مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۵، شماره ۱، ۱۳۹۹، ۹۷-۹۰
مقاله پژوهشی

بررسی آلودگی بردتلا برونشی سپتیکا در سگ‌های خانگی و پناهگاه با روش‌های مولکولی و کشت و ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های جداسازی شده

فرشته عافی[۱]، شهرام جمشیدی[۱]، سعید بکائی[۲]، بهار نیری فسایی[۳]، ایرج اشرافی تمای[۳]، معین دلربائی[۱]، تقی زهرایی صالحی[۳]

[۱]گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲]گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۳]گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

10.22059/jvr.2017.234565.2639
تاریخ دریافت: ۶ مهر ماه ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۲۷ آذر ماه ۱۳۹۸

چکیده

زمینهٔ مطالعه: بردتلا برونشی سپتیکا یک باکتری گرم منفی و عامل بیماریزای دستگاه تنفس در سگ، خوک، گربه، اسب، حیوانات آزمایشگاهی و انسان است.

هدف: هدف از این مطالعه بررسی آلودگی بردتلا برونشی سپتیکا در ناحیه‌ی حلق سگ‌های خانگی و سگ‌های پناهگاه با روش‌های مولکولی و کشت و ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های جداسازی شده در ایران بود.

روش‌کار: در این بررسی از ۶۲ سگ خانگی شامل ۳۱ سگ دارای علائم تنفسی و ۳۱ سگ سالم و بدون علائم تنفسی و ۶۲ سگ نگهداری شده در پناهگاه شامل ۳۱ سگ دارای علائم تنفسی و ۳۱ سگ بدون علائم تنفسی، نمونه سواب حلق جمع آوری گردید. نمونه‌های اخذ شده با روش‌های مولکولی و کشت از نظر آلودگی به بردتلابرونشی سپتیکا بررسی شد و حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های جداسازی شده مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: بر طبق نتایج مولکولی، ۱۶/۱درصد سگ‌های خانگی دارای علایم تنفسی، ۹/۶ درصد سگ‌های خانگی فاقد علایم تنفسی، ۲۲/۵ درصد سگ‌های پناهگاه دارای علائم تنفسی و ۱۶/۱ درصد سگ‌های سالم پناهگاه دارای آلودگی به بردتلا برونشی سپتیکا بودند. همچنین این باکتری از ۳/۲ درصد سگ‌های خانگی دارای علایم تنفسی، ۳/۲ درصد سگ‌های پناهگاه مبتلا به علائم تنفسی و ۶/۴ درصد سگ‌های پناهگاه فاقد علائم تنفسی از طریق کشت باکتریایی نیز جدا گردید. در کشت هیچ یک از سگ‌های خانگی فاقد علایم تنفسی باکتری جدا نشد. سویه‌های جدا شده نسبت به تتراسایکلین، انروفلوکساسین، کوتریموکسازول و داکسی سایکلین دارای حساسیت بودند در حالی که در برابر آمپی سیلین و سفتریاکسون به ترتیب مقاوم بوده و حساسیت متوسط نشان دادند.

نتیجه‌گیری نهایی: بررسی حاضر بیانگر میزان آلودگی قابل توجه به بردتلا برونشی سپتیکا در سگ‌ها می‌باشد. سگ‌های خانگی و به خصوص آن‌هایی که به شکل متراکم نگهداری می‌شوند می‌توانند باعث انتقال آلودگی به انسان‌های در تماس با آن‌ها شوند.

کلمات کلیدی: بردتلا برونشی سپتیکا، سگ، کشت، PCR، حساسیت آنتی بیوتیکی

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: شهرام جمشیدی، گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: shjamshidi@ut.ac.ir

مقدمه

بردتلا برونشی سپتیکا از عوامل مشارکت کننده در کمپلکس بیماری تنفسی سگ سانان و یک کوکوباسیل گرم منفی و هوازی بوده که پس از کلونیزه شدن در سلول‌های اپیتلیال مژکدار دستگاه تنفس می‌تواند منجر به بروز بیماری التهابی این ناحیه شود (۵). این باکتری اولین بار در دهه اول قرن بیستم طی مطالعه‌ای بر روی سگ‌های مبتلا به دیستمپر جداسازی شد و نقش آن به عنوان عامل بیماری زا در دستگاه تنفس سگ‌ها برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ مورد توجه قرار گرفت (۷،۱۰،۱۲،۲۰). بردتلا برونشی سپتیکا از عوامل مشارکت کننده در کمپلکس بیماری تنفسی سگ سانان می‌باشد (۹،۱۳). این باکتری دارای

توزیع جهانی بوده و در مراکز نگهداری سگ‌ها به شکل متراکم شیوع بالایی دارد و می‌تواند سگ‌ها را در تمامی گروه‌های سنی آلوده نماید (۱). بردتلا برونشی سپتیکا به طور اولیه از دستگاه تنفس فوقانی سگ‌های به ظاهر سالم نیز جدا شده است (۲). طبق یک بررسی در کانادا بر روی ۳۵۸ قلاده سگ، شیوع سرمی بردتلا برونشی سپتیکا در بیشتر جمعیت‌های مورد مطالعه متوسط تا زیاد بوده است (۴). همچنین در مطالعه دیگری که در سوئیس بر روی ۳۰۲ قلاده سگ خانگی به روش الایزا صورت گرفته شیوع سرمی بردتلا برونشی سپتیکا ۲۲ درصد بوده است(۶). اگرچه این باکتری به عنوان یک عامل مقیم و یا بیماریزا در دستگاه تنفس بسیاری از حیوانات اهلی و وحشی شناخته می‌شود، در مواردی می‌تواند باعث بروز بیماری تنفسی و به ندرت عفونت‌های سیستمیک از جمله پریتونیت، سپتیسمی و مننژیت در انسان‌های دارای نقص ایمنی شود (۱۹). طبق برآورد انجام شده تا پایان سال ۲۰۰۶، ۵۵ مورد عفونت توسط این باکتری در انسان در سراسر جهان گزارش شده است (۲۱). اخیراً این باکتری از کودکان بدون نقص ایمنی و مبتلا به پنومونی پایدار نیز جدا شده است (۱۸). انتقال باکتری ممکن است به صورت مستقیم از راه تماس با ترشحات دستگاه تنفس و ریز قطره‌ها و همچنین به صورت غیر مستقیم از راه منابع آب آلوده ایجاد شود (۱۶). عفونت‌های ناشی از این باکتری به صورت مزمن و اغلب بدون علامت بالینی بوده و حتی با وجود درمان آنتی بیوتیکی به سختی ریشه کن می‌شود. مطالعات محدودی در زمینه اپیدمیولوژی آلودگی با بردتلا برونشی سپتیکا در سگ‌ها انجام شده است که مشکلاتی همچون بالا بودن میزان عفونت‌های بدون علامت و مدت زمان دفع و انتشار طولانی باکتری شاید در آن مؤثر باشد (۱۲). مطالعه حاضر با هدف بررسی آلودگی بردتلا برونشی سپتیکا در ناحیه‌ی حلق سگ‌های خانگی و سگ‌های پناهگاه با روش‌های مولکولی و کشت و ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های جداسازی شده در ایران انجام شد.

مواد و روش کار

حیوانات مورد مطالعه و روش نمونه برداری: در این مطالعه از ۱۲۴ قلاده سگ شامل ۶۲ قلاده سگ خانگی و ۶۲ قلاده سگی که در شرایط متراکم در پناهگاه نگهداری می‌شدند نمونه برداری انجام شد. در نیمی از موارد نمونه برداری از سگ‌های سالم و در مابقی از سگ‌های مبتلا به علائم تنفسی صورت گرفت. سگ‌ها دراین مطالعه از لحاظ علایم تنفسی در هنگام معاینه بالینی و بر اساس سابقه مورد بررسی قرار گرفته و بر اساس مطالعه‌ی Chalker و همکاران در سال ۲۰۰۳ در ۴ گروه به شرح زیر طبقه بندی شدند: ۱. فاقد علایم تنفسی، ۲. علایم تنفسی خفیف (سرفه خفیف)، ۳. علایم تنفسی متوسط (سرفه خفیف به همراه ترشحات بینی)، ۴. علایم تنفسی شدید (سرفه، وجود ترشحات غیر طبیعی بینی، بی حالی، بی اشتهایی و یا علایم درگیری دستگاه تنفسی تحتانی) (۱).

از هر قلاده سگ مورد مطالعه دو نمونه سواب استریل از ناحیه حلق به منظور انجام آزمایش مولکولی و کشت باکتریایی جمع آوری گردید. نمونه‌های اخذ شده به منظور کشت در لوله‌های استریل حاوی محیط انتقالی ذغال دار ایمیز آگار قرار داده شد و طی ۳۰ دقیقه به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌های مربوط به آزمایش مولکولی، جداگانه در میکروتیوب‌های محتوی ۱ میلی لیتر آب مقطر استریل تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

کشت بردتلا برونشی سپتیکا: به منظور جداسازی بردتلا برونشی سپتیکا کشت سطحی بر روی محیط اختصاصی شارکول-سفالکسین آگار داده شد و نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد درون انکوباتور قرار داده شدند. تشخیص نهایی پرگنه‌های رشد کرده با توجه به خصوصیات رنگ آمیزی گرم، حرکت، تست‌های کاتالاز، اکسیداز، اوره آز و رشد بر روی محیط مک کانکی آگار و آگارخون صورت گرفت. نمونه‌های مثبت به منظور ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفتند.

مطالعه مولکولی: میکروتیوب‌ها پس ازقرار گیری در دمای محیط، به مدت یک دقیقه ورتکس شدند. بعد از حذف سواب ها، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۵۰۰۰×g سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل با ۶۰ میکرو لیتر آب مقطر مخلوط گردید. در ادامه با استفاده از کیت تجاریMBST و طبق دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده استخراج DNA انجام گرفت. نمونه کشت باکتریایی استاندارد بردتلا برونشی سپتیکا Rb50 به عنوان کنترل مثبت درنظر گرفته شد. جهت تکثیر قطعه 316 bp از پرایمرهای B13615F ، -5´ ATCGCTGGGATTACCCCTAC-3´ و B13930R، 5′-TACTTGAGCGGTTCGAAGGT-3′(*B. Bronchiseptica* strain RB50) استفاده شد. ترکیب واکنش PCR به این صورت تهیه شد: PCR Master

mix به میزان ۴۵ میکرو لیتر، ۰/۵ میکرو لیتر از هر پرایمر (۵۰ پیکو مول/میکرو لیتر) و به میزان۴ میکرولیتر DNA الگو. در ادامه واکنش PCR طی مراحل زیر صورت پذیرفت: واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۴۰ چرخه واسرشت در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، امتزاج پرایمرها در ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، توسعه رشته‌ها در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و توسعه نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه (۴).

الکتروفورز محصولات حاصل از PCR در آگارز ۱/۲ درصد (Fermentas) انجام شد و پس از رنگ آمیزی در اتیدیوم بروماید (Sigma) تصویر برداری تحت تابش اشعه ماورا بنفش توسط دستگاه ژل داکیومنت صورت پذیرفت. نمونه کنترل مثبت مورد استفاده بردتلا برونشی سپتیکا Rb50 (PTCC No. 1025:) بود و در چاهک مربوط به کنترل منفی از ۱۰ میکرو لیتر آب مقطر به عنوان جایگزین DNA الگو استفاده شد.

بررسی آماری: یافته‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری مربع کای تجزیه و تحلیل شده و فرضیه‌ها در سطح α=۰/۰۵ مورد آزمون آماری قرار گرفتند.

نتایج

در مجموع از ۱۲۴ نمونه مورد بررسی به روش مولکولی، ۱۶/۱۲ درصد دارای آلودگی به بردتلا برونشی سپتیکا بودند. بیشترین (۲۲/۵ درصد) و کمترین (۹/۶ درصد) میزان آلودگی به ترتیب مربوط به گروه سگ‌های پناهگاه دارای علائم تنفسی و گروه سگ‌های خانگی بدون علایم تنفسی بود. میزان آلودگی در هر دو گروه سگ‌های پناهگاه بدون علائم تنفسی و سگ‌های خانگی واجد علایم تنفسی ۱۶/۱ درصد بود. تفاوت درصد آلودگی در چهار گروه نام برده از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). همچنین آلودگی در سگ‌های بدون علایم تنفسی ۱۲/۹ درصد و در سگ‌های دارای علایم ۱۹/۳ درصد بدست آمد که این تفاوت نیز از نظر آماری معنی دار نبود (P>۰/۰۵). بیشترین درصدآلودگی (۳۰ درصد) مربوط به سگ‌های دارای علایم تنفسی متوسط بود. میزان آلودگی در سگ‌های مبتلا به علایم تنفسی خفیف و شدید به ترتیب ۱۲/۱۲ و ۲۲/۹ درصد بود. بر اساس بررسی آماری انجام شده رابطه معنی داری بین شدت علایم تنفسی و درصد آلودگی به بردتلا برونشی سپتیکا در روش مولکولی وجود نداشت (P>۰/۰۵) (تصویر ۱).

بر طبق نتایج حاصل از کشت، بردتلا برونشی سپتیکا از ۳/۲۲ درصد نمونه‌ها شامل ۳/۲درصد سگ‌های خانگی دارای علایم تنفسی، ۳/۲درصد سگ‌های پناهگاه دارای علائم تنفسی و ۶/۴ درصد سگ‌های پناهگاه بدون علائم تنفسی جدا شد. در هیچ یک از سگ‌های خانگی بدون علایم تنفسی باکتری با استفاده از کشت جدا نگردید (جدول ۱). تفاوت درصد جداسازی باکتری در این گروه‌ها از نظر آماری معنی دار نبود (P>۰/۰۵). میزان آلودگی در سگ‌های بدون علایم تنفسی و در سگ‌های دارای علایم تنفسی برابر بود. این باکتری از ۱۰درصد سگ‌های دارای علایم تنفسی متوسط جدا شد در حالی که از هیچ یک از سگ‌های مبتلا به علایم تنفسی خفیف و شدید جدا نگردید. رابطه معنی داری بین درصد جداسازی باکتری به روش کشت و شدت علایم تنفسی وجود نداشت (P>۰/۰۵) (تصویر ۲).

سویه‌های جدا شده نسبت به تتراسایکلین، انروفلوکساسین، کوتریموکسازول و داکسی سایکلین دارای حساسیت بودند و همچنین در برابر آمپی سیلین و سفتریاکسون به ترتیب مقاومت و حساسیت متوسط نشان دادند.

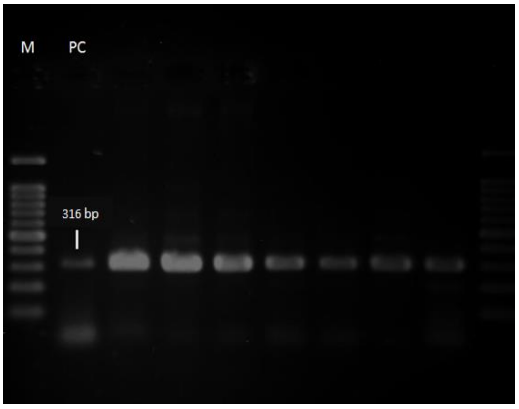
براساس یافته‌های حاصل از بررسی آماری میزان آلودگی به بردتلا برونشی سپتیکا در دو روش کشت مولکولی و رابطه‌ای با سن، جنس و نژاد ندارد (P>۰/۰۵) (جدول ۲).

جدول ۱. مقایسه نتایج حاصل از روش کشت و مولکولی (PCR).

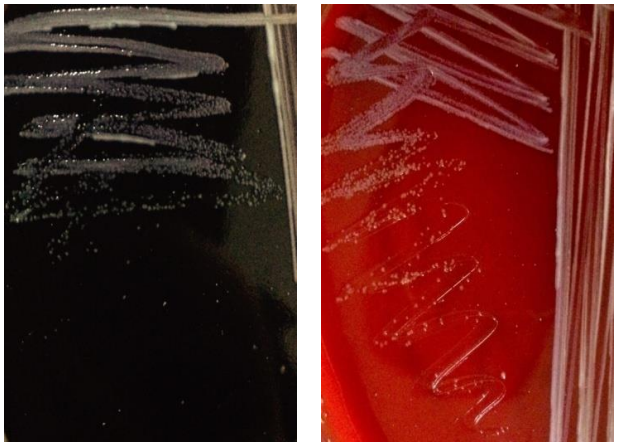
گروه	تعداد نمونه	تعداد و درصد موارد آلودگی به روش مولکولی	تعداد و درصد موارد آلودگی به روش کشت
سگ‌های خانگی فاقد علائم تنفسی	۳۱	۳ (۹/۶ درصد)	۰
سگ‌های خانگی دارای علائم تنفسی	۳۱	۵ (۱۶/۱ درصد)	۱ (۳/۲ درصد)
سگ‌های پناهگاه فاقد علائم تنفسی	۳۱	۵ (۱۶/۱ درصد)	۲ (۶/۴ درصد)
سگ‌های پناهگاه دارای علائم تنفسی	۳۱	۷ (۲۲/۵ درصد)	۱ (۳/۲ درصد)

جدول ۲. نتایج حاصل از کشت بر اساس سن، جنس و نژاد.

روش		نژاد		مجموع	جنس		مجموع	سن		مجموع
		کوچک	بزرگ		نر	ماده		<۱۲ماه	=>۱۲ماه	
PCR	تعداد منفی	۲۵	۷۹	۱۰۴	۷۸	۲۶	۱۰۴	۵۷	۲۳	۸۰
	درصد منفی	۲۴/۰درصد	۷۶/۰ درصد	۱۰۰ درصد	۷۵/۰ درصد	۲۵/۰ درصد	۱۰۰ درصد	۷۱/۲ درصد	۲۸/۷ درصد	۱۰۰ درصد
	تعداد مثبت	۴	۱۶	۲۰	۱۲	۸	۲۰	۷	۶	۱۳
	درصد مثبت	۲۰/۰ درصد	۸۰/۰ درصد	۱۰۰ درصد	۶۰/۰ درصد	۴۰/۰ درصد	۱۰۰ درصد	۵۳/۸ درصد	۴۶/۲ درصد	۱۰۰ درصد
	تعداد مجموع	۲۹	۹۵	۱۲۴	۹۰	۳۴	۱۲۴	۶۴	۲۹	۹۳
	درصد مجموع	۲۳/۴ درصد	۷۶/۶ درصد	۱۰۰ درصد	۷۲/۶ درصد	۲۷/۴ درصد	۱۰۰ درصد	۶۸/۸ درصد	۳۱/۲ درصد	۱۰۰ درصد
		نژاد		مجموع	جنس		مجموع	سن		مجموع
		کوچک	بزرگ		نر	ماده		<۱۲ماه	=>۱۲ماه	
کشت	تعداد منفی	۲۹	۹۱	۱۲۰	۸۷	۳۳	۱۲۰	۶۳	۲۷	۹۰
	درصد منفی	۲۴/۲ درصد	۷۵/۸ درصد	۱۰۰ درصد	۷۵/۵ درصد	۲۷/۵ درصد	۱۰۰ درصد	۷۰/۰ درصد	۳۰/۰ درصد	۱۰۰ درصد
	تعداد مثبت	۰	۴	۴	۳	۱	۴	۱	۲	۳
	درصد مثبت	۰/۰ درصد	۱۰۰ درصد	۱۰۰ درصد	۷۵/۰ درصد	۲۵/۰ درصد	۱۰۰ درصد	۳۳/۳ درصد	۶۶/۷ درصد	۱۰۰ درصد
	تعداد مجموع	۲۹	۹۵	۱۲۴	۹۰	۳۴	۱۲۴	۶۴	۲۹	۹۳
	درصد مجموع	۲۳/۴ درصد	۷۶/۶ درصد	۱۰۰ درصد	۷۲/۶ درصد	۲۷/۴ درصد	۱۰۰ درصد	۶۸/۸ درصد	۳۱/۲ درصد	۱۰۰ درصد



تصویر ۱. باندهای حاصل از تکثیر قطعه 316 bp، M: مارکر، PC: کنترل مثبت (*B. Bronchiseptica*,Rb 50, PTCC No:1025).



تصویر ۲. پرگنه‌های حاصل از کشت بردتلا برونشی سپتیکا بر روی محیط کشت شارکول-سفالکسین آگار (راست) و آگار خون (چپ).

بحث

بردتلا برونشی سپتیکا یک عامل بیماریزا در دستگاه تنفس بسیاری از حیوانات اهلی و وحشی به شمار می‌رود. آلودگی ناشی از این باکتری در افراد با نقص سیستم ایمنی و افرادی که در تماس نزدیک با حیوانات بوده‌اند گزارش شده است (۳،۱۱،۱۸). اگر چه تعداد زیادی از حیوانات اهلی و وحشی در انتقال بردتلا برونشی سپتیکا به انسان نقش دارند؛ انتقال آلودگی از حیوانات خانگی به انسان اهمیت ویژه‌ای دارد. با توجه به روند رو به رشد نگهداری از حیوانات خانگی در ایران و زئونوز بودن این باکتری، ارزیابی میزان آلودگی در سگ‌های خانگی و پناهگاه که در تماس مستقیم با انسان هستند می‌تواند بسیار با اهمیت باشد. در این مطالعه که برای اولین بار در ایران صورت گرفته است در مجموع از ۱۲۴ نمونه مورد بررسی به روش مولکولی، بیشترین میزان آلودگی به بردتلا برونشی سپتیکا در سگ‌های پناهگاه دارای علائم تنفسی (۲۲/۵ درصد) و کمترین میزان آلودگی در سگ‌های خانگی بدون علایم تنفسی (۹/۶ درصد) بود. درسگ‌های خانگی دارای علائم تنفسی و سگ‌های پناهگاه فاقد علائم تنفسی میزان آلودگی یکسان (۱۶/۱ درصد) بود.

مطالعات متعددی بر روی شیوع آلودگی بردتلا برونشی سپتیکا در کشورهای مختلف صورت گرفته است. میزان آلودگی گزارش شده به این باکتری در سگ‌هایی که در محیط‌های متراکم و در شرایط پر استرس مانند مراکز فروش،

پرورش و پناهگاه‌ها نگهداری می‌شوند و در تماس مستقیم با یکدیگر قرار دارند بیشتر بوده است. در مطالعه ای در کشور آمریکا بر روی ۶۵ قلاده سگ، این باکتری از ۴۹ درصد سگ‌های زیر ۱ سال جداسازی شده است. سگ‌های آلوده در این مطالعه عمدتاً از مراکز پرورش سگ (۴۱ درصد) و یا مراکز فروش حیوانات خانگی (۴۰ درصد) بوده و ۸ درصد آن‌ها مربوط به سگ‌های نگهداری شده در پناهگاه است(۱۶). در مطالعه دیگری که بر روی سگ‌های دو پناهگاه در کالیفرنیا انجام گرفته است، این باکتری از ۴۷ و ۲۳ درصد سگ‌های این دو پناهگاه به روش کشت جدا شد که تنها دو مورد از آن‌ها دارای علامت بالینی سرفه بودند (۸). در بررسی دیگری در انگلستان بر روی ۱۵۲ قلاده سگ پناهگاه، این باکتری از ۳۹ درصد سگ‌های بدون علایم تنفسی و ۵۲ درصد سگ‌های دارای علایم جدا شده است که در این میان بیشترین جداسازی با ۶۶ درصد مربوط به سگ‌های مبتلا به علایم تنفسی متوسط بوده است(۱). در پی آلودگی به بردتلا برونشی سپتیکا در سیستم ایمنی ذاتی میزبان اختلالاتی بوجود می‌آید که منجر به افزایش استعداد ابتلا به عفونت‌های باکتریایی و ویروسی دیگر خواهد شد. ایجاد و شدت علائم به عوامل مختلفی از جمله سویه باکتری، سطح ایمنی و آلودگی میزبان به عوامل بیماریزای همزمان ارتباط دارد. در مطالعه‌ی حاضر بیشترین میزان آلودگی به این باکتری در سگ‌های پناهگاه که به صورت متراکم نگهداری می‌شوند، و سگ‌های دارای علائم تنفسی (۲۲/۵ درصد) گزارش شده است. از آنجایی که درصد آلودگی در سگ‌های بدون علامت تنفسی ۱۲/۹ درصد بوده است آلودگی به این میکروارگانیسم الزاما با علایم بالینی همراه نمی باشد. همچنین بیشترین درصد آلودگی (۳۰ درصد) در سگ‌های دارای علایم تنفسی متوسط دیده شده است.

میزان آلودگی در سگ‌های خانگی به سبب تماس نزدیک با انسان نیز مورد توجه محققین بوده است. در ایران به جز یک مورد گزارش جداسازی بردتلا برونشی سپتیکا از ناحیه نای یک قلاده سگ تریر ۷ ساله مبتلا به کلاپس نای هیچ گونه گزارش و یا مطالعه ای در مورد آلودگی به این باکتری در سگ انجام نشده است. در مطالعه‌ای در ژاپن که بر روی ۶۸ قلاده سگ خانگی دارای علایم تنفسی انجام شد، آلودگی به بردتلا برونشی سپتیکا در ۷ قلاده سگ (۱۰/۳ درصد) گزارش شده است(۱۴). در مطالعه‌ی حاضر آلودگی به باکتری بردتلا برونشی سپتیکا در سگ‌های خانگی بدون علایم تنفسی و آن‌هایی که دارای علائم تنفسی بوده اند به ترتیب ۹/۶ درصد (۳/۳۱) و ۱۶/۱ درصد (۵/۳۱) بود. این باکتری به ندرت در افرادی که دارای فعالیت طبیعی سیستم ایمنی هستند باعث ایجاد بیماری می‌شود، در حالی که در سال‌های اخیر گزارشات مختلفی از بروز بیماری‌های تنفسی شدید در افراد مبتلا به اختلال سیستم ایمنی ناشی از این باکتری وجود دارد. بیشترین احتمال آلودگی در افرادی وجود دارد که به دلایل مختلف از جمله ابتلا به بیماری ایدز، بدخیمی‌های هماتولوژیک، درمان طولانی مدت با گلوکوکورتیکوئیدها، برداشت طحال و حاملگی مبتلا به ضعف سیستم ایمنی هستند. از این رو جداسازی باکتری بردتلا برونشی سپتیکا در مطالعه‌ی حاضر در سگ‌های خانگی که در تماس مستقیم با صاحبان خود قرار دارند می‌تواند از نظر بهداشتی بسیار با اهمیت باشد (۹). همچنین توصیه می‌گردد از تماس افراد گروه خطر حتی با سگ‌های بدون علایم نیز جلوگیری گردد.

پراکندگی وسیع باکتری و احتمال تماس قبلی با آن، تفسیر نتایج روش سرولوژی را پیچیده می‌کند، از این رو رایج ترین و دقیق ترین روش تشخیص آلودگی به بردتلا برونشی سپتیکا روش مولکولی و کشت می‌باشد. هر چند تعداد کم باکتری و زیست پذیری آن در نمونه‌ی جمع‌آوری شده، سابقه‌ی مصرف آنتی بیوتیک و چگونگی طراحی روش مولکولی می‌تواند منجر به نتایج منفی کاذب در آزمون مولکولی و کشت شود و حتی در مواردی ممکن است نتایج کشت و مولکولی همخوانی نداشته باشند به این صورت که نتیجه کشت مثبت باشد در حالی که نتیجه آزمایش مولکولی منفی گزارش شود و بالعکس. از این رو نمونه گیری از نواحی مختلف آناتومیک دستگاه تنفس و استفاده از روش‌های تشخیصی دیگر از جمله کشت در کنار روش مولکولی می‌تواند حساسیت تشخیص را افزایش دهد (۱۶). در مطالعه‌ی حاضر تعداد موارد مثبت با روش مولکولی، در تمامی گروه ها، در مقایسه با کشت بیشتر بوده ولی در تمام مواردی که باکتری به روش کشت جدا شده است، نتیجه حاصل از مولکولی نیز مثبت بوده است(جدول ۱). از ۱۲۴ نمونه‌ی مورد مطالعه ۱۶/۱۲ درصد (۲۰/۱۲۴) نمونه‌ها از نظر آلودگی با روش مولکولی مثبت تشخیص داده شدند، حال آنکه تعداد موارد مثبت گزارش شده به روش کشت ۳/۲۲ درصد (۴/۱۲۴) بود. بر مبنای نتایج حاصل میزان توافق دو روش مولکولی و کشت ضعیف (۲۹/۵ درصد) تلقی می‌شود. از این رو به نظر می‌رسد، استفاده از روش مولکولی در مقایسه با

کشت جهت تشخیص آلودگی به بردتلا برونشی سپتیکا مناسب‌تر باشد.

تا کنون مطالعات زیادی بر روی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های بردتلا برونشی سپتیکای جدا شده از سگ‌ها صورت گرفته است. در مطالعه‌ی حاضر سویه‌های جدا شده نسبت به تتراسایکلین، انروفلوکساسین، کوتریموکسازول و داکسی سایکلین دارای حساسیت بودند در حالی که در برابر آمپی سیلین و سفتریاکسون به ترتیب مقاوم بوده و حساسیت متوسط نشان دادند. در مطالعه Foley و همکاران در سال ۲۰۰۲، باکتری‌های جدا شده دارای مقاومت در برابر سفالوسپورین‌ها و آمپی‌سیلین بوده ولی در برابر کوآموکسی کلاو، کوتریموکسازول، تتراسایکلین و انروفلوکساسین مقاوم نبوده یا دارای مقاومت پایین بودند (۸). طبق نتایج حاصل از یک مطالعه بر روی ۷۸ جدایه‌ی بردتلابرونشی سپتیکای جدا شده از سگ، تمامی جدایه‌ها در برابر تتراساکلین، داکسی سایکلین، انروفلوکساسین و کوآموکسی کلاو دارای حساسیت بوده در حالی که ۸۱ درصد سویه‌ها نسبت به آمپی سیلین و سولفادیازین و ۷۳ درصد آن‌ها نسبت به تری متوپریم مقاومت داشتند(۱۵). بر اساس نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر و مطالعات دیگر، درمان آنتی بیوتیکی، در صورت اثبات آلودگی به بردتلا برونشی سپتیکا، در صورت امکان باید بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی انجام شود و در صورت عدم امکان و یا تا زمان دریافت نتایج حساسیت آنتی بیوتیکی، داکسی سایکلین، تتراسایکلین، انروفلوکساسین و یا کوتریموکسازول می‌تواند انتخاب مناسبی جهت درمان باشد.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان دهنده میزان آلودگی قابل توجه بردتلا برونشی سپتیکا در سگ‌های خانگی و سگ‌هایی است که به صورت متراکم در پناهگاه‌ها نگهداری می‌شوند، لذا توصیه می‌شود گروه‌های حساس و حتی حیوانات خانگی آن‌ها از تماس با سگ‌های پناهگاه که بار آلودگی بیشتری دارند، دوری کنند. از طرفی با توجه به روند رو به رشد نگهداری از حیوانات خانگی و زئونوتیک بودن بیماری، واکسیناسیون بالاخص در سگ‌های در تماس با افراد گروه‌های حساس و یا سگ‌هایی که به شکل متراکم نگهداری می‌شوند، به منظور جلوگیری از گسترش آلودگی می‌تواند در نظر گرفته شود. همچنین، آنتی بیوتیک‌های داکسی سایکلین، تتراسایکلین، انروفلوکساسین و یا کوتریموکسازول در موارد آلودگی به این باکتری، به عنوان خط اول درمان آنتی بیوتیکی، می‌توانند انتخاب مناسبی باشند.

سپاسگزاری

با تشکر از همکاران محترم بخش بیماری‌های داخلی دام‌های کوچک و همچنین گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که در انجام مراحل مختلف این مطالعه مارا یاری نمودند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Chalker, V.J., Toomey, C., Opperman, S., Brooks, H.W., Ibuoye, M.A., Brownlie, J., Rycroft, A.N. (2003). Respiratory disease in kenneled dogs: serological responses to *Bordetella bronchiseptic* lipopolysaccharide do not correlate with bacterial isolation or clinical respiratory symptoms. Clin Diagn Lab Immunol, 10, 352-356. https://doi.org/10.1128/cdli. 10.3.352-356.2003 PMID: 12738630
2. Decker, G.R., Llavelle, J.P., Kumar, P.N., Pierce, P.F. (1991). Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptic* in a patient with AIDS. Rev Infect Dis, 13, 1250-1251. https://doi.org/10.1093/clinids/13.6.1250 PMID: 1775865
3. Duquette, R.A., Nuttall, T.J. (2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem. J Sm Anim Pract, 45, 591-597. https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2004.tb00180.x PMID: 15600269
4. Ellis, J., Anseeuw, E., Gow, S., Bryan, H., Salb, A., Goji, N., Rhodes, C., Coste, S., Judit Smits, Kutz, S. (2011). Seroepidemiology of respiratory (group 2) canine coronavirus, canine parainfluenza virus, and *Bordetella bronchiseptica* infections in urban dogs in a human shelter and in rural dogs in small communities. Can Vet J, 52, 861–868.
5. Ellis, J. (2015). How well do vaccines for *Bordetella bronchiseptica* work in dogs? A critical review of the literature 1977–2014. Vet J, 204, 5–16. https://doi.org/ 10.1016/j.tvjl.2015.02.006
6. Englund, L., Jacobs, A. A., Klingeborn, B., Chriél, M. (2003). Seroepidemiological survey of *Bordetella*

bronchiseptica and canine parainfluenza-2 virus in dogs in Sweden. Vet Rec, 152(9), 251-4.
7. Ferry, N. S. (1910). A preliminary report of the bacterial findings in canine distemper. Am Vet Rev, 37, 499–504.
8. Foley, J. E., Rand, C., Bannasch, M. J., Norris, C.R., Milan, J. (2002). Molecular epidemiology of feline bordetellosis in two animal shelters in California, USA, Prev Vet Med, 54(2),141-56.
9. Ford, R.B. (2006). Canine infectious tracheobronchitis. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat. Greene, C.E. (ed.). (3rd ed.) Saunders, Philadelphia, PA, USA. p. 54–61.
10. Goodnow, R. A. (1980). Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol Rev, 44, 722–738.
11. Kaplan, J.E., Sepkowitz, K., Masur, H., Sirisanthana, T., Russo, M., Chapman, L. (2001). Opportunistic infections in persons with HIV or other immunocompromising conditions. Emerg Infect Dis, 7(Suppl), 541. https://doi.org/10.3201/eid0707. 017720 PMID: 11485658
12. Mattoo, S., Cherry, J. D. (2005). Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. Clin Microbiol Rev, 18(2), 326-82. https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.326-382.2005 PMID: 15831828
13. M'Gowan, J.P. (1911). Some observations on a laboratory epidemic, principally among dogs and cats in which the animals affected presented the symptoms of the disease called 'distemper'. J Pathol Bacteriol, 15, 372-426. https://doi.org/10.1002/path.1700150311
14. Mochizuki, M., Yachi, A., Ohshima, T., Ohuchi, A., Ishida, T. (2008). Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs. J Vet Med Sci, 70(6), 563-9.
15. Speakman, A. J., Dawson, S., Corkill, J. E., Binns, S.H., Hart, C.A., Gaskell, R.M. (2000). Antibiotic susceptibility of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates. Vet Microbiol, 71, 193-200. https://doi.org/10.1016/s0378-1135(99)00171-6 PMID: 10703703
16. Sykes, J.E. (2013). Bordetellosis. In: Canine and Feline Infectious Diseases. Sykes, J.E. (ed.). (1st ed.) Elsevier, St Louis. p. 372-378.
17. Tizolova, A., Brun, D., Guiso, N., Guillot, S. (2014). Development of real-time PCR assay for differential detection of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. Diagno Microbiol Infect Dis, 78(4), 347-51.
18. Wise, J.K., Yang, J.J. (1992). Veterinary service market for companion animals. Companion animal ownership and demographics. J Am Vet Med Assoc, 201, 990-992.
19. Woolfrey, B. F., Moody, J. A. (1991). Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. American Society for Microbiology, 3(4), 243-255.
20. Wright, N.G., Thompson, H., Taylor, D., Cornwell, H.J.C. (1973). *Bordetella bronchiseptica*: A re-assessment of its role in canine respiratory disease. Vet Rec, 9, 486–487.
21. Yacoub, A. T., Katayama, M., Tran, J., Zadikany, R., Kandula, M., Greene, J. (2014). *Bordetella Bronchiseptic*a in the immunosuppressed population – A case series and review. Mediterr J Hematol Infect Dis, 6(1), e2014031. https://doi.org/10.4084/MJHID.2014.031

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 75, Number 1, 2020
Original Article

Detection of *Bordetella bronchiseptica* in Oropharynx Region of Pet and Kenneled Dogs by PCR and Culture and Evaluation of Antibiotic Susceptibility of the Isolates

Fereshteh Afi[1], Shahram Jamshidi[1], Saied Bokaie[2], Bahar Nayeri Fasayi[3], Iraj Ashrafi Tamay[3], Moein Delrobaei[1], Taghi Zahraei Salehi[3]

[1]*Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2]*Department of Food Hygiene and Quality Control, Epidemiology & Zoonoses Division of Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

10.22059/jvr.2017.234565.2639
Received 28 September 2019, Accepted 18 December 2019

Abstract

BACKGROUND: *Bordetella bronchiseptica* is a gram negative pathogen of the respiratory tract in dogs, pigs, cats, horses, laboratory animals and human beings.

OBJECTIVES: The goal of this study was detection of *Bordetella bronchiseptica* in oropharynx region of pet and kenneled dogs by PCR and culture and evaluation of antibiotic susceptibility of the isolates in Iran.

METHODS: The samples were collected by sterile swabs from oropharynx region of 62 pet dogs (including 31 dogs with clinical respiratory disease signs and 31 dogs without clinical respiratory disease signs) and 62 kenneled dogs (including 31 dogs with clinical respiratory disease signs and 31 dogs without clinical respiratory disease signs). *Bordetella bronchiseptica* was detected by PCR and culture and antibiotic susceptibility of the isolates were evaluated.

RESULTS: Based on the PCR results, *Bordetella bronchiseptica* was detected in 16.1% of pet dogs with clinical respiratory disease signs, 9.6% of pet dogs without clinical respiratory disease signs, 22.5% of kenneled dogs with clinical respiratory disease signs and 16.1% of kenneled dogs without clinical respiratory disease signs. On bacterial culture, *Bordetella bronchiseptica* was isolated from 3.2% pet dogs with clinical respiratory disease signs, 3.2% kenneled dogs with clinical respiratory disease signs and 6.4% kenneled dogs without clinical respiratory disease signs, none of the pet dogs without clinical respiratory disease signs was positive on bacterial culture. The isolates tested by the agar dilution method were susceptible to tetracycline, enrofloxacin, co-trimoxazole and doxycycline, moderately susceptible to ceftriaxone and resistant to ampicillin.

CONCLUSIONS: This study has shown the high prevalence of *Bordetella bronchiseptica* infection in dogs in Iran. *Bordetella bronchiseptica* can infect the people who have contact with the affected pet dogs and those kept in overcrowded shelters.

Keywords: *Bordetella bronchiseptica*, Dog, Culture, PCR, Antimicrobial susceptibility

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: shjamshidi@ut.ac.ir Tel/Fax: 021-61117000, 021-66933222

How to cite this article:

Afi, F., Jamshidi, S., Bokaie, S., Nayeri Fasayi, B., Ashrafi Tamay, I., Delrobaei, M., Zahraei Salehi, T. (2020). Detection of *Bordetella bronchiseptica* in Oropharynx Region of Pet and Kenneled Dogs by PCR and Culture and Evaluation of Antibiotic Susceptibility of the Isolates, J Vet Res, 75(1), 90-97. https://doi.org/10.22059/jvr.2017.234565.2639

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Culture and PCR results.
Table 2. Culture results based on age, gender and breed.
Figure 1. Amplification of a 316 bp segment of *B.bronchiseptica* DNA, PC: positive control, M: molecular weight marker (*B. Bronchiseptica,Rb 50*, PTCC No:1025).
Figure 2. *Bordetella bronchiseptica* colonies on charcoal-cephalexin agar (right) and blood agar (left).