

بررسی فلور میکروبی چشم و ناحیه ی تحتانی پلک در سگ های سالم و دارای اپیفورا به روش کشت و PCR

مرتضی رزاقی منش^{۱*}، عرفان دیانی^۲، علیرضا سلمانی^۳، ماهان یغمایی^۳

۱- گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر ایران

۲- دانش آموخته عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

۳- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

*نویسنده مسئول: Morteza_vet@yahoo.com

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی فلور چشم و ناحیه ی تحتانی چشم در سگ های سالم و مبتلا به اپیفورا انجام شد. برای جمع آوری نمونه جهت کشت میکروبی و قارچی، از دومیکروسواب استریل استفاده شد. تمام نمونه های میکروسواب در PBS یعنی سالین بافر فسفات برای کشت به آزمایشگاه منتقل شدند. برای هر دو گوش از پلک بلافاصله به همراه دو مک کانکی استفاده شد. یک صفحه SDA یعنی سابورد کستروز آگار به کشت قارچ برای هر گوش اعمال شد. برای قراردادن ارگانیسم های جدا شده، چند آزمایش استاندارد بیوشیمیایی انجام شد. به طور خلاصه، در مطالعه حاضر فلور باکتریایی و قارچی چشم و زیر چشم در موارد اپیفورا بررسی شد. در نمونه های چشم با اپیفورا، قارچ های مختلف شامل *Aspergillus niger*، *Pichia*، *Chatomium*، *Aspergillus fumigatus*، *Candida*، *Fusarium* و *Aspergillus brasiliensis* با فراوانی های متفاوت شناسایی شدند. در نمونه های چشم نرمال، *Aspergillus niger* و *Candida* شناسایی شدند، اما سایر قارچ ها حضور نداشتند. در نمونه های پوست نرمال، *Aspergillus fumigatus* در دو نمونه شناسایی شد، در حالی که سایر قارچ ها یافت نشدند. در نمونه های پوست با اپیفورا، مشابه نمونه های چشم با اپیفورا، قارچ های مختلف شامل *Aspergillus*، *Pichia*، *Chatomium*، *Aspergillus niger*، *Aspergillus fumigatus*، *Candida* و *Fusarium* با فراوانی های متفاوت شناسایی شدند. در نمونه های چشم نرمال، گونه های باکتریایی مانند *S. intermedius* و *S. epidermidis* در تمام نمونه ها شناسایی شدند، در حالی که گونه های دیگر با فراوانی های متفاوت یافت شدند. در نمونه های چشم با اپیفورا، مشابه نمونه های چشم نرمال، *S. intermedius* و *S. epidermidis* در تمام نمونه ها شناسایی شدند، اما گونه های دیگر با فراوانی های متفاوت حاضر بودند، شامل *Micrococcus*، *Strep. agalactiae*، *Strep. canis*، *S. xylosus*، *S. cohnii*، *S. auricularis*، *Coryne. aquaticum*، *Coryne. xerosis* و *Coryne. aquaticum nishiomiae* در نمونه های پوست نرمال، *S.*

S. epidermidis و *intermedius* در بیشتر نمونه‌ها با فراوانی‌های متفاوت شناسایی شدند، در حالی که گونه‌های دیگر گزارش نشدند. در کل، این یافته‌ها نشترکیبات میکروبی بین نمونه‌های چشم با اپیفورا و چشم نرمال، و همچنین بین نمونه‌های پوست با اپیفورا و پوست نرمال تفاوت‌های قابل توجهی وجود دارد. برای درک پیامدهای این تغییرات میکروبی و نقش آنها در سلامت چشم سگ‌ها، نیاز به تحقیقات بیشتر است .

واژگان کلیدی : اپیفورا، فلور باکتریایی، فلور قارچی، کانژکتیوا، پلک

مقدمه

فلور نرمال چشم و ناحیه ی پری اوکولار (شامل ناحیه ی تحتانی پلک پایین از فورنیکس داخلی تا خارجی در این مطالعه) شامل مجموعه باکتری و قارچ هایی است که به صورت هم زیست و بدون ایجاد آسیب در این ناحیه موجودند. به طور کلی فلور نرمال باکتریایی چشم در سگ ها گونه های مختلف استافیلوکوکوس، استرپتوکوکوس، کورینه باکتریوم، مواردی از سودوموناس در نظر گرفته می شود همچنین فلور نرمال قارچی چشم در مطالعات پیشین به شکل اسپرژیلوس کلادوسپوریوم و پنسیلیوم گزارش شده است (۴). اگر چه مطالعات کمی به بررسی هم زمان فلور میکروبی چشم و ناحیه ی پری اوکولار پرداخته اند، همیشه فلور و همچنین بار میکروبی این دو ناحیه به هم مرتبط و با هم در تعامل بوده اند و تغییرات هر کدام از آن ها بر تغییر دیگری اثر گذار می باشد. اپی فورا یا اشک ریزش به علل مختلفی اتفاق می افتد. این امر میتواند ناشی از تحریک چشم منجر به ساخته شدن زیاد از حد اشک یا ناتوانی سگ در تخلیه ی مناسب اشک باشد. به طور کلی اشک تولید شده از مجرای اشکی بینی به بینی و گلو تخلیه می گردد. اپیفورامی تواند علاوه بر تحریک زیاد چشم به علت هر نوع ناهنجاری در این مسیر باشد (۳). عواملی مثل کانژکتویت، عفونت های چشمی، در معرض محرک هایی مثل گرد و غبار بودن، کوچک بودن انسداد یا التهاب مجرای اشکی بینی، الرژی و ناهنجاری های مژه و پلک مثل مژه ی نا به جا، برگشتگی پلک به داخل از جمله مواردی است

که منجر به این عارضه میگردد. میزان رطوبت چشم و ناحیه ی اطراف چشم میتواند بر نوع فلور میکروبی این نواحی اثر گذار باشد. تغییرات رطوبت محیط در زمان کاهش معمولاً منجر به افزایش بار میکروبی باکتریایی و در زمان افزایش منجر به غالب شدن بار میکروبی قارچی میشود (۵). در سگ های دارای اپیفورا ایجاد درماتیت زیر چشم معمول است و به طور غالب این درماتیت قارچی میباشد. در این مطالعه به بررسی هم زمان فلور میکروبی چشم و ناحیه ی تحتانی پلک پایین از فورنیکس داخلی تا فورنیکس خارجی در دو گروه از سگ های مبتلا به اپیفورا و سگ های سالم می پردازیم. در این تحقیق، با استفاده از روش PCR، تشخیص جنس مایکوپلاسما در آلودگی های فرآورده های بیولوژیک صورت گرفته است (۶). در تحقیق دیگری، برای تشخیص گونه مایکوپلاسما گالیسپتیکوم در نمونه های بالینی از روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ۱۶S rRNA استفاده شده است. همچنین، در تحقیق دیگری نیز برای تشخیص گونه مایکوپلاسما سینوویه در نمونه های بالینی از روش VlhA-PCR استفاده شده است (۲). ویتلی و همکاران در سال ۲۰۰۰، مطالعه ای درباره عفونت های چشم سگ انجام دادند. در این مطالعه، باکتری های گرم منفی به عنوان عامل اصلی در نظر گرفته شد (۱). سرچاهی و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵، بر روی انتی بیوگرام جدایه های چشمی در سگ تحقیق کردند و در این مطالعه، اثر بیشتری را برای اکسی تتراسایکلین مشاهده

کردند(۶). پرادو و همکاران در سال ۲۰۰۵،

میکروارگانسیم‌های جدا شده از چشم سگ‌های نرمال و دارای کراتیت اولسراتیو را بررسی کردند. نتایج نشان دادند که بار میکروبی چشم در سگ‌های دارای کراتیت اولسراتیو بیشتر از سگ‌های دیگر است. کودیرکین و همکاران در سال ۲۰۰۶، به بررسی فلور چشم سگ‌ها پرداختند(۱۳). در این مطالعه، ۴۶ سگ مورد بررسی قرار گرفتند و فلور نرمال باکتریایی چشم آن‌ها گونه‌های استافیلوکوک را نشان داد. همچنین، داشتن علایم کانژانکتویت با الودگی به سودوموناس همراه بود(۱۲).

گراندون و همکاران در سال ۲۰۱۰، در یک گزارش به کراتومایکوز در سگ‌های دارای اپیفورا پرداختند که با استفاده از واریکومازول درمان شد. سبولد و همکاران نیز در سال ۲۰۱۹، به بررسی علل اپیفورا در پودل‌ها پرداختند(۱۹). ومویل و همکاران در سال ۲۰۱۴، فلور قارچی چشم سگ‌ها را بررسی کردند و جدایه‌هایی مانند التراریا، کلادوسپورییدیوم، پنسیلیوم و اسپرژیلوس را از چشم این سگ‌ها جدا کردند (۱۰).

معاینه اولیه

۲۵ قلابه سگ سالم فاقد اپیفورا و ۲۵ قلابه سگ دارای تشخیص اپیفورا در مطالعه بررسی شد در مجموع ۵۰ چشم سالم و ۵۰ چشم دارای اپیفورا بررسی شد. سن جنس نژاد سگ‌های مورد بررسی ثبت و علت ایجاد اپیفورا به تشخیص دامپزشک متخصص بیماری‌های داخلی دام‌های کوچک بررسی و ثبت شد(۱۵). ایندور و یا اوت دور بودن حیوان و شرایط نگهداری و تاریخچه‌ی بیماری‌های چشم ثبت شد. هیچ یک از حیوانات مورد بررسی دارای بیماری زمینه‌ای عمومی نبود. دو میکرو سواب از هر چشم و دو میکرو سواب از هر ناحیه‌ی تحتانی پلک پایین از فورنیکس داخلی تا فورنیکس خارجی به تفکیک برای کشت باکتری و قارچ گرفته شد دو میکرو سواب استریل برای جمع‌آوری نمونه‌ها برای کشت‌های باکتریایی و قارچی استفاده شد(۱۳).

روش کار

DNA باکتریایی از نمونه‌های سواب با استفاده از کیت QIAamp DNA Mini Kit (شرکت Qiagen Inc)، و لنسیا، کالیفرنیا، آمریکا) با رعایت دستورالعمل تولید کننده برای باکتری‌ها از سواب چشمی استخراج شد. DNA استخراج شده در محلول الونشن موجود الوته شد و تا زمان تحلیل بیشتر در دمای 20°C - نگهداری شد (۱۵).

برای تشخیص حضور مایکوپلاسما، یک پروتکل PCR خانواده-ویژه استفاده شد که طبق روش توصیف شده توسط Lauerman (1998a)، b) بود. واکنش PCR از الیافی استفاده کرد که در ژاپن توسعه یافته بودند (Harasawa et al., 1986): JGMF (5'- ACACCATGGGAGCTGGTAAT-3') و JGMR (5'- CCTCATCGACTTT CAGACCCAAGGCAT-3'). واکنش PCR شامل ۴۰ چرخه بود، هر چرخه شامل تعمیم در 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، تشکیل در 55°C به مدت ۳۰ ثانیه و تمدید در 72°C به مدت ۶۰ ثانیه بود. تمدید نهایی در 72°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد (۱۷).

برای تشخیص کلامیدیا، روش PCR مضاعفی با هدف دامنه‌های متغیر ۳ و ۴ ژن omp1 کلامیدیا، طبق روش توصیف شده توسط Kaltenboeck (۱۹۹۸) به کار گرفته شد. واکنش PCR در دو واکنش جداگانه انجام شد: PRIM (اولین واکنش) و SEC (واکنش داخلی،

مضاعف). در واکنش PRIM، از پرایمرهای زیر استفاده

شد: CHOMP (5'-۱۹۱ GCITYTITGGGARTGYGGITGYGCIAC CHOMP37 (5'-TAGAAICKGAA و -3') TTGIGCRTTIAYGTGIGCIGC3') واکنش

PCR شامل تعمیم اولیه در 96°C به مدت ۱۰ دقیقه، پس از آن ۵۰ چرخه تعمیم در 96°C به مدت ۱ ثانیه، تشکیل در 46°C به مدت ۱ دقیقه و تمدید در 72°C به مدت ۱

دقیقه بود. برای واکنش SEC، از پرایمرهای زیر استفاده

شد: CHOMP (5'-۲۰۱ GGIGCWGMITTCCAATAYGCI CARTC-3') و CHOMP336 (5'- CAAMGTTTCTGGAYTTMAWYTTGTT -3'). واکنش PCR شامل ۳۵ چرخه بود که در آن تعمیم در 96°C به مدت ۱ ثانیه، تشکیل در 46°C به مدت ۱ دقیقه و تمدید در 72°C به مدت ۱ دقیقه انجام شد.

الکتروفورز و تجزیه و تحلیل:

برای مشاهده محصولات PCR، مقادیری از DNA تقویت شده به وسیله الکتروفورز در ژل آگاروز ۱.۵٪ (وزن به حجم) تجزیه و تحلیل شدند. پس از الکتروفورز، ژل‌ها با برومید اتیدیوم رنگ شدند و باندهای DNA با استفاده از تشعشع فرابنفش قابل مشاهده شدند. در طول فرآیند، احتیاط‌های استاندارد برای جلوگیری از آلودگی متقابل آمپلیکون رعایت شد (۱۸).

برای انجام نمونه‌برداری میکروبیولوژیک، دو میکرو سواب استریل برای جمع‌آوری نمونه‌ها برای کشت‌های

باکتریایی و قارچی استفاده شد. تمام قطعات میکرو سواب در PBS یعنی سالین بافر فسفات برای کشت به آزمایشگاه منتقل شدند. برای هر چشم، دو پلیت مدیا آگار خون و دو مک کانکی استفاده شد. نمونه برداری از هر چشم به طور جداگانه به وسیله ی میکروسواب استریل صورت گرفت. برای کشت قارچ برای هر چشم از یک صفحه سابورو دکستروز آگار (SDA) استفاده شد. کشت ها پس از ۲۴ ساعت از نظر باکتری مورد بررسی قرار گرفتند و سایر کشت های جدا شده انکوبه شدند. برای قرار دادن ارگانیزم های جدا شده، آزمایش های استاندارد بیوشیمیایی انجام شد. پس از نمونه برداری و انتقال نمونه ها کمتر از ۲ ساعت در کول باکس، آن ها در کنار شعله و با رعایت تمام نکات کشت در محیط های Mac conkey agar, blood agar و محیط غنی کننده Thioglycolate broth جهت رشد باکتری های سخت رشد و پر نیاز و همچنین باکتری های بی هوازی و در نهایت محیط کشت قارچی سابورو دکستروز آگار (SDA) به طور جداگانه انجام شد. محیط ها برای رشد پرگنه و انجام آزمایش های تکمیلی جهت تعیین گونه های مختلف باکتریایی و قارچی به انکوباتور انتقال داده شد. در آزمایشگاه پلیت های بلا آگار و مک کانکی آگار به مدت ۴۸ ساعت در اتمسفر ۵٪ CO₂ در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. محیط تایوگلیکولات نیز هر روز جهت مشاهده رشد باکتری ها مورد بررسی قرار گرفت و در صورت منفی بودن تا ۵ روز نگهداری شد. محیط سابورو دکستروز آگار نیز در دمای ۳۵-۳۷ درجه

سانتیگراد در داخل انکوباتور قرار داده شد. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون کلونی قارچی رشد یافته جهت تشخیص مورد مشاهده مورفولوژی کلنی و تست اسلاید کالچر قرار گرفت. محیط کشت سابورو دکستروز آگار طبق دستورالعمل آماده و درون پلیت های محیط کشت تقسیم گردید. سپس جهت انجام آزمایش بعد از بسته شدن محیط کشت با استفاده از اسکالپل استریل مقداری از محیط کشت را به ابعاد یک سانتی متر بریده و با رعایت نکات استریل روی لام شیشه ای استریل درون پلیت شیشه ای قرار دادیم. بعد از اینکه آگار در مرکز لام قرار گرفت آن را روی لوله "یو" شکل که درون یک پلیت شیشه ای بزرگ است بصورت افقی قرار دادیم. بعد با استفاده از آنس استریل، هر یک از قارچ های رشد کرده در محیط سابورو دکستروز آگار در ۴ نقطه از محیط روی لام تلقیح شد. سپس یک لامل برداشته و آنرا با یک پنس گرفته و داخل ظرف الکل فرو کرده، بعد از چکیدن تمام الکل از روی آن، یک بار با سرعت لامل از میان شعله عبور داده شد تا باقیمانده الکل بسوزد و استریل سازی لامل کامل گردد. سپس لامل سترون شده روی قطعه آگار تلقیح شده قرار گرفت. برای جلوگیری از خشک شدن قطعات آگار در طول مدت انکوباسیون حدود ۱۰ سی سی آب مقطر استریل را در داخل پلیت ریخته شد و دقت شد تا آب روی قطعه آگار یا لام و لامل نریزد و درب پلیت را بسته شد. پلیت ها یک هفته در دمای اتاق قرار گرفت. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون کلنی های باکتریایی رشد یافته به روش گرم رنگ آمیزی شدند و براساس مورفولوژی

انجام تستهای تفریقی شامل TSI، تولید ایندول در محیط SIM، سیمونز سیترا، دکربوکسیلاسیون لیزین در محیط LIA، MR VP و هیدرولیز اوره با استفاده از جداول مربع شناسایی شد. باسیل‌های G- غیرتخمیری با انجام تست اکسیداز، بررسی حرکت و استفاده از گلوکز در محیط OF و تولید پیگمان مشخص شد. باسیل‌های G+ براساس مرفولوژی، تولید اسپور، حرکت، تست کاتالاز، هیدرولیز اوره و تست CAMP تحت عنوان *Corynebacterium spp* و یا *Diphtheroides* و همچنین در صورت دارا بودن اسپور در جنس باسیلوس قرار داده شد.

باکتری، تست‌های تشخیصی افتراقی انجام گرفت. در صورت رویت کوکسی‌های G+ ابتدا تست کاتالاز انجام شد و انواع کاتالاز مثبت از نظر تعلق به خانواده میکروکوکاسه ابتدا به وسیله محیط OF و دیسک باسیتراسین غربالگری شده؛ انواع مقاوم به باسیتراسینبی‌هوازی اختیاری تحت عنوان جنس *Staphylococcus* شناسایی گردیده و سپس جهت تعیین گونه با انجام آزمایشات DN ase، Coagulase، هیدرولیز اوره، VP، ONPG، استفاده از مانیتول در محیط Monitol salt agar حساسیت به دو دیسک Novobiocin 5 mg و polymyxin B (100u) گونه استافیلوکوک جدا شده تعیین گردید. انواع کاتالاز مثبت، باسیتراسین حساس و هوازی تحت عنوان میکروکوک تشخیص داده شدند. کوکسی‌های G+ کاتالاز منفی در جنس استرپتوکوک و انواع مشابه استرپتوکوک قرار داده شد و براساس نوع همولیز ایجاد شده برای انواع بتا همولیتیک، بر روی محیط BA تست‌های افتراقی از جمله باسیتراسین و SXT و تست CAMP انجام شد. رشد بر روی محیط بایل اسکولین آگار و هیدرولیز اسکولین، رشد در حضور 6.5% Na Cl، تست VP و تست هیدرولیز هیپورات برای استرپتوکوک‌های با همولیز α و یا بدون همولیز انجام شد. باسیل‌های G- اکسیداز منفی تخمیرکننده، در خانواده انتروباکتریاسه قرار گرفت که با

نتایج:

- باکتری‌های *Pseudomonas* *Neisseria* *sicca* *E. coli* *Enterobacteriaceae* *aeruginosa* *Mycoplasma* *Klebsiella* *pneumoniae* و *Chlamydia* شناسایی نشدند.



شکل ۴-۱- استافیلوکوکوس کشت شده

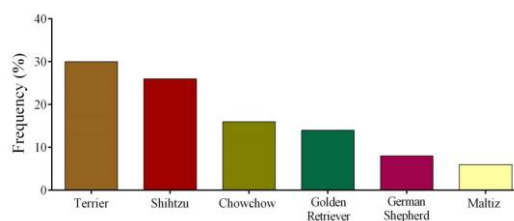
در نمونه‌های عفونت چشم:

- باکتری‌های *S. epidermidis* و *S. intermedius* در تمامی ۲۸ نمونه شناسایی شدند.

- باکتری‌های *S. cohnii* *S. auricularis* *Strep. agalactiae* *Strep. canis* *xylosus* *Coryne.* *Micrococcus* *nishiomiae* *Coryne.* و *Coryne. xerosis* *aquaticum* با فراوانی‌های متفاوت شناسایی شدند.

- باکتری‌های *Neisseria* *S. aureus* *S. capitis* *Pseudomonas* *aeruginosa* *sicca* *Klebsiella* *E. coli* *Enterobacteriaceae* *Mycoplasma* *pneumoniae* و *Chlamydia* نیز شناسایی شدند، اما با فراوانی کمتر.

نژاد: در پژوهش حاضر ۵۰ سگ مورد مطالعه قرار گرفتند که ۳۰ نمونه (۳۰٪) مربوط به نژاد Terrier، ۲۶ نمونه (۲۶٪) مربوط به نژاد Shihtzu، ۱۶ نمونه (۱۶٪) مربوط به نژاد Chowchow، ۱۴ نمونه (۱۴٪) مربوط به نژاد Golden Retriever، ۸ نمونه (۸٪) مربوط به نژاد German Shepherd و ۶ نمونه (۶٪) مربوط به نژاد Maltiz و فراوانی نمونه‌های مورد مطالعه در شکل یک نشان داده شده است. همچنین میانگین و انحراف معیار سن نمونه‌های مورد مطالعه $5/93 \pm 24/16$ ماه بود.



نمودار ۴-۱- نژاد های مورد بررسی

باکتری‌ها

در نمونه‌های عادی چشم:

- باکتری‌های *S. epidermidis* و *S. intermedius* در تمامی ۱۸ نمونه شناسایی شدند.

- باکتری‌های *S. capitis* *S. auricularis* *Strep. canis* *S. xylosus* *S. cohnii* *aureus* *Strep. agalactiae* *Micrococcus* *nishiomiae* *Strep. agalactiae* *Coryne. xerosis* *Coryne. aquaticum* و *Coryne. aquaticum* با فراوانی‌های متفاوت شناسایی شدند.

در نمونه‌های پوست عادی:

- باکتری‌های *S. epidermidis* و *S. intermedius* به

ترتیب در ۱۸ و ۱۳ نمونه شناسایی شدند.

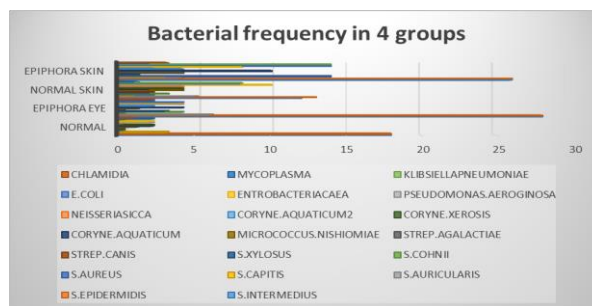
- باکتری‌های *S. capitis*، *S. auricularis* (شکل ۲)

در نمونه‌های پوست عادی:

- قارچ‌های *Aspergillus fumigatus* در ۲ نمونه شناسایی شدند. قارچ‌های دیگر از جمله *Chatomium*، *Pichia*، *Aspergillus niger*، *Aspergillus* و *Fusarium*، *Candida brasiliensis* شناسایی نشدند.

در نمونه‌های عفونت پوست:

- قارچ‌های *Chatomium*، *Pichia*، *Aspergillus*، *niger*، *Aspergillus fumigatus*، *Fusarium* و *Candida brasiliensis* به ترتیب در فراوانی‌های ۳، ۱، ۳، ۳، ۳، ۲ و ۲ شناسایی شدند (شکل ۳)



نمودار ۲-۴- باکتری‌های جدا شده

قارچ‌ها

در نمونه‌های عفونت چشم:

- قارچ‌های *Chatomium*، *Pichia*، *Aspergillus*، *niger*، *Aspergillus fumigatus*، *Fusarium* و *Candida brasiliensis* به ترتیب در

فراوانی‌های ۲، ۳، ۰، ۳، ۱ و ۰ شناسایی شدند.

در نمونه‌های عادی چشم:

- قارچ‌های *Candida* و *Aspergillus niger* به ترتیب

در فراوانی‌های ۱ و ۱ شناسایی شدند. قارچ‌های دیگر از

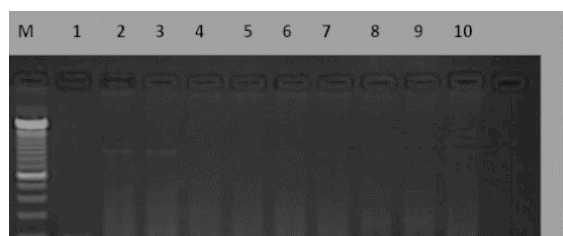
جمله *Chatomium*، *Pichia*، *Aspergillus*، *fumigatus*، *Fusarium* و

brasiliensis شناسایی نشدند.

نمودار ۳-۴- قارچ‌های جدا شده

نتایج PCR برای تمامی نمونه‌های مایکوپلاسما و کلامیدیا

منفی بود



شکل ۲-۴- ژل الکترو

نتایج

فلور چشم، یا جامعه میکروبی موجود در چشم سگ‌ها، نقش حیاتی در حفظ سلامت چشمی دارد. درک ترکیب و عملکرد این فلور برای تشخیص و مدیریت بیماری‌های چشمی در سگ‌ها بسیار حائز اهمیت است. یکی از عملکردهای کلیدی فلور، ایجاد یک حاجز محافظ در برابر میکروارگانیسم‌های ممکن است. فلور طبیعی حاضر در چشم سگ‌ها با رقابت برای منابع و تولید مواد ضد میکروبی، از استقرار و رشد میکروارگانیسم‌های مضر جلوگیری می‌کند. این تعادل برای حفظ سلامت سطح چشمی و جلوگیری از توسعه عفونت‌ها بسیار مهم است. فلور چشم همچنین به حفظ تعادل ایمنی در چشم‌ها کمک می‌کند (۷). حضور باکتری‌های مفید سیستم ایمنی را تحریک می‌کند و به تنظیم پاسخ التهابی کمک می‌کند. این تعامل بین فلور و سیستم ایمنی برای جلوگیری از التهاب بیش از حد و ترویج بهبود مناسب در صورت آسیب یا عفونت بسیار حائز اهمیت است. علاوه بر این، فلور نقشی در تولید و حفظ لایه اشک دارد. لایه اشک برای روان کردن چشم‌ها، ارائه مواد مغذی و محافظت در برابر ذرات خارجی ضروری است. فلور طبیعی به استحکام و کیفیت لایه اشک کمک می‌کند و عملکرد صحیح چشم را تضمین می‌کند و ریسک ابتلا به سندرم چشم خشک و بیماری‌های مرتبط را کاهش می‌دهد. عدم تعادل در فلور می‌تواند منجر به دیس‌بیوزیس شود که با بیماری‌های مختلف چشمی در سگ‌ها همراه است. دیس‌بیوزیس به تغییر در ترکیب یا عملکرد جامعه

میکروبی اشاره دارد که اغلب نتیجه بیماری‌های اساسی، مصرف داروها یا تغییرات محیطی است. هنگامی که تعادل فلور آبی بهم می‌خورد، میکروارگانیسم‌های فرصت طلب می‌توانند روئیده شوند که منجر به شرایطی مانند التهاب ملتحمه، کراتیتیس و یا حتی عفونت‌های شدیدتر می‌شود. نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل گونه‌های قارچی در نمونه‌های مختلف، بینش‌های ارزشمندی را درباره ترکیب میکروبی و عفونت‌های قارچی محتمل در نمونه‌های چشم و پوست ارائه می‌دهد. در نمونه‌های عفونت چشم، انواع مختلفی از گونه‌های قارچی شناسایی شد که شامل *Aspergillus niger*، *Pichia*، *Chatomium*، *Candida*، *Fusarium*، *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus brasiliensis* بود. این نتایج نشان می‌دهد که عفونت‌های قارچی ممکن است به عنوان یک عامل مؤثر در عفونت چشم و علت اپی‌فورا در چشم‌ها مطرح باشند. لازم به ذکر است که حضور این گونه‌های قارچی ممکن است به ناهمواری در میکروبیوم چشمی اشاره کند که می‌تواند منجر به عدم راحتی و التهاب چشمی شود. به عکس، نمونه‌های عادی چشم نشانگر فراوانی کمتری از گونه‌های قارچی بودند. تنها *Aspergillus niger* و *Candida* در فراوانی کمتر تشخیص داده شدند. این ممکن است نشان از این باشد که این گونه‌های قارچی بخشی از میکروبیوم طبیعی چشمی هستند و در افراد سالم معمولاً هیچ آسیب یا علامتی ایجاد نمی‌کنند. نمونه‌های پوست عادی حضور قابل توجهی از گونه‌های قارچی

بحث و نتیجه گیری

به طور خلاصه، در مطالعه حاضر فلور باکتریایی و قارچی چشم و زیر چشم در موارد اپیفورا با بررسی شد. در نمونه‌های چشم با اپیفورا، قارچ‌های مختلف شامل *Aspergillus niger*، *Pichia*، *Chatomium*، *Candida*، *Fusarium*، *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus brasiliensis* با فراوانی‌های متفاوت شناسایی شدند. در نمونه‌های چشم نرمال، *Aspergillus niger* و *Candida* شناسایی شدند، اما سایر قارچ‌ها حضور نداشتند. در نمونه‌های پوست نرمال، *Aspergillus fumigatus* در دو نمونه شناسایی شد، در حالی که سایر قارچ‌ها یافت نشدند. در نمونه‌های پوست با اپیفورا، مشابه نمونه‌های چشم با اپیفورا، قارچ‌های مختلف شامل *Aspergillus niger*، *Pichia*، *Chatomium*، *Candida*، *Fusarium*، *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus brasiliensis* با فراوانی‌های متفاوت شناسایی شدند. در نمونه‌های چشم نرمال، گونه‌های باکتریایی مانند *S. intermedius* و *S. epidermidis* در تمام نمونه‌ها شناسایی شدند، در حالی که گونه‌های دیگر با فراوانی‌های متفاوت یافت شدند. در نمونه‌های چشم با اپیفورا، مشابه نمونه‌های چشم نرمال، *S. intermedius* و *S. epidermidis* در تمام نمونه‌ها شناسایی شدند، اما گونه‌های دیگر با فراوانی‌های متفاوت حاضر بودند، شامل *Strep. S. xylosus*، *S. cohnii*، *S. auricularis*، *Micrococcus*، *Strep. agalactiae*، *canis*

نداشتند، به جز *Aspergillus fumigatus* که در دو نمونه شناسایی شد. این نشان می‌دهد که میکروبیوم طبیعی پوست به طور نسبی از استقرار قارچ‌ها آزاد است. مهم است که تشخیص *Aspergillus fumigatus* در این نمونه‌ها نیازمند بررسی‌های بیشتر است، زیرا این گونه به عنوان یک عامل فرصت طلب شناخته شده است و می‌تواند در شرایط خاصی عفونت ایجاد کند. در نمونه‌های عفونت پوست، تنوع بیشتری از گونه‌های قارچی شناسایی شد که شامل *Aspergillus niger*، *Pichia*، *Chatomium*، *Candida*، *Fusarium*، *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus brasiliensis* بود. حضور این گونه‌ها در نمونه‌های عفونت پوست نشانگر ارتباط احتمالی بین عفونت‌های قارچی و علائم عفونت پوستی است. این نتایج نشان می‌دهند که میکروبیوم پوست ممکن است در توسعه علائم اپیفورا نقشی داشته باشد و باید در تشخیص و درمان این وضعیت مدنظر قرار گیرد. در کل، نتایج نشان می‌دهند که درک ترکیب میکروبی، از جمله گونه‌های قارچی، در نمونه‌های چشم و پوست بسیار مهم است. بررسی‌های بیشتر برای بررسی نقش‌های خاص این گونه‌های قارچی در سلامت چشم و پوست و همچنین مشارکت‌های ممکن آن‌ها در بیماری‌های چشمی و پوستی لازم است. این دانش می‌تواند در توسعه درمان‌های هدفمند و استراتژی‌های پیشگیری در برابر عفونت‌های قارچی و علائم مرتبط کمک کند

پیشنهادهای

توصیه میشود که در درماتیت های زیر چشم تغییرات فلور به سمت فلور قارچی در نظر گرفته شود

پیشنهادهای پژوهشی:

با توجه به تغییرات فلور چشم و پوست در اپیفورا نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه مشهود است.

پیشنهادهای کاربردی :

در موارد درمان درماتیت های ناشی از اپیفورا به تغییرات قارچی فلور توجه شود.

Coryne. Coryne. aquaticum nishiomiae

Xerosis و *Coryne. aquaticum*. در نمونه های پوست نرمال، *S. epidermidis* و *S. intermedius* بیشتر نمونه ها با فراوانی های متفاوت شناسایی شدند، در حالی که گونه های دیگر گزارش نشدند. در کل، این یافته ها نشان می دهد که ترکیبات میکروبی بین نمونه های چشم با اپیفورا و چشم نرمال، و همچنین بین نمونه های پوست با اپیفورا و پوست نرمال تفاوت های قابل توجهی وجود دارد. برای درک پیامدهای این تغییرات میکروبی و نقش آنها در سلامت چشم و پوست سگ ها، نیاز به تحقیقات بیشتر است

منابع

- 1- Rosser EJ. Causes of otitis externa. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 2004 Mar 1; 34(2):459-68.
- 2- Gotthelf LN. Diagnosis and treatment of otitis media in dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 2004 Mar 1; 34(2):469-87.
- 3- Doyle RS, Skelly C, Bellenger CR. Surgical management of 43 cases of chronic otitis externa in the dog. *Irish Veterinary Journal*. 2004 Dec; 57(1):1-9.
- 4- Griffin CE. Otitis techniques to improve practice. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 2006 Aug 1; 21(3):96-105.
- 5- Murphy KM. A review of techniques for the investigation of otitis externa and otitis media. *Clinical techniques in small animal practice*. 2001 Nov 1; 16(4):236-41.
- 6- Paterson S. Discovering the causes of otitis externa. *In Practice*. 2016 May; 38:7-11.
- 7- Ngo J, Taminiau B, Fall PA, Daube G, Fontaine J. Ear canal microbiota—a comparison between healthy dogs and atopic dogs without clinical signs of otitis externa. *Veterinary dermatology*. 2018 Oct; 29(5):425-e140.
- 8- Beale KM, Kunkle GA, Chalker L, Cannon R. Effects of sedation on intradermal skin testing in flea-allergic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1990 Oct 1; 197(7):861-4.
- 9- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick E. *Veterinary micro biology and microbial disease*. John Wiley & Sons; 2011 Oct 7.
- 10- Świąćicka N, Bernacka H, Fac E, Zawislak J. Prevalence and commonest causes for otitis externa in dogs from two Polish veterinary clinics. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2015 Mar 1; 18(1).
- 11- Saridomichelakis MN, Farmaki R, Leontides LS, Koutinas AF. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. *Veterinary dermatology*. 2007 Oct; 18(5):341-7.
- 12- Jaeger K, Linek M, Power HT, Bettenay SV, Zabel S, Rosychuk RA, Mueller RS. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Veterinary dermatology*. 2010 Feb; 21(1):119-23.
- 13- Fernández G, Barboza G, Villalobos A, Parra O, Finol G, Ramirez RA. Isolation and identification of microorganisms present in 53 dogs suffering otitis externa. *Revista Científica-Universidad Del Zulia Facultad De Ciencias Veterinarias Division De Investigacion*. 2006 Jan 1; 16(1):23.
- 14- Guillot J, Bond R. Malassezia yeasts in veterinary dermatology: an updated overview. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2020:79.

- 15- Campbell JJ, Coyner KS, Rankin SC, Lewis TP, Schick AE, Shumaker AK. Evaluation of fungal flora in normal and diseased canine ears. *Veterinary dermatology*. 2010 Dec; 21(6):619-25.
- 16- Zur G, Lifshitz B, Bdolah-Abram T. The association between the signalment, common causes of canine otitis externa and pathogens. *Journal of Small Animal Practice*. 2011 May; 52(5):254-8.

Study of the microbial flora of the eye and lower eyelid area in healthy dogs and those with epiphora using culture and PCR methods

Morteza Razaghi Manesh^{1*}, Erfan Dayani², Ali Reza Salmani³, Mahan Yaghmaee³

1. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture and Veterinary Medicine, Shushtar Branch, Islamic Azad University, Shushtar,
2. Graduate of Doctor of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Iran
3. Doctor of Veterinary Medicine Student, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Iran

*Corresponding author: Morteza_Vet@yahoo.com

Abstract

This study was conducted with the aim of investigating the flora of the eye and the lower area of the eye in healthy and epiphora affected dogs. A sterile microswab was used to collect samples for microbial culture. All microswab samples were transferred to the laboratory for culture in PBS (buffered saline). Doublet blood agarbe was used for each ear along with Kanki domek. A plate of SDA (saborodextrose agar) was applied to each ear for fungal culture. Several standard biochemical tests were performed to identify the isolated organisms. In summary, in the present study, the bacterial and fungal flora of the eye and under the eye in cases of epiphora were investigated. In eye samples with ,epiphora, various fungi including Chatomium, Pichia, Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus Fusarium, Candida and Aspergillus brasiliensis were identified with different frequencies. In normal eye samples, Aspergillus niger and Candida were identified, but other fungi were not present. In normal skin samples, Aspergillus fumigatus was detected in two samples, while no other fungi were found. In ,skin samples with epiphora, similar to eye samples with ephiora, various fungi including Chatomium Pichia, Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus, Fusarium, Candida and Aspergillus brasiliensis were detected with different frequencies. In normal eye samples, bacterial species such as S. intermedius and .S. epidermidis were detected in all samples, while other species were found with different frequencies. In eye samples with epiphora, similar to normal eye samples, S. intermedius and S. epidermidis were .detected in all samples, but other species were present with different frequencies, including S

.auricularis, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *Strep. canis*, *Strep. agalactiae*, *Micrococcus nishiomiae*, *Coryne. aquaticum*, *Coryne. xerosis* and *Coryne. aquaticum*. In normal skin samples, *S. intermedius* and *S. epidermidis* were detected in most samples with different frequencies, while other species were not reported. Overall, these findings indicate that there are significant differences in microbial compositions between eye samples with ophiora and normal eyes, as well as between skin samples with ophiora and normal skin. More research is needed to understand the implications of these microbial changes and their role in eye and skin health in dogs.

Keywords: Epiphora, Bacterial Flora, Fungal Flora, Conjunctiva, Ey