



## 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<sup>۱</sup>، شهرام جمشیدی<sup>۱</sup>، سعید بکائی<sup>۲</sup>، بهار نیری فسایی<sup>۳</sup>، ایرج اشرافی تمای<sup>۳</sup>، معین دلربائی<sup>۱</sup>، تقی زهرایی صالحی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران  
<sup>۲</sup>گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران  
<sup>۳</sup>گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

doi [10.22059/jvr.2018.241840.2639](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.241840.2639)

تاریخ دریافت: ۶ مهر ماه ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۲۷ آذر ماه ۱۳۹۸

### چکیده

**زمینه 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.

**روش کار:** 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 بردتلا برونشی سپتیکا بررسی شد و حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های جداسازی شده مورد مطالعه قرار گرفت.

**نتایج:** بر طبق نتایج مولکولی، ۱۶/۱ درصد سگ‌های خانگی دارای علائم تنفسی، ۹/۶ درصد سگ‌های خانگی فاقد علائم 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 علائم 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 علائم 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](mailto:shjamshidi@ut.ac.ir)

### مقدمه

مطالعه‌ای بر روی سگ‌های مبتلا به دیستمبر جداسازی شد و نقش آن به عنوان عامل بیماری‌زا در دستگاه تنفس سگ‌ها برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ مورد توجه قرار گرفت (۲۰، ۱۲، ۱۰، ۷). بردتلا برونشی سپتیکا از عوامل مشارکت کننده در کمپلکس بیماری تنفسی سگ سانان می‌باشد (۱۳، ۹). این باکتری دارای

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 مؤکدار دستگاه تنفس می‌تواند منجر به بروز بیماری التهابی این ناحیه شود (۵). این باکتری اولین بار در دهه اول قرن بیستم طی

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 علائم تنفسی، ۲. علائم تنفسی خفیف (سرفه خفیف)، ۳. علائم تنفسی متوسط (سرفه خفیف به همراه ترشحات بینی)، ۴. علائم تنفسی شدید (سرفه، وجود ترشحات غیر طبیعی بینی، بی حالی، بی اشتهاپی و یا علائم 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 از قرار گیری در

دمای محیط، به مدت یک دقیقه ورتکس شدند. بعد از حذف سواب‌ها، 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 تجاری MBST و طبق دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده استخراج DNA انجام گرفت. نمونه کشت باکتریایی استاندارد بردتلا برونشی سپتیکا Rb50 به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. جهت تکثیر قطعه 316 bp از پرایمرهای B13615F، 5'-ATCGCTGGGATTACCCCTAC-3' و B13930R، 5'-TACTTGAGCGGTTCTGAAGGT-3' استفاده شد. ترکیب واکنش PCR به این صورت تهیه شد: PCR Master

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 الیزا 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 در این مطالعه از لحاظ علائم تنفسی در هنگام معاینه بالینی و

و در سگ‌های دارای علائم ۱۹/۳ درصد بدست آمد که این تفاوت نیز از نظر آماری معنی دار نبود ( $P>0/05$ ). بیشترین درصد آلودگی (۳۰ درصد) مربوط به سگ‌های دارای علائم تنفسی متوسط بود. میزان آلودگی در سگ‌های مبتلا به علائم تنفسی خفیف و شدید به ترتیب ۱۲/۱۲ و ۲۲/۹ درصد بود. بر اساس بررسی آماری انجام شده رابطه معنی داری بین شدت علائم تنفسی و درصد آلودگی به بردتلا برونشی سپتیکا در روش مولکولی وجود نداشت ( $P>0/05$ ) (تصویر ۱).

بر طبق نتایج حاصل از کشت، بردتلا برونشی سپتیکا از ۳/۲۲ درصد نمونه‌ها شامل ۳/۲ درصد سگ‌های خانگی دارای علائم تنفسی، ۳/۲ درصد سگ‌های پناهگاه دارای علائم تنفسی و ۶/۴ درصد سگ‌های پناهگاه بدون علائم تنفسی جدا شد. در هیچ یک از سگ‌های خانگی بدون علائم تنفسی باکتری با استفاده از کشت جدا نگردید (جدول ۱). تفاوت درصد جداسازی باکتری در این گروه‌ها از نظر آماری معنی دار نبود ( $P>0/05$ ). میزان آلودگی در سگ‌های بدون علائم تنفسی و در سگ‌های دارای علائم تنفسی برابر بود. این باکتری از ۱۰ درصد سگ‌های دارای علائم تنفسی متوسط جدا شد در حالی که از هیچ یک از سگ‌های مبتلا به علائم تنفسی خفیف و شدید جدا نگردید. رابطه معنی داری بین درصد جداسازی باکتری به روش کشت و شدت علائم تنفسی وجود نداشت ( $P>0/05$ ) (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.

بر اساس یافته‌های حاصل از بررسی آماری میزان آلودگی به بردتلا برونشی سپتیکا در دو روش کشت مولکولی و رابطه‌ای با سن، جنس و نژاد ندارد ( $P>0/05$ ) (جدول ۲).

mix به میزان ۴۵ میکرو لیتر، ۰/۵ میکرو لیتر از هر پرایمر (۵۰ پیکو مول/میکرو لیتر) و به میزان ۴ میکرو لیتر 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 داکيومنت صورت پذیرفت. نمونه کنترل مثبت مورد استفاده بردتلا برونشی سپتیکا (PTCC No. Rb50) (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  $\alpha=0/05$  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 علائم تنفسی بود. میزان آلودگی در هر دو گروه سگ‌های پناهگاه بدون علائم تنفسی و سگ‌های خانگی واجد علائم تنفسی ۱۶/۱ درصد بود. تفاوت درصد آلودگی در چهار گروه نام برده از نظر آماری معنی دار نبود ( $P>0/05$ ). همچنین آلودگی در سگ‌های بدون علائم تنفسی ۱۲/۹ درصد

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		<12 ماه	>=12 ماه		
PCR	تعداد منفی	۲۵	۷۹	۱۰۴	۷۸	۲۶	۵۷	۲۳	۸۰	
	درصد منفی	۲۴/۰ درصد	۷۶/۰ درصد	۱۰۰ درصد	۷۵/۰ درصد	۲۵/۰ درصد	۷۱/۲ درصد	۲۸/۷ درصد	۱۰۰ درصد	
	تعداد مثبت	۴	۱۶	۲۰	۱۲	۸	۲۰	۷	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	
	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
کشت	تعداد منفی	۲۹	۹۱	۱۲۰	۸۷	۳۳	۶۳	۲۷	۹۰	
	درصد منفی	۲۴/۲ درصد	۷۵/۸ درصد	۱۰۰ درصد	۷۵/۵ درصد	۲۷/۵ درصد	۷۰/۰ درصد	۳۰/۰ درصد	۱۰۰ درصد	
	تعداد مثبت	۰	۴	۴	۳	۱	۴	۱	۳	
	درصد مثبت	۰/۰ درصد	۱۰۰ درصد	۱۰۰ درصد	۷۵/۰ درصد	۲۵/۰ درصد	۱۰۰ درصد	۳۳/۳ درصد	۶۶/۷ 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

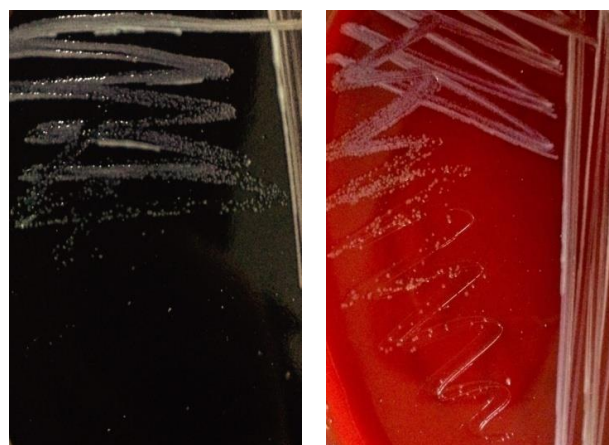
### بحث

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 علائم تنفسی (۹/۶ درصد) بود. در سگ‌های 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،



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).

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 علائم 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 گروه‌ها، 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

پرورش و پناهگاه‌ها نگهداری می‌شوند و در تماس مستقیم با یکدیگر قرار دارند بیشتر بوده است. در مطالعه‌ی 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 علائم تنفسی و ۵۲ درصد سگ‌های دارای علائم جدا شده است که در این میان بیشترین جداسازی با ۶۶ درصد مربوط به سگ‌های مبتلا به علائم 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 سوبه 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 الزاماً با علائم بالینی همراه نمی‌باشد. همچنین بیشترین درصد آلودگی (۳۰ درصد) در سگ‌های دارای علائم 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 مطالعه‌ی در مورد آلودگی به این باکتری در سگ انجام نشده است. در مطالعه‌ی در ژاپن که بر روی ۶۸ قلاده سگ خانگی دارای علائم 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 علائم تنفسی و



بیوتیکی، داکسی سایکلین، تتراسایکلین، انروفلوکسازین 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، انروفلوکسازین 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 ما را یاری نمودند.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

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 مطالعه حاضر سویه‌های جدا شده نسبت به تتراسایکلین، انروفلوکسازین، 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 آمپی سیلین بوده ولی در برابر کوآموکسی کلاو، کوتریموکسازول، تتراسایکلین و انروفلوکسازین مقاوم نبوده یا دارای مقاومت پایین بودند (۸). طبق نتایج حاصل از یک مطالعه بر روی ۷۸ جدایه‌ی بردتلا برونشی سپتیکای جدا شده از سگ، تمامی جدایه‌ها در برابر تتراساکلین، داکسی سایکلین، انروفلوکسازین 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 مطالعه 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

## References

- Chalker, V.J., Toomey, C., Opperman, S., Brooks, H.W., Ibuoye, M.A., Brownlie, J., Rycroft, A.N. (2003). Respiratory disease in kennel dogs: serological responses to *Bordetella bronchiseptica* 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
- Decker, G.R., Llavell, J.P., Kumar, P.N., Pierce, P.F. (1991). Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with AIDS. *Rev Infect Dis*, 13, 1250-1251. <https://doi.org/10.1093/clinids/13.6.1250> PMID: 1775865
- 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
- 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.
- 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>
- 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.). (3<sup>rd</sup> 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](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.). (1<sup>st</sup> 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*. *Diagn 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 Bronchiseptica* 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>



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

Fereshteh Afi<sup>1</sup>, **Shahram Jamshidi**<sup>1</sup>, Saied Bokaie<sup>2</sup>, Bahar Nayeri Fasayi<sup>3</sup>, Iraj Ashrafi Tamay<sup>3</sup>, Moein Delrobaei<sup>1</sup>, Taghi Zahraei Salehi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department of Food Hygiene and Quality Control, Epidemiology & Zoonoses Division of Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

doi [10.22059/jvr.2018.241840.2639](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.241840.2639)

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 Keneled 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).