند، که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان *انتروکوکوس فکالیس*[2]، *انتروکوکوس فاسیوم*[3] و *انتروکوکوس هیرا*[4] را نام برد (Hammerum et al, 2012; Kajihara et al, 2015).

دلیل عمده زنده ماندن باکتری‌ها در محیط‌های بیمارستانی، مقاومت ذاتی آن‌ها به برخی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده نظیر سفالوسپورین‌ها، سولفونامیدها، غلظت‌های پایین آمینوگلیکوزیدها و داروهای بتالاکتام است. از طرف دیگر، توانایی انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، در بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص ونکومایسین و انتقال مقاومت به باکتری‌هایی نظیر *استافیلوکوکوس* و *استرپتوکوکوس*، آن‌ها را به پاتوژن‌های بیمارستانی نسبتاً مهمی تبدیل کرده است. انتروکوکوس‌های مقاوم، در بیماری‌هایی نظیر عفونت‌های مجاری ادراری، اختلالات سیستمیک نظیر باکتریمی، اندوکاردیت و نیز عفونت‌های لوکالیزه در محوطه شکمی و مجاری تنفسی گزارش شده است. یک فاکتور مستعدکننده برای عفونت‌های ثانویه ناشی از *انتروکوکوس*، ناهنجاری‌های بخش تحتانی دستگاه ادراری است. در یک مطالعه، عفونت‌های ناشی از این باکتری، در دستگاه ادراری ماده‌ها بیشتر از نرها گزارش شده است (Wood et al, 2020). در دو دهه اخیر، مقاومت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها، از جمله مقاومت به ونکومایسین، باعث پیچیدگی در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها شده است. در بین گونه‌های *انتروکوکوس*، *انتروکوکوس فاسیوم* مهم‌ترین گونه مقاوم به ونکومایسین می‌باشد که به دلیل انتشار جهانی، بیشترین اهمیت را در بیمارستان‌های انسانی دارد (Frye and Jackson, 2013).

شیوع انتروکوکوس‌های مقاوم به ونکومایسین، به طور مداوم با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی در حال افزایش است. به منظور جلوگیری از شیوع باکتری‌های مقاوم، استفاده گسترده از داروها در زمینه‌های پزشکی و دامپزشکی، می‌بایست با احتیاط باشد و نیز یک کنترل دائمی، در زمینه شیوع گونه‌های *انتروکوکوس* مقاوم به گلیکوپپتیدها ضروری است (Hammerum et al, 2012; Bunt et al, 2018). عفونت ناشی از انتروکوکوس‌ها، به عنوان مخزن اولیه باکتری، در دستگاه گوارش حیوانات خانگی گزارش شده است. نقش سگ‌ها در انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی، زیاد مورد مطالعه قرار نگرفته است؛ با این حال، تماس نزدیک آن‌ها با انسان و استفاده گسترده از عوامل ضد میکروبی، به صورت یک فاکتور خطر، جهت انتقال باکتری‌های مقاوم و مبادله ژن‌های مقاومت، در بین آن‌ها نقش دارد؛ از طرفی امروزه از انتروکوکوس‌ها در فرآورده‌های پروبیوتیکی، از جمله در جیره غذایی سگ‌ها استفاده می‌شود تا رشد باکتری‌های بیماری‌زا در دستگاه گوارش متوقف شود. همچنین سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی، موفقیت در درمان و انتخاب مناسب‌تر آنتی-بیوتیک‌ها را افزایش و احتمال بروز مقاومت دارویی را کاهش داده است (Greene and Prescott, 2012). جدیدا، عفونت همزمان *انتروکوکوس فکالیس* با ویروس آنفلوآنزا در سگ‌ها، گزارش شده است؛ که موجب افزایش شدت بیماری و عوارض بالینی قابل توجه می‌گردد. افزایش خطر عفونت‌های ثانویه باکتریایی در مبتلایان به بیماری‌های ویروسی، ممکن است در ارتباط با پاسخ آماسی به عفونت ویروسی باشد که باکتری‌ها به عنوان رسپتور به کار می‌برند. گذشته از آن، مکانیسم کلیرانس باکتری‌ها در عفونت‌های ویروسی، تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Zhou et al, 2019).

1- *Lactobacillales*
2- *Enterococcus faecalis*
3- *Enterococcus faecium*
4- *Enterococcus hirae*

روش معمول برای تشخیص *انتروکوکوس*، کشت در محیط بایل آسکولین آزید آگار[1]است. دقیق‌ترین روش تشخیصی برای انتروکوکوس‌ها، استفاده از PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز) می‌باشد. مقاومت دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، در مناطق مختلف جهان، به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه‌ها، تفاوت در مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع-الطیف و جدید، متفاوت می‌باشند (Jackson et al, 2009; Nazarian-Firouzabadi and Akrami, 2019). از آن جا که تاکنون تحقیقی بر روی انتروکوکوس‌ها، در سگ‌های خانگی منطقه اهواز صورت نگرفته بود؛ هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی حضور باکتری‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* در مدفوع سگ‌های خانگی اهواز و نیز ارزیابی فاکتورهای خطر نظیر سن، جنس، نژاد، وضعیت اسهالی بودن، سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی و نیز بررسی وجود ژن‌های حدت ژلاتیناز (*gelE*) و *ccf*، در نمونه‌های مثبت *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* بود.

مواد و روش کار

در این تحقیق، ضمن کسب اجازه از صاحب حیوان و با استفاده از سوآب استریل، نمونه‌ها از ناحیه رکتوم ۱۵۰ قلاده سگ و به صورت سوآب چرخشی گرفته شد. جهت نمونه‌گیری، از دو سوآب به شکل هم‌زمان استفاده گردید. یک سوآب برای کشت و جداسازی باکتری و نمونه دیگر به منظور استخراج DNA، استفاده گردید. سگ‌های مورد مطالعه، از بین موارد ارجاعی به بیمارستان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتخاب شدند. نمونه‌گیری، در بازه زمانی شهریور ماه تا اسفند ۱۳۹۸ صورت گرفت. تمام مشخصات سگ‌ها از قبیل سن، جنس، نژاد و وضعیت اسهالی یا غیر اسهالی بودن، ثبت گردید. حیوانات، به ۳ گروه سنی کمتر از ۱ سال (۸۲ قلاده)، بین ۱ تا ۳ سال (۴۴ تا) و بالاتر از ۳ سال (۲۴ تا) تقسیم‌بندی شدند. تعداد ۶۱ قلاده سگ نر و ۸۹ قلاده ماده بودند. نژاد سگ‌های مورد مطالعه، شامل بومی (۴۹)، مخلوط نژاد کوچک (۳۲)، ژرمن‌شفرد (۲۵)، پیت‌بول تریر (۱۴)، مخلوط نژاد بزرگ (۱۲)، پومرانین (۱۰)، سیبرین هاسکی (۵) و دوبرمن پینچر (۳) قلاده بودند. تعداد ۳۶ قلاده سگ واجد اسهال و ۱۱۴ قلاده از نظر بالینی سالم (غیر اسهالی) بودند. نمونه‌برداری تنها از سگ‌هایی صورت گرفت که در ۱ ماه اخیر، تجویز آنتی‌بیوتیک در آن‌ها صورت نگرفته بود. سپس نمونه‌های اخذ شده، جهت کشت، به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده منتقل شدند.

نمونه‌ها بر روی محیط بایل آسکولین آزید آگار، کشت داده شدند. سپس با استفاده از آنس، کشت چهار منطقه‌ای انجام گرفت. بعد از آن، از محیط‌های دارای پرگنه و مشکوک به *انتروکوکوس*، حداقل یک پرگنه با مورفولوژی-های متفاوت و با هاله سیاه رنگ، انتخاب و در محیط آگار خون‌دار کشت داده شدند. انتروکوکوس‌ها، از طریق هیدرولیز آسکولین، نقاط سیاه رنگ در محیط ایجاد کرده و دور باکتری، هاله سیاه‌رنگ ایجاد می‌شد؛ که وجه تفاوت آن‌ها با *استرپتوکوکوس* است. با انجام تست کاتالاز، اکسیداز، رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده باکتری‌ها زیر میکروسکوپ، نمونه‌های مشکوک به *انتروکوکوس*، برداشته شدند و دو نمونه یکی در میکروتیوب حاوی شیر پس‌چرخ، جهت سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی و دیگری در میکروتیوب حاوی آب مقطر برای استخراج DNA و آزمایش PCR، قرار داده شدند. سپس تا زمان انجام PCR و سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی، در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد، ذخیره شدند.

جدایه‌های مشکوک به *انتروکوکوس* که از طریق خصوصیات مورفولوژی، شناسایی شده بودند، جهت تأیید

1- Bile Esculin Azide Agar

مولکولی و بررسی وجود ژن‌های حدت با استفاده از PCR، مورد بررسی قرار گرفتند. برای انجام PCR، نیاز به DNA ژنومی بود و جهت استخراج DNA از باکتری‌های *انتروکوکوس*، از روش جوشاندن استفاده گردید. پس از خارج کردن باکتری‌های مشکوک به *انتروکوکوس*، میکروتیوب‌های حاوی باکتری و آب مقطر، بر روی شعله گاز جوشانده و در دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه در دور ۴۰۰۰ rpm قرار گرفتند. محلول رویی به دست آمده، به عنوان DNA الگو، با سمپلر برداشته شده و تا زمان انجام PCR، در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد، نگهداری شدند.

جهت تأیید مولکولی جدایه‌های مشکوک، از ژن *SodA* اختصاصی باکتری‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم*، استفاده گردید. برای تکثیر این ژن، از آغازگرهای اختصاصی آن استفاده شد (Table 1). همچنین از DNA استخراج شده از جدایه‌های مشکوک، به عنوان DNA الگو استفاده شد. تکثیر ژن *SodA*، به ترتیب قطعه ۲۱۰bp و ۳۶۰bp برای *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* را نمایان می‌کند.

Table 1. Nucleotide sequence of primer, Target gene and product size to detect *Enterococcus* genus and species (Jackson et al, 2004)

Gene	Genus and Species	Sequence	Size (bp)
SodA	*E. faecalis*	F:5'- ACTTATGTGACTAACTTAACC-3' R:5'- TAATGGTGAATCTTGGTTTGG-3'	360
SodA	*E. faecium*	F:5'- GAAAAAACAATAGAAGAATTAT-3' R:5'- TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA-3'	215
GelE		F:5'- ACC CCG TAT CAT TGG TTT-3' R:5'- ACG CAT TGC TTT TCC ATC-3'	419
Ccf		F:5'- GGG AAT TGA GTA GTG AAG AAG-3' R:5'- AGC CGC TAA AAT CGG TAA AAT-3'	543

مخلوط PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر نمونه و به صورت PCR دو گانه انجام شد تا ژن *SodA* در گونه‌های *انتروکوکوس* مثبت، شناسایی شود. مخلوط واکنش حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس ۲X ، ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر و ۴ میکرولیتر از DNA، استخراج شده بود. از DNA باکتری‌های *انتروکوکوس فکالیس* (PTCC-1778) و *انتروکوکوس فاسیوم* (ATCC-19434) به عنوان کنترل مثبت، و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

در این تحقیق، وجود ژن‌های حدت ژلاتیناز و *ccf*، در جدایه‌های تأیید شده *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* با PCR دوگانه مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور، از آغازگرهای اختصاصی PCR، استفاده گردید. ژن‌های *gelE* و *ccf*، توسط PCR در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری تکثیر یافتند. از DNA باکتری‌های *انتروکوکوس فکالیس* (PTCC-1778) و *انتروکوکوس فاسیوم* (ATCC-19434) به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

جهت ارزیابی محصولات PCR، از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده گردید. برای تهیه ژل، ۰/۴۵ گرم از پودر آگارز به ۳۰ میلی‌لیتر بافر TAE ۱X در یک ارلن اضافه شد. با شفاف شدن آگارز، stain safe به مقدار ۱ میکرولیتر به آگاروز اضافه گردید. پس از تهیه ژل آگاروز و قرار دادن در بافر TAE۱X داخل تانک الکتروفورز، ۶ میکرولیتر از محصولات PCR درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل آگارز، بارگذاری شد. جهت اطمینان از صحت طول قطعات تکثیر شده، از مارکر مولکولی استفاده گردید. جهت حرکت DNA از سمت قطب منفی به قطب مثبت می‌باشد، لذا چاهک‌های ایجاد شده در ژل، در سمت قطب منفی تانک قرار داده شدند. پس از پایان الکتروفورز، جهت مشاهده باندهای تفکیک شده، ژل در دستگاه ترانس

لومیناتور قرار داده شده و قطعات تکثیر شده DNA از نظر صحت طول قطعه با مارکر مولکولی مقایسه شدند.

جهت سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *فاسیوم*، از روش انتشار دیسک آگار و مطابق با استانداردهای مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی کلینیکی[1] استفاده شد. بدین منظور، از محیط کشت مولر هینتون آگار خون‌دار استفاده گردید. از باکتری‌هایی که داخل میکروتیوب نگهداری شده بودند، برای کشت و سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی استفاده شد. پس از ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتن و رشد باکتری‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *فاسیوم*، از آن‌ها برای آنتی‌بیوگرام استفاده گردید. از باکتری‌های رشد کرده درون محیط کشت، سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه گردید و در محیط مولر هینتون، به صورت چمنی کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی در پلیت قرار داده شده و به داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. سپس، قطر هاله عدم رشد، در اطراف هر یک از این دیسک‌ها، با خط‌کش اندازه‌گیری و با جداول استاندارد مقایسه و میزان حساسیت یا مقاومت نمونه‌ها نسبت به هر یک از این آنتی‌بیوتیک‌ها، تعیین گردید. نحوه اضافه کردن آنتی‌بیوتیک به محیط کشت، به این شکل بود که به ازاء هر ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت، اریترومایسین (۰/۰۱۵ گرم)، آمپی‌سیلین (۰/۰۱۰ گرم)، انروفلوکساسین (۰/۰۰۵ گرم)، آزیترومایسین (۰/۰۱۵ گرم)، ایمی‌پنم (۰/۰۱۰ گرم)، ونکومایسین (۰/۰۳۰ گرم)، پنی‌سیلین (۰/۰۱۰ گرم)، جنتامایسین (۰/۲ گرم)، نیتروفورانتوئین (۰/۳ گرم)، تتراسیکلین (۰/۰۳۰ گرم)، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول (۰/۰۰۲ گرم)، کلرامفنیکل (۰/۰۳ گرم)، استرپتومایسین (۰/۳۰ گرم) و سفالکسین (۰/۰۳ گرم) اضافه گردید.

جهت ارزیابی داده‌ها، از آزمون مربع کای و بر اساس شاخص‌های سن، جنس، نژاد و وضعیت دستگاه گوارش استفاده گردید. همچنین به منظور ارزیابی رابطه بین متغیرها از آزمون همبستگی Spearman استفاده شد. تمام آنالیزها به کمک نرم افزار SPSS-16 انجام گرفت و از نظر آماری P<۰/۰۵، معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در مطالعه حاضر، ۴۵ جدایه مثبت تشخیص داده شدند که از این تعداد، ۳۴ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* (۷۵/۵ درصد) و ۱۱ جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* (۲۴/۵ درصد) بودند. جهت شناسایی ژن‌های حدت (*gelE* و *ccf*)، از ۴۵ جدایه، ۳۶ مورد از نظر وجود ژن‌های حدت، مثبت بودند که ۲۶ جدایه (۵۷/۷۷ درصد) دارای هر دو ژن حدت، ۵ جدایه (۱۱/۱۱ درصد) دارای ژن *ccf* و ۵ جدایه دیگر (۱۱/۱۱ درصد) دارای ژن *gelE* بودند. تعداد ۹ جدایه (۲۰ درصد) نیز فاقد ژن حدت بودند. نتایج حاصل از این تحقیق، بر اساس شاخص‌های سن، جنس، نژاد و وضعیت دستگاه گوارش (سگ‌های اسهالی و غیر اسهالی)، مشخص شده‌اند (Tables 2-5). از ۴۵ جدایه به دست آمده از ۱۵۰ نمونه مدفوع، تعداد ۳۴ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* بودند که ۹ جدایه در نژاد بومی، ۹ مورد در مخلوط کوچک، ۷ تا در ژرمن‌شفرد، ۵ تا در پیت‌بول، ۲ تا در مخلوط بزرگ و ۲ جدایه دیگر در پومرانین بودند. از تعداد ۱۱ جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* نیز ۴ جدایه در نژاد بومی، ۲ مورد در ژرمن‌شفرد و ۱ جدایه در نژادهای پیت‌بول، سیبرین‌هاسکی، پومرانین، مخلوط بزرگ و مخلوط کوچک (به طور مجزا) شناسایی شدند. از ۱ قلاده سگ نژاد ژرمن‌شفرد و نیز ۱ قلاده سگ بومی، که هر دو کمتر از ۱ سال سن داشتند، هر دو باکتری *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* جداسازی گردید.

1- Clinical and Laboratory Standards Institute 28th edition 2018

Table 2. Frequency of virulence genes and *gelE* and *ccf* in *Enterococcus* species

Virulence genes	Number	Frequency
Gelatinase (*gelE*) and *ccf*	26	57.78
Without of virulence gene	9	20
Gelatinase	5	11.11
ccf	5	11.11
Total	45	100

Table 3. Distribution of absolute and relative frequency of *Enterococcus* species in the population of referred dogs to Veterinary Hospital of Ahvaz based on age

Frequency / Age (yeas)	Negative		Positive		Total	
	Absolute	Relative (%)	Absolute	Relative	Absolute	Relative
≤ 1	58	70.73	24	29.27	82	54.66
1-3	29	65.90	15	34.1	44	29.34
≥ 3	20	83.33	4	16.67	24	16
Total	107	-	43	-	150	100

Table 4. Distribution of absolute and relative frequency of *Enterococcus* species in the population of referred dogs to Veterinary Hospital of Ahvaz based on gender

Frequency / Gender	Negative		Positive		Total	
	Absolute	Relative (%)	Absolute	Relative	Absolute	Relative
Female	42	68.86	19	31.14	61	40.67
Male	65	73.03	24	26.97	89	59.33
Total	107	-	43	-	150	100

Table 5. Distribution of absolute and relative frequency of *Enterococcus* species in the population of referred dogs to Veterinary Hospital of Ahvaz based on gastero-intestinal status

Frequency / Age	Negative		Positive		Total	
	Absolute	Relative (%)	Absolute	Relative	Absolute	Relative
Diarrheic	77	67.55	37	32.45	114	76
Non-diarrheic	30	83.34	6	16.66	36	24
Total	107	--	43	-	150	100

نتایج حاصل از کشت

پس از کشت نمونه‌ها در محیط بایل آسکولین آزید آگار و خالص‌سازی آن‌ها بر روی آگار خون‌دار و نیز انجام تست‌های اولیه کاتالاز، اکسیداز و رنگ‌آمیزی گرم، تعداد ۱۲۲ جدایه مشکوک به *انتروکوکوس* جداسازی شد.

تأیید مولکولی و تعیین گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* با استفاده از PCR

نتایج انجام PCR، با استفاده از پرایمرهای ژن *SodA* اختصاصی باکتری‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* جهت تأیید مولکولی جدایه‌های مشکوک و تعیین گونه‌ها (Figure 1) نشان داد که از تعداد ۱۲۲ جدایه مشکوک، ۳۴ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* و ۱۱ جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* بودند.

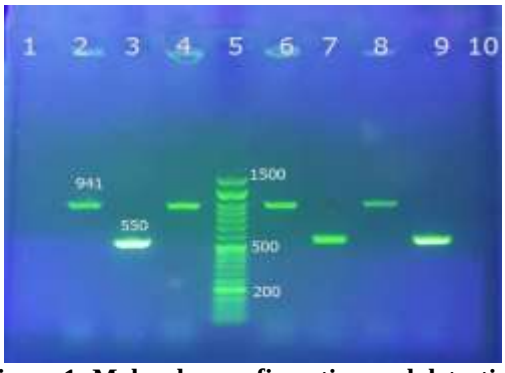

Figure 1: Molecular confirmation and detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* species by PCR. No. 1 and 10 negative control No. 3 positive control of *Enterococcus faecium*, No. 4 positive control of *Enterococcus faecalis*, No. 2, 6 and 8 approved isolated of *Enterococcus faecalis*, No. 7 and 9 approved isolated of *Enterococcus faecium*, No. 5 molecular marker 50 bp.

نتایج حاصل از PCR و تعیین ژن‌های حدت ژلاتیناز (*gelE*) و *ccf*

با استفاده از PCR، از ۴۵ جدایه تأیید شده *انتروکوکوس فکالیس* و *فاسیوم*، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های حدت ژلاتیناز و *ccf*، ۳۶ جدایه از نظر وجود ژن‌های حدت مثبت بودند. ۲۶ جدایه، هر دو ژن حدت ژلاتیناز و *ccf* را داشتند، ۵ جدایه فقط ژن *ccf* و ۵ جدایه هم فقط ژن حدت ژلاتیناز را داشتند (Figure 2).

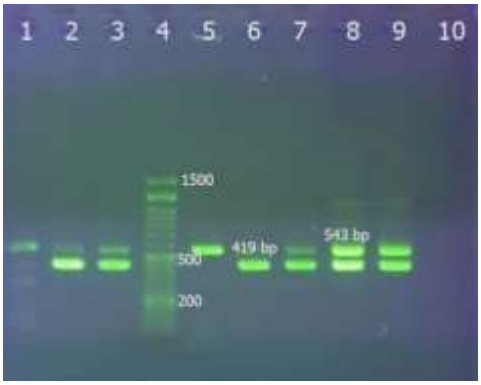

Figure 2: Identification of virulence genes of gelatinase (*gelE*) and (*ccf*) by PCR. No. 10 negative control, No. 9 positive control of genes of gelatinase (*gelE*) and (*ccf*), No. 1 and 5 isolates that have gene of *ccf*, No. 6 isolates that have gene of *gelE*, No. 2, 3, 7 and 8 isolates that have genes of gelatinase (*gelE*) and (*ccf*), No. 4 molecular marker 50 bp.

شیوع باکتری‌های *انتروکوکوس* بر اساس سن، جنس و وضعیت دستگاه گوارش

در این تحقیق، از ۱۵۰ قلاده سگ، ۸۲ قلاده کمتر از یک سال، ۴۴ مورد بین یک تا سه سال و ۲۴ تای دیگر، بیشتر از سه سال بودند. در Tables 2-4، شیوع فراوانی سگ‌های آلوده و غیرآلوده به باکتری *انتروکوکوس* بر اساس سن، جنس و وضعیت دستگاه گوارش آورده شده است. ارتباط معنی‌داری بین سن، جنس و وضعیت دستگاه گوارش و حضور باکتری *انتروکوکوس* وجود نداشت (P>۰/۰۵). در جمعیت سگ‌های مورد مطالعه، ۴۹ مورد نژاد بومی، ۳۲ مورد مخلوط کوچک، ۲۵ مورد ژرمن‌شفرد، ۱۴ مورد پیت-بول، ۱۲ مورد مخلوط بزرگ، ۱۰ مورد پومرانین، ۵ مورد سیبرین هاسکی و ۳ مورد دوبرمن پینچر بودند. ارتباط معنی‌داری نیز بین نژاد و وجود باکتری *انتروکوکوس* وجود نداشت (P>۰/۰۵).

نتایج حاصل از کشت حساسیت آنتی‌بیوتیکی (آنتی‌بیوگرام)

در میان گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس*، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی، در آزیترومایسین، ایمی‌پنم، آمپی‌سیلین و استرپتومایسین (۱۰۰)، اریترومایسین و سفالکسین (۹۴/۱)، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول (۸۸/۲)، تتراسیکلین (۸۲/۳)، جنتامایسین (۷۹/۵)، ونکومایسین (۵۵/۸)، کلرامفنیکل (۵۳)، پنی‌سیلین (۴۷)، انروفلوکساسین (۳۸/۲) و نیتروفورانتوئین (۲۰/۵) درصد بود. بیشترین حساسیت نیز مربوط به نیتروفورانتوئین (۷۰/۶)، انروفلوکساسین (۶۱/۸)، پنی‌سیلین G (۵۳)، کلرامفنیکل (۲۹/۴)، جنتامایسین (۲۰/۵)، تتراسیکلین (۱۱/۸) و ونکومایسین (۸/۹) درصد بود. هیچ‌کدام از جدایه‌ها به آزیترومایسین، ایمی‌پنم، آمپی‌سیلین و استرپتومایسین حساسیت نداشتند. همچنین در میان گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس* بیشترین حساسیت به ترتیب مربوط به ونکومایسین (۳۵/۳)، کلرامفنیکل (۱۷/۶)، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول (۱۱/۸)، نیتروفورانتوئین (۸/۹)، تتراسیکلین، اریترومایسین و سفالکسین (۵/۹) درصد بود. هیچ کدام از جدایه‌ها به آزیترومایسین، ایمی‌پنم، آمپی‌سیلین و استرپتومایسین حساسیت نسبی نداشتند. در میان گونه‌های *انتروکوکوس فاسیوم*، بیشترین مقاومت مربوط به اریترومایسین، استرپتومایسین، آمپی‌سیلین، آزیترومایسین، ایمی‌پنم و سفالکسین (۱۰۰)، جنتامایسین (۸۱/۸)، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول (۷۲/۸)، انروفلوکساسین (۶۳/۶)، نیتروفورانتوئین (۵۴/۶)، تتراسیکلین (۳۶/۴)، ونکومایسین (۲۷/۳)، پنی‌سیلین G و کلرامفنیکل (۱۸/۲) درصد بود. همچنین بیشترین حساسیت در گونه‌های *فاسیوم* مربوط به پنی‌سیلین G (۸۱/۸)، کلرامفنیکل (۷۲/۸)، ونکومایسین (۶۳/۷)، تتراسیکلین (۴۵/۴)، انروفلوکساسین و نیتروفورانتوئین (۳۶/۴)، جنتامایسین (۱۸/۲) و تری‌متوپریم

سولفامتوکسازول (۹) درصد بود. هیچ‌کدام از جدایه‌ها به اریترومایسین، استرپتومایسین، آمپی‌سیلین، آزیترومایسین، ایمی‌پنم و سفالکسین حساسیت نداشتند. بیشترین حساسیت نسبی در گونه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* مربوط به تتراسیکلین و تری‌متوپریم سولفامتوکسازول (۱۸/۲) و ونکومایسین، کلرامفنیکل و نیتروفورانتوئین (۹) درصد بود. هیچ‌کدام از جدایه‌ها به اریترومایسین، استرپتومایسین، آمپی‌سیلین، آزیترومایسین، ایمی‌پنم و سفالکسین، حساسیت نسبی نداشتند.

آنتی‌بیوگرام در جدایه‌های واجد ژن‌های حدت و شیوع ژن‌های حدت در جدایه‌های شناسایی شده

نتایج آنتی‌بیوگرام در جدایه‌های دارای ژن‌های حدت و بدون ژن حدت، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). همچنین آنتی‌بیوگرام در جدایه‌های شناسایی شده از سگ‌های اسهالی و غیر اسهالی، تفاوت قابل توجهی دیده نشد و مقاومت‌ها و حساسیت‌های آنتی‌بیوتیکی در هر دو گروه مانند هم بودند (P>۰/۰۵). همچنین، در جدایه‌های شناسایی شده از سگ‌های اسهالی و غیر اسهالی، تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها، از نظر شیوع ژن‌های حدت، مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

بحث

در مطالعه حاضر، که با استفاده از دو روش کشت و PCR، بر روی ۱۵۰ نمونه مدفوع از سگ‌های ارجاعی به بیمارستان دامپزشکی اهواز، صورت گرفت؛ تعداد ۴۵ جدایه مثبت، شناسایی شد (۳۰ درصد)؛ که از این تعداد، ۳۴ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* (۲۲/۶۶درصد) و ۱۱ جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* (۷/۳۳ درصد) بودند. مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم*، در سگ‌های خانگی شهرستان اهواز و بررسی فاکتورهای خطر شامل سن، جنس، نژاد، وضعیت دستگاه گوارش، بررسی شیوع ژن‌های حدت (*gelE*) و *ccf* و نیز سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های شناسایی شده، صورت گرفت.

امروزه شیوع انتروکوکوس‌ها، به دلیل مراجعه زیاد و مداوم سگ‌ها به کلینیک‌های دامپزشکی و همچنین بالارفتن تماس آن‌ها با محیط خارج از منزل، افزایش یافته است. به همین دلایل، نیز شیوع این باکتری‌ها در سگ‌ها بیشتر از گربه‌ها است (Jackson et al, 2009). در اکثر مطالعات انجام شده بر روی *انتروکوکوس* در سگ‌ها و گربه‌ها، بیش‌ترین گونه جدا شده، *انتروکوکوس فکالیس* یا *فاسیوم* بوده است. این باکتری‌ها جزء اجرام شایع در دستگاه گوارش حیوانات خانگی محسوب می‌شوند (Poeta et al, 2006).

Iseppi و همکاران در سال ۲۰۱۵ با مطالعه بر روی ۱۱۵ نمونه مدفوع از سگ‌ها و گربه‌ها و به روش PCR، ۴۲ جدایه *انتروکوکوس فاسیوم*، ۳۶ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* و ۱۵ مورد سایر انتروکوکوس‌ها، شامل *کاسلی - فلاووس*، *دورانس*، *هیرا*، *گالیناروم* و *آویوم* جداسازی کردند. در مطالعه دیگر که بر روی ۱۶۰ نمونه مدفوع سگ صورت گرفت، ۱۰۵ باکتری *انتروکوکوس* شناسایی شد که ۹۲ جدایه *فاسیوم*، ۳۵ جدایه *فکالیس* و بقیه شامل *هیرا*، *کاسلی فلاووس* و *ماندتی* بودند (Kubasova et al, 2016). در تحقیق دیگر بر روی ۵۰ قلاده سگ و ۲۰ گربه و به روش PCR، ۵۸ جدایه *انتروکوکوس* شناسایی شدند، که ۳۱ جدایه *فاسیوم*، ۱۶ جدایه *فکالیس* و بقیه *کاسلی - فلاووس*، *دورانس*، *هیرا* و *گالیناروم* بودند (Ben Said et al, 2017). در مطالعه Jackson و همکاران در سال ۲۰۰۹ از تعداد ۵۳ نمونه در سگ‌ها، ۸۶ باکتری *انتروکوکوس* شناسایی شد که ۵۲ جدایه *فکالیس* و ۷ جدایه *فاسیوم* و بقیه انتروکوکوس‌های دیگر بودند. در مطالعه Bang و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی ۶۵ قلاده سگ، ۶۶ جدایه *انتروکوکوس* شناسایی شد که ۳۴ جدایه *فکالیس* و ۳۲ جدایه *فاسیوم* بودند. مطالعات انجام شده توسط Jackson و همکاران در سال ۲۰۰۹، با تحقیق حاضر مشابه بود و اکثر انتروکوکوس‌های شناسایی شده *فکالیس* بودند؛

بالعکس نتایج اکثر محققین، با مطالعه حاضر، از نظر حضور و شیوع باکتری *انتروکوکوس* متفاوت بود و اکثر جدایه‌ها *فاسیوم* بودند. در مطالعه حاضر از میان دو گونه جدا شده، *انتروکوکوس فکالیس* غالب‌ترین جدایه شناسایی شده بود که ممکن است به دلیل بهبود روش‌های شناسایی و بالا بودن تعداد نمونه‌های مورد مطالعه باشد، ضمن این که فاکتور سن، نیز یک عامل تعیین کننده است (Greene and Prescott, 2012).

در مطالعه Bang و همکاران در سال ۲۰۱۷ برخلاف مطالعه حاضر، ارتباط معنی‌داری بین میزان شناسایی جدایه‌ها و فاکتور سن وجود داشت؛ به گونه‌ای که شیوع *انتروکوکوس فکالیس* با افزایش سن، کاهش و شیوع *انتروکوکوس فاسیوم* با افزایش سن، افزایش یافت. در مطالعه Wood و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی سگ‌های مبتلا به عفونت دستگاه ادراری ناشی از *انتروکوکوس*، سنگ‌ها، نئوپلازی‌ها و ناهنجاری‌های بخش تحتانی دستگاه ادراری، به عنوان یک فاکتور مستعدکننده، برای عفونت‌های ثانویه ناشی از این باکتری مشخص گردید. از ۱۲۶ قلاده سگ مورد مطالعه، در ۴۳ مورد *انتروکوکوس فکالیس* و در ۱۴ مورد، *انتروکوکوس فاسیوم* تعیین گردید. به دلیل شیوع بالاتر این ناهنجاری‌ها در جنس ماده، عفونت‌های ناشی از *انتروکوکوس* در دستگاه ادراری ماده‌ها، ۲/۱ برابر بیشتر از نرها مشاهده گردید، با این حال در مطالعه حاضر، ارتباط معنی‌داری بین شیوع *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* با فاکتور جنس دیده نشد. البته تحقیق حاضر، بر روی سگ‌های سالم از نظر بالینی صورت گرفت.

در مطالعه Oliveira و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی ۱۷ جدایه *انتروکوکوس فکالیس*، ۷ جدایه، ژن حدت ژلاتیناز داشتند. فاسیوم‌های جداسازی شده، ژن حدت ژلاتیناز نداشتند. در مطالعه Gulhan و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی *انتروکوکوس فکالیس*، از ۲۶ جدایه شناسایی شده در سگ‌ها، ۱۰ جدایه، حاوی ژن حدت ژلاتیناز بود. در مطالعه Iseppi و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی سگ‌ها و گربه‌ها، با استفاده از PCR، از ۱۱۵ جدایه *انتروکوکوس* شناسایی شده، ۳۰ جدایه، ژن حدت ژلاتیناز داشتند. از ۴۲ جدایه *فاسیوم*، تعداد ۳ جدایه و از ۳۶ جدایه *فکالیس*، تعداد ۱۵ جدایه، ژن حدت ژلاتیناز داشتند. در مطالعه Kubasova و همکاران در سال ۲۰۱۶ جهت شناسایی ژن‌های حدت در ۳۵ جدایه *انتروکوکوس فکالیس*، ۲۴ جدایه ژن ژلاتیناز و در ۹۲ جدایه *انتروکوکوس فاسیوم*، ۳ جدایه ژن ژلاتیناز داشتند. همچنین از نظر ژن حدت *ccf*، ۲۷ جدایه *فکالیس* و ۸ جدایه *فاسیوم*، واجد آن بودند. در مطالعه Ferguson و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی سگ‌ها، ۷ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شد که ۶ جدایه، ژن حدت ژلاتیناز داشتند و ۳ جدایه *فاسیوم* جدا شد که هیچ کدام ژن حدت ژلاتیناز نداشتند. در میان جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس*، حضور ژن حدت بیشتر بود و بیشتر جدایه‌های *انتروکوکوس فاسیوم*، ژن حدت نداشتند. نتایج مطالعات فوق، از نظر شیوع ژن‌های حدت، با مطالعه حاضر نزدیک و همسو بودند. در تحقیق حاضر، شیوع ژن‌های حدت ژلاتیناز و *ccf*، در نمونه‌های مثبت و به روش PCR بررسی گردید که از ۴۵ جدایه مثبت، ۳۶ جدایه واجد ژن‌های حدت بودند. از این تعداد، ۲۶ جدایه هر دو ژن حدت، ۵ جدایه ژن حدت ژلاتیناز و ۵ جدایه ژن حدت *ccf* داشتند. در جدایه‌های *انتروکوکوس فاسیوم*، ژن حدت ژلاتیناز وجود نداشت.

افزایش جداسازی *gelE*، نشان‌دهنده افزایش حدت انتروکوکوس‌ها می‌باشد. افزایش ژن‌های حدت ممکن است به دلیل افزایش فاکتورهای بیشتر حدت و یا کاهش پاسخ سیستم ایمنی میزبان باشد. در نتیجه حیوانات خانگی می‌توانند به عنوان یک مخزن از انتروکوکوس‌های بیماری‌زا که دارای عوامل حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی هستند، محسوب شوند. وقوع همزمان ژن *ccf*، به نظر می‌رسد که یک صفت مشترک باشد، که از جدایه‌های *فکالیس* در انسان و حیوانات شناسایی شده است (Marra et al, 2007).

در مطالعه Iseppi و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی سگ‌ها و گربه‌ها، جهت بررسی‌حساسیت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *انتروکوکوس* و به روش انتشار دیسک، نشان داده

شد که بیش‌ترین مقاومت نسبت به تتراسیکلین بود. سپس اریترومایسین، کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین، ایمی‌پنم، نیتروفورانتوئین، جنتامایسین، پنی‌سیلین G و استرپتومایسین مقاوم بودند. در مطالعه Kubasova و همکاران در سال ۲۰۱۶ مشخص گردید که به پنی‌سیلین G و کلرامفنیکل حساس بودند. در مقابل به آمپی‌سیلین، تتراسیکلین، اریترومایسین و ونکومایسین مقاوم بودند. ونکومایسین و کلرامفنیکل، بیشتر در مقابل *فاسیوم* مؤثر بودند. هیچ‌کدام از فاسیوم‌ها به جنتامایسین مقاوم نبودند. همچنین در ۳۵ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده، به ونکومایسین، تتراسیکلین، پنی سیلین G، اریترومایسین، آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و جنتامایسین مقاوم بودند. هیچ‌کدام از فکالیس‌ها به اریترومایسین حساس نبودند. در مطالعه حاضر بر روی جدایه‌های *انتروکوکوس*، نشان داده شد که ۱۰۰ درصد جدایه‌ها به استرپتومایسین، آمپی‌سیلین، آزیترومایسین و ایمی‌پنم مقاوم بودند.

در مطالعه Bertelloni و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی سگ‌های خانگی، بیشترین مقاومت، به ترتیب نسبت به استرپتومایسین، تتراسیکلین، انروفلوکساسین، جنتامایسین، اریترومایسین، نیتروفورانتوئین، کلرامفنیکل و آمپی‌سیلین مشاهده گردید. در مطالعه Ben Said و همکاران در سال ۲۰۱۷ از ۵۸ نمونه *انتروکوکوس* جدا شده، بیشترین مقاومت نسبت به اریترومایسین و تتراسیکلین به دست آمد. در مطالعه Oliveira و همکاران در سال ۲۰۱۶ همه انتروکوکوس‌ها به آمپی‌سیلین، جنتامایسین، ایمی‌پنم و ونکومایسین حساس بودند. بیشترین مقاومت، به تتراسیکلین، استرپتومایسین، اریترومایسین و کلرامفنیکل به دست آمد. در مطالعه دیگر، از ۲۶ مورد *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده در سگ‌ها، ۱۰۰ درصد جدایه‌ها، به آمپی‌سیلین، پنی‌سیلین و اریترومایسین حساس بودند (Gulhan et al, 2015). در مطالعه Jackson و همکاران در سال ۲۰۰۹ بیشترین مقاومت به اریترومایسین، جنتامایسین، نیتروفورانتوئین، پنی‌سیلین G، تتراسیکلین و استرپتومایسین در *انتروکوکوس فکالیس* و *فاسیوم* وجود داشت. در مطالعه Golob و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر روی *انتروکوکوس فکالیس*، بیشترین مقاومت به تتراسیکلین و اریترومایسین بود. از آن جا که از تتراسیکلین و اریترومایسین برای درمان انواع عفونت‌های دستگاه ادراری- تناسلی در سگ‌ها و گربه‌ها استفاده می‌شود، استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است دلیل فشار برای مقاومت فنوتیپی انتروکوکوس‌ها، نسبت به آن‌ها باشد. Sattari-Maraji و همکاران در سال ۲۰۱۹ گزارش کردند که گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم*، در کودکان (در طی یک دوره ۴ ساله)، بیشترین گونه‌های غالب بودند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که اکثریت گونه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* (۶۶ درصد)، متعلق به ۳ گونه معمول بودند. شیوع ژن *vanA*، در میان جدایه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* مقاوم به ونکومایسین، به ترتیب ۹۵ و ۵۰ درصد تعیین گردید.

سولفونامیدها یکی از آنتی‌بیوتیک‌های پرمصرف هستند که در دامپزشکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به علت مصرف این داروها در سال‌های متمادی، بسیاری از سویه‌های باکتری‌ها، نسبت به آن‌ها مقاوم شده‌اند، شاید دلیل مقاومت باکتری‌ها نسبت به سولفونامیدها، تجویز بی‌رویه آن‌ها باشد. به منظور افزایش تأثیر سولفونامیدها و افزایش اثر سینرژیستی آن‌ها، گاهی آن‌ها را با سایر ترکیباتی نظیر تری‌متوپریم همراه می‌کنند تا اثر ضد باکتری آن‌ها افزایش پیدا کند. امروزه ونکومایسن، یک آنتی‌بیوتیک رایج و در برخی از موارد، تنها آنتی‌بیوتیک مؤثر در درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *انتروکوکوس* است که می‌تواند دلیلی بر افزایش روزافزون مقاومت *انتروکوکوس* به این آنتی‌بیوتیک باشد. در برخی از کشورها نظیر هلند، افزایش مداوم مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ونکومایسین در انتروکوکوس‌های انسانی و انتقال آن از طریق تماس انسان با حیوانات، نیز از دیگر دلایل بالا بودن مقاومت به این آنتی‌بیوتیک گزارش شده است (Bunt et al, 2018). برخلاف نتایج مطالعه حاضر، در برخی از مطالعات میزان مقاومت به آمپی‌سیلین، جنتامایسین و ایمی‌پنم پایین

گزارش شده است که می‌تواند به دلیل متفاوت بودن رویکردهای درمان و یا میزان شیوع عفونت باشد (Sharifi et al, 2013; Kubasova et al, 2017). در بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، نتایج مطالعات Kubasova و همکاران در سال ۲۰۱۷، Oliveira و همکاران در سال ۲۰۱۶ و Gulhan و همکاران در سال ۲۰۱۵ با تحقیق حاضر، از نظر مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی تقریباً مغایرت داشت، به نحوی که در مطالعات فوق، حساسیت زیادی در جدایه‌های *انتروکوکوس* نسبت به آمپی‌سیلین، استرپتومایسین، ونکومایسین، جنتامایسین و ایمی‌پنم وجود داشت. در مقابل، مطالعات انجام شده توسط Soodmand و همکاران در سال ۲۰۱۸، Ben Said و همکاران در سال ۲۰۱۷، Iseppi و همکاران در سال ۲۰۱۵ و Jackson در سال ۲۰۰۹ با تحقیق حاضر، از نظر بحث مقاومت و حساسیت‌های آنتی‌بیوتیکی همسو و مشابه بود.

در قسمت نتیجه‌گیری، نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که شیوع باکتری *انتروکوکوس* در سگ‌های خانگی شهرستان اهواز ۳۰ درصد بود که از این میزان، ۷۵/۵ درصد *فکالیس* و ۲۴/۵ درصد *فاسیوم* بودند. همچنین در بحث شیوع ژن‌های حدت ژلاتیناز و *ccf*، به طور کلی، ۸۰ درصد جدایه‌ها ژن حدت داشتند. در بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی نیز به طور عمده، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی زیادی در هر دو جدایه *فکالیس* و *فاسیوم* وجود داشت و هر دو جدایه به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها مانند اریترومایسین، استرپتومایسین، سفالکسین، آزیترومایسین و ایمی‌پنم مقاومت بالایی داشتند. همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به پنی‌سیلین G و تتراسیکلین بیشتر در جدایه‌های *فکالیس*، و مقاومت به انروفلوکساسین بیشتر در جدایه‌های *فاسیوم* مشاهده شد. بحث مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در انتروکوکوس‌ها بسیار مهم و این مقاومت به شدت رو به افزایش است. این مسأله باید در روش‌های درمانی عفونت ناشی از انتروکوکوس‌ها، جهت جلوگیری از اشاعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی و نیز جلوگیری از انتقال ژن‌های مقاومت به سایر باکتری‌ها، مد نظر قرار گیرد. نتایج نشان داد که درصد فراوانی *انتروکوکوس*، از شیوع نسبتاً بالایی در سگ‌های منطقه اهواز برخوردار است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در دو گونه فوق (*فکالیس* و *فاسیوم*)، نسبتاً بالا بوده و با توجه به اهمیت بسیار بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تجویز مناسب آنتی‌بیوتیک‌ها توصیه می‌شود.

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

Bang, K., An, J. U., Kim, W., Dong, H. J., Kim, J., & Cho, S. (2017). Antibiotic resistance patterns and genetic relatedness of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from military working dogs in Korea. *Journal of Veterinary Science*, *18*(2), 229-236.

Ben Said, L., Dziri, R., Sassi, N., Lozano, C., Ben Slama, K., Ouzari, I., Torres, C., & Klibi, N. (2017). Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in canine and feline enterococci in Tunisia. *Acta Veterinaria Hungarica*, *65*(2), 173-184.

Bertelloni, F., Salvadori, C., Lotti, G., Cerri, D., & Ebani, V. V. (2017). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* strains isolated from healthy domestic dogs. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, *64*(3), 301-312.

Bunt, G. van den., Top, J., Hordijk, J., Greeff, S. C de., Mughini-Gras, L.,Corander, J., Pelt, W. van., Bonten, M. J. M., Fluit, A. C., & Willems, R. J. L. (2018). Intestinal carriage of ampicillin- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in humans, dogs and cats in the Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(3), 607–614.

Ferguson, D. M., Talavera, G. N., Hernández, L. A., Weisberg, S. B., Ambrose, R. F., & Jay, J. A. (2016). Virulence genes among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from coastal beaches and human and nonhuman sources in Southern California and Puerto Rico. *Journal of Pathogens*, *1*, 1-7.

Frye, J. G., & Jackson, C. R. (2013). Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enteroccocus* spp. isolated from US food animals. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 1-22.

Golob, M., Pate, M., Kušar, D., Dermota, U., Avberšek, J., Papić, B., & Zdovc, I. (2019). Antimicrobial Resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat. *BioMed Research International*, *1*, 1-12

Greene, C. E., & Prescott, J. F. (2012). *Enteric bacterial infections*. In: *Infectious diseases of the Dog and Cat*. Greene. Vol. 1. (4th Edition). St. Louis Missouri, USA. Pp: 333-334.

Gulhan, T., Boynukara, B., Ciftci, A., Sogut, M. U., & Findik, A. (2015). Characterization of Enterococcus faecalis isolates originating from different sources for their virulence factors and genes, antibiotic resistance patterns, genotypes and biofilm production. *Iranian Journal of Veterinary Research*, *16*(3), 261-266.

Hammerum, A. M. (2012). Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(7), 619-625.

Iseppi, R., Messi, P., Anacarso, I., Bondi, M., Sabia, C., Condò, C., & de Niederhausern, S. (2015). Antimicrobial resistance and virulence traits in *Enterococcus* strains isolated from dogs and cats. *New Microbiologica*, *38*, 369-378.

Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., & Barrett, J. B. (2004). Use of a genus-and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(8), 3558-3565.

Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., Davis, J. A., Barrett, J. B., & Frye, J. G. (2009). Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from dogs and cats in the United States. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(4), 1269-1278.

Kajihara, T., Nakamura, S., Iwanaga, N., Oshima, K., Takazono, T., Miyazaki, T., Izumikawa, K., Yanagihara, K., Kohno, N., & Kohno, S. (2015). Clinical characteristics and risk factors of enterococcal infections in Nagasaki, Japan: a retrospective study. *BMC Infectious Diseases*, *15*(1), 1-8.

Marra, A., Dib-Hajj, F., Lamb, L., Kaczmarek, F., Shang, W., Beckius, G., Milici, A. J., Medina, I., & Gootz, T. D. (2007). Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *58*(1), 59-65.

Nazarian-Firouzabadi, F., & Akrami, M. J. (2019). Antibiogram analysis and tracking of the virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* isolates. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, *24*(2), 17-29.

Oliveira, M., Tavares, M., Gomes, D., Touret, T., São Braz, B., Tavares, L., & Semedo-Lemsaddek, T. (2016). Virulence traits and antibiotic resistance among enterococci isolated from dogs with periodontal disease. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *46*, 27-31.

Poeta, P., Costa, D., Rodrigues, J., & Torres, C. (2006). Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *27*(2), 131-137.

Sattari-Maraji, A., Jabalameli, F., Farahani, N.N., Beigverdi, R., & Emaneini, M. (2019). Antimicrobial resistance pattern, virulencedeterminants and molecular analysis ofEnterococcus faeciumisolated from childreninfections in Iran. *BMC Microbiology*, *19*, 1-8.

Sharifi, Y., Hasani, A., Ghotaslou, R., Naghili, B., Aghazadeh, M., Milani, M., & Bazmany, A. (2013). Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *3*(1), 197-201.

Soodmand, J., Zeinali, T., Kalidari, G., Hashemitabar, G. H., & Razmyar, J. (2018). Antimicrobial susceptibility profile of Enterococcus species isolated from companion birds and poultry in the Northeast of Iran. *Archives of Razi Institute*, *73*(3), 207-213.

Wood, M. W., Lepold, A., Tesfamichael, D., & Lasarev, M. R (2020). Risk factors for enterococcal bacteriuria in dogs: A retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34(6), 2447-2453.

Zhou, L., Sun, H., Song, Sh., Liu, J., Xia, Zh., Sun, Y., & Lyu, Y. (2019). H3N2 *canine influenza virus* and *Enterococcus faecalis* coinfection in dog's in China. *BMC Veterinary Research*, *15*, 1-6.

Received: 29.12.2020
Accepted: 25.05.2021

Vol. 19, No. 2, Summer, 2023 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2021.264973.2338
DOR: 20.1001.1.17356873.1402.19.2.17.4

Frequency detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* infection and antibiotic resistance pattern in diarrheic dogs in Ahvaz district

Bahman Mosallanejad[1*], Darioush Gharibi[2], Reza Avizeh[1] and Moheb Narimizadeh[3]

[1] Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 29.12.2020 Accepted: 25.05.2021

Abstract

Enterococci are a part of the opportunistic pathogens, which are very important in medicine. These bacteria can cause a variety of diseases in both dogs and human. The aim of the present study was to investigate the frequency detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in companion dogs in Ahvaz and review of risk factors including age, gender, breed and diarrheic status in animals. Also, the prevalence of virulence genes was evaluated including gelatinase (*gelE*) and (*ccf*) and antibiotic susceptibility measured in obtained samples. Sampling was performed from the rectum of the 150 dogs (36 cases diarrheic and 114 non-diarrheic). The samples were evaluated by two methods of bacterial culture and PCR. In bacterial culture, 122 isolates, suspected to *Enterococcus* species, were isolated and subsequently the detection of *SodA* gene specific to *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* was performed by PCR. Overall forty-five positive isolates were identified, which thirty four of which were *Enterococcus faecalis* (75.5%) and 11 were *Enterococcus faecium* (24.5 %). In regard to identify virulence genes (*gelE* and *ccf*), 36 out of 45 isolates were positive for virulence genes. Twenty six isolates (57.77%) had virulence genes, 5 isolates (11.11%) *ccf* gene and 5 other isolates (11.11%) *gelE* gene. In all, nine isolates (20%) had no virulence gene. Fourteen different antibiotics were used to determine antibiotic susceptibility that indicated all isolates were resistant to azithromycin, streptomycin, ampicillin and imipenem. Thereafter, the highest resistance was related to erythromycin and cephalexin (95.5%), trimethoprim sulfamethoxazole (84.4%) and gentamicin (80%), respectively. Also, the highest sensitivity was related to nitrofurantoin (62.2%), penicillin G (60%) and enrofloxacin (55.5%), respectively. There was no significant relationship between risk factors such as age, gender, breed and diarrheic condition with the presence of *Enterococcus* in the studied dogs (P>0.05). The results showed that the prevalence of *Enterococci* was relatively significant (30%) in dogs of Ahvaz district. Antibiotic resistance was significant in the two species of Enterococci. Finally, because of the very high importance of antibiotic resistance, appropriate administration of antibiotics is recommended.

Key words: *Enterococcus*, *Faecalis*, *Faecium*, Virulence gene, Antibiotic resistance

* **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/).