JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دوازدهم، شماره اول، ۱۳۹۵، پیاپی ۳۲: ۹۰-۸۱

شناسایی مولکولی و بررسی کلونیزاسیون برخی گونه‌های *استافیلوکوکوس* در سگ‌های به ظاهر سالم ارجاعی به بیمارستان دانشکده دامپزشکی اهواز

داریوش غریبی[1*]، بهمن مصلی نژاد[2]، سیده محدثه هاشمی[3]

۱- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۸ تیر ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش۱۷ اردیبهشت ۱۳۹۴

چکیده: *هدف از این مطالعه شناسایی مولکولی و بررسی کلونیزاسیون استافیلوکوکوس سوداینترمدیوس و استافیلوکوکوس اورئوس در سگ‌های به ظاهر سالم ارجاعی به بیمارستان دانشکده دامپزشکی اهواز بود. سوآب‌های بینی از تعداد ۱۴۳ سگ ارجاعی به بیمارستان دامپزشکی اهواز گرفته شد و پس از انجام کشت، باکتری‌های جدا شده با استفاده از روش‌های معمول تعیین هویت باکتری‌ها و روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلی مراز دوگانه تعیین هویت گردید. نتایج تشخیص با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی نشان داد، تعداد ۱۳ جدایه استافیلوکوکی (۱۹/۴۰ درصد)، استافیلوکوکوس اورئوس بودند ولی در مورد بقیه جدایه (۵۴ جدایه دیگر) تشخیص قطعی امکان پذیر نبود. نتایج آزمون PCR دوگانه با استفاده از تکثیر ژن ترمونوکلئاز (nuc) برای گونه‌های استافیلوکوکوس سوداینترمدیوس و استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد، از تعداد ۶۷ جدایه کوآگولاز مثبت استافیلوکوکوس، ۱۳ جدایه (۱۹/۴۰درصد) استافیلوکوکوس اورئوس و ۵۴ جدایه (۸۰/۵۹ درصد) استافیلوکوکوس‌سوداینترمدیوس بودند. تعداد ۷ سگ (۱۰/۴۴ درصد) آلودگی همزمان به استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس سوداینترمدیوس داشتند. با توجه به شیوع نسبتا بالای استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت و بویژه استافیلوکوکوس سوداینترمدیوس در سگ و احتمال انتقال آنها به صاحبان آنها، رعایت اصول بهداشتی در مواجهه با این حیوانات از طرف صاحبان آنها ضروری به نظر می‌رسد.*

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس سوداینترمدیوس، PCR دو گانه، سگ*

*نویسنده مسئول: داریوش غریبی

آدرس: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. تلفن:۱۸۴۱ ۰۹۱۳۲۸۳

پست الکترونیک: d.gharibi@scu.ac.ir

مقدمه

*استافیلوکوکوس*های کوآگولاز مثبت، باکتری‌های همزیست و پاتوژن‌های فرصت طلبی هستند که عفونت‌های مختلفی را در انسان و حیوانات ایجاد می‌کنند. سویه‌های مقاوم به متی سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس* علاوه بر ایجاد عفونت در انسان، در حیوانات مرتبط با انسان و ایجاد عفونت در آنها نیز حائز اهمیت هستند و امروزه بحث انتقال بین گونه‌ای سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک این باکتری‌ها اهمیت آنها را دو چندان کرده است (۲۰). گونه‌های کوآگولاز مثبت دیگر جنس *استافیلوکوکوس* که در بیماریزایی در حیوانات خانگی بویژه سگ و گربه حائز اهمیت می‌باشند شامل *استافیلوکوکوس اینترمدیوس*، *استافیلوکوکوس سودااینترمدیوس* و *استافیلوکوکوس شلیفری* زیرگونه *کوآگولانس* می‌باشند. این باکتری‌ها نیز اگر چه باکتری‌های همزیست مطرح در این حیوانات هستند ولی می‌توانند عفونت‌های نظیر پیودرم، اوتیت خارجی و بیماری‌های دستگاه ادراری تناسلی را در این گونه‌های دامی ایجاد نمایند (۳ و ۷). قبلا *استافیلوکوکوس اینترمدیوس* به عنوان گونه غالب *استافیلوکوکوس* در سگ مطرح بود ولی مطالعات اخیر نشان داده است غالب جدایه‌های *استافیلوکوکوس اینترمدیوس* که قبلا از سگ جداسازی و تحت این نام، نامگذاری شده‌اند متعلق به گونه *استافیلوکوکوس سودااینترمدیوس* می‌باشند (۳، ۱۲ و ۱۳). هر دو گونه *استافیلوکوکوس اینترمدیوس* و *استافیلوکوکوس سودااینترمدیوس* در انسان نیز شناسایی شده‌اند و می‌توانند باعث عفونت‌های فرصت طلب در انسان شوند. همچنین کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس اینترمدیوس* در صاحبان سگ‌ها و انتقال بین گونه‌ای سویه‌های مقاوم به متی سیلین این گونه در انسان نیز مطرح و گزارش شده است (۹، ۴، ۱۶ و ۱۸). اطلاعاتی در زمینه کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس*های کوآگولاز مثبت مطرح در سگ بویژه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس سودااینترمدیوس* در ایران و بویژه در منطقه اهواز وجود ندارد. از آنجایی که تمایز این دو گونه براساس خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی و به خاطر نبود آزمایش بیوشیمیایی منحصر بفردی که متمایزکننده این دو باشد مشکل می‌باشد، لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی کلونیزاسیون این دو باکتری کوآگولاز مثبت در بینی سگ‌های به ظاهر سالم ارجاعی به بیمارستان دامپزشکی اهواز با استفاده از روش مولکولی (PCR دوگانه) می‌باشد. شناسایی و متمایز کردن این باکتری‌ها از هم با روش‌های دقیق تر نظیر روش‌های مولکولی، برای آزمایشاتی نظیر تعیین میزان حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد یا قطرهاله عدم رشد در مورد آنتی بیوتیک‌ها، با توجه به متفاوت بودن نقطه انفصال یا برش آنها از همدیگر، در آزمایشگاه‌ها بویژه آزمایشگاه‌های تشخیصی دامپزشکی حائز اهمیت می‌باشد. همچنین شناسایی جنبه‌های اکولوژی و کلونیزاسیون این باکتری‌ها بویژه با توجه به ظهور سویه‌های مقاوم به متی سیلین آنها و احتمال انتقال به صاحبان این دام‌ها و دامپزشکان جهت رعایت شرایط بهداشتی و اتخاذ شیوه‌های مدیریتی کنترل عفونت نیز سودمند می‌باشد.

مواد و روش کار

جمع آوری، کشت و تعیین هویت نمونه‌ها

سواب‌های بینی به طور استریل از تعداد ۱۴۳ سگ ارجاعی به بیمارستان دامپزشکی اهواز اخذ گردید. سن و نژاد سگ‌ها در هنگام نمونه‌گیری ثبت می‌گردید. سواب‌ها بر روی محیط کشت Mannitol salt agar

(MSA) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ –۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. باکتری‌های رشد کرده بر روی محیط MSA (مانیتول مثبت یا منفی) که مشکوک به *استافیلوکوکوس* بودند از محیط بوسیله آنس استریل برداشته و در محیط کشت ژلوز خوندار کشت داده شدند. متعاقب رشد باکتری‌ها در محیط ژلوز خوندار و پس از بررسی مورفولوژی پرگنه‌ها و شکل باکتری‌های مشکوک و انجام آزمایش کاتالاز و اکسیداز، باکتری‌ها در محیط‌های افتراقی مربوط به تعیین هویت باکتری‌های جنس *استافیلوکوکوس* کشت داده شدند. به این منظور از خصوصیاتی نظیر خاصیت تولید پیگمان، بررسی همولیز، آزمایش هیدرولیز اوره، تولید استوئین، حساسیت یا مقاومت به پلی میکسین و نوبیوسین و تخمیر قندهای مانیتول، تری‌هالوز، مانوز، مالتوز، زایلوز، آرابینوز و سوکروز استفاده گردید. همزمان آزمایش کوآگولاز روی لام (Slide coagulase test) و داخل لوله (Tube coagulase test) نیز برای باکتری‌ها انجام شد. برای انجام آزمایش کوآگولاز روی لام یک لوپ کامل از باکتری در یک قطره از آب بر روی اسلاید میکروسکوپی مخلوط می‌شد و سپس یک لوپ کامل از پلاسمای سیتراته انسان به آن اضافه و به خوبی مخلوط می‌شد. ظاهر شدن رگه‌هایی از لخته در مدت زمان ۱۰ ثانیه نشان دهنده مثبت بودن آزمایش کوآگولاز روی لام برای باکتری بود. در روش داخل لوله نیز ۰/۵ میلی لیتر پلاسمای سیتراته با ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسون باکتری در داخل لوله مخلوط و در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه می‌شد و تشکیل لخته ۲– ۴ ساعت بعد (در مواردی تا ۲۴ ساعت بعد) مورد بررسی قرار می‌گرفت. در نهایت باکتری‌های کوکسی گرم مثبت، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، واجد همولیز (همولیز مضاعف در غالب موارد)، واجد پرگنه زرد بر روی محیط MSA، اوره آز مثبت، کوآگولاز مثبت با استفاده از روش‌های معمول تعیین هویت باکتری‌ها، تا حد امکان تعیین هویت گردید. لازم به ذکر است در غالب موارد این تست‌ها در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* مثبت بود. هر دو باکتری نسبت به نوووبیوسین حساس ولی *استافیلوکوکوس اورئوس* به پلی میکسین مقاوم و *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* حساس است. همچنین *استافیلوکوکوس اورئوس* بر خلاف *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* تولید استوئین می‌کند (۲).

استخراج DNA از جدایه‌های *استافیلوکوکوس*

جهت استخراج DNA از جدایه‌های *استافیلوکوکوس* که با روش‌های بیوشیمیایی مشخص گردیده بودند از کیت استخراج DNA مخصوص باکتری‌های گرم مثبت (شرکت سیناژن) استفاده گردید. در حدود ۱۰–۲۰mg از باکتری‌های *استافیلوکوکوس* (۲ تا ۳ پرگنه از کشت شبانه) با محلول Prelysis buffer و آنزیم‌های لیزوزیم و ریبوتیناز در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید و پس از لیز کامل باکتری‌ها، مراحل استخراج DNA مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده کیت، بر روی تمامی‌جدایه انجام پذیرفت. DNA استخراج شده پس از بررسی کیفیت آن بوسیله الکتروفورز در دمای ۲۰ – درجه سانتیگراد و تا زمان آزمایشPCR نگهداری شد. کلیه مراحل استخراج DNA نیز برای سوش استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC – 33591) به عنوان کنترل مثبت نیز انجام شد.

آزمون PCR جهت شناسایی گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس*

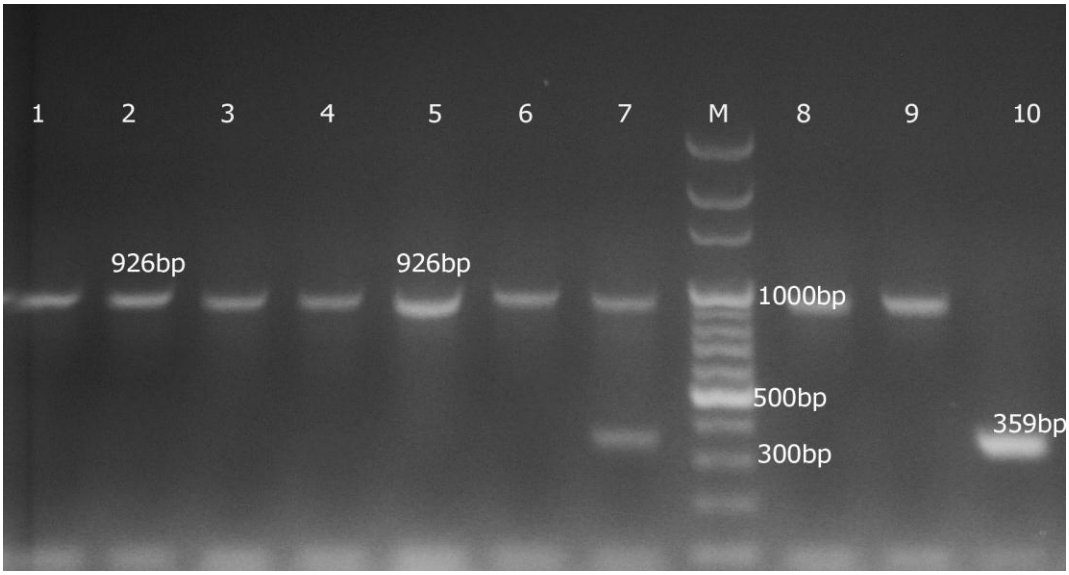
شناسایی گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* در جدایه‌های بالینی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن ترمونوکلئاز (nuc) مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق از توالی این پرایمرها برای متمایز نمودن *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* در آزمایش multiplex PCR استفاده شد. توالی آغازگرهای و آغازگر معکوس 5′-CTTTTGTGCTYCMTTTTGG-3′ و برای گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* آغازگر پیشرو 5′-TCGCTTGCTATGATTGTGG-3′ و آغازگر معکوس 5′-TCGCTTGCTATGATTGTGG-3′ (ساخت شرکت سیناژن) بودند (۱۵) این آغازگرها به ترتیب قطعاتی به طول‌های ۹۲۶ bp و ۳۵۹ bp از ژن ترمونوکلئاز (nuc) را تکثیر می‌کنند. واکنش M-PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام گردید. اجزای واکنش شامل ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، ۲۵ میکرولیتر master mix 2X (شرکت سیناژن) و مابقی آب دیونیزه استریل بود. سیکل‌های حرارتی شامل دناتوراسیون اولیه ۲ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد، ۳۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در در ۹۵ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه در ۵۶ درجه سانتیگراد جهت اتصال پرایمرها، ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد برای تکثیر قطعه هدف و تکثیر نهایی به مدت ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد بود (۱۵). در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR در آگارز ۱/۵ درصد به همراه Safe stain (شرکت سیناژن) بارگذاری و باندهای مورد نظر زیر اشعه UV مورد بررسی قرار گرفت (شکل۱). در این تحقیق از سوش استاندارد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC – 33591) در کنار جدایه‌های بالینی در تمام آزمایشات استفاده گردید. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون دقیق فیشر مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

در این تحقیق از مخاط بینی ۱۴۳ سگ ارجاعی به بیمارستان دانشکده دامپزشکی اهواز نمونه‌گیری به عمل آمد. نتایج کشت باکتریایی نمونه‌های سواب بینی نشان داد که در مجموع تعداد ۲۱ سگ (۱۴/۶۸درصد) فاقد باکتری *استافیلوکوکوس* در بینی و ۱۲۲ سگ (۸۵/۳۱ درصد) حامل این باکتری بودند. از تعداد ۱۴۳ سواب کشت داده شده و با توجه به سن سگ‌های نمونه‌گیری شده، از تعداد ۳۰ سگ زیر یک سال ۲۶ جدایه *استافیلوکوکی* (۲۱/۳۱ درصد)، ۸۲ سگ در رده سنی بین یک تا سه سال ۶۷ جدایه (۵۴/۹۱ درصد) و ۳۱ سگ بالای سه سال۲۹ جدایه (۲۳/۷۷ درصد) *استافیلوکوکوس* جدا شد (جدول ۱). متعاقب انجام آزمایش کوآگولاز از ۱۲۲ سگ حامل باکتری *استافیلوکوکوس*، تعداد ۶۷ جدایه *استافیلوکوکوس* کوآگولاز مثبت، جدا شده که از این تعداد باکتری کوآگولاز مثبت، ۲۴ جدایه (۳۵/۸۲ درصد) متعلق به گروه سنی زیر یک سال، ۲۸جدایه (۴۱/۷۹ درصد) متعلق به سگ‌های یک تا سه سال و ۱۵جدایه (۲۲/۳۸ درصد) متعلق به سگ‌های بالای سه سال بوده است (جدول۱). اگرچه بیشترین میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس*‌های کوآگولاز مثبت در رده‌ی سنی بین یک تا سه سال بوده است، اما بررسی‌های آماری با استفاده از آزمون مربع کای ارتباط معنی‌داری بین سن و شیوع باکتری‌های *استافیلوکوکوس* کوآگولاز مثبت

را نشان نداد (P>۰/۰۵). همچنین به علت تنوع نژادی در بین نمونه‌های موجود در مطالعه‌ی حاضر، بررسی‌های آماری با استفاده از آزمون مربع کای ارتباط معنی داری را در بین نژاد سگ‌ها و شیوع باکتری‌های *استافیلوکوکوس* کوآگولاز مثبت نشان نداد (P>۰/۰۵).

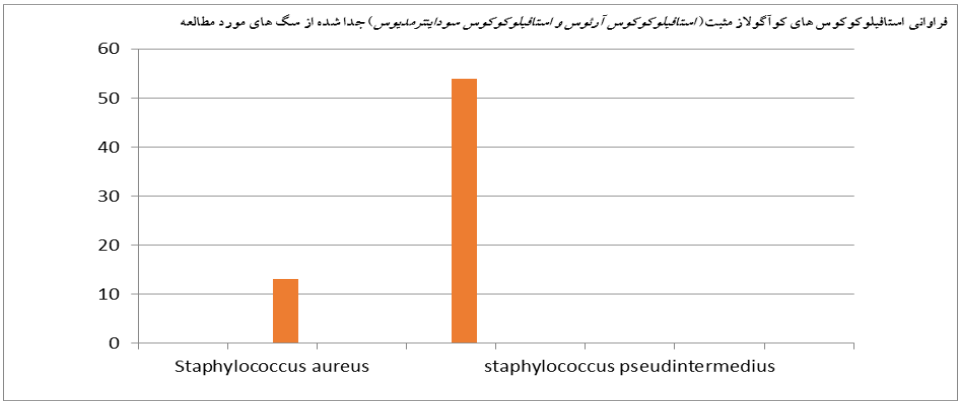
نتایج انجام آزمایشات بیوشیمیایی نشان داد، تعداد ۱۳ (۱۹/۴۰ درصد) جدایه *استافیلوکوکی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند ولی در مورد بقیه جدایه‌ها (۵۴ جدایه دیگر) تشخیص قطعی امکان پذیر نبود. نتایج آزمون PCR نشان داد که باندهای مربوط به ژن ترمونوکلئاز (nuc) برای گونه‌های *استافیلوکوکوس سودا ینترمدیوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (به ترتیب bp ۹۲۶ و bp ۳۵۹) به درستی تکثیر یافته‌اند (شکل ۱). براساس نتایج PCR برای تعیین هویت گونه‌های *استافیلوکوکوس*، از تعداد ۶۷ جدایه کوآگولاز مثبت، ۱۳ جدایه (۱۹/۴۰درصد) *استافیلوکوکوس اورئوس* و ۵۴ جدایه (۸۰/۵۹ درصد) *استافیلوکوکوس‌سودا ینترمدیوس* تشخیص داده شدند (نمودار۱). تعداد ۷ سگ (۱۰/۴۴ درصد) آلودگی همزمان به *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس سودا ینترمدیوس* داشتند.



شکل ۱- نتایج مربوط به تعیین گونه جدایه‌های استافیلوکوکوس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن ترمونوکلئاز (nuc).گوده‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶،۸ و ۹ باند bp ۹۲۶ مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس سودا ینترمدیوس* می‌باشد، گوده شماره ۷ کنترل مثبت M-PCR که همزمان واجد DNA باکتری *استافیلوکوکوس سودا ینترمدیوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده است. گوده شماره ۱۰ باند bp ۳۵۹ مربوط به سوش استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد، M مارکر مولکولی bp ۱۰۰.

جدول ۱- فراوانی جدایه‌های *استافیلوکوکوس* از سگ‌های مورد مطالعه در سنین مختلف

سن	تعداد سگ‌های نمونه‌گیری شده	جدایه‌های *استافیلوکوکوس*				جدایه‌های کوآگولاز مثبت *استافیلوکوکوس*			
		مثبت		منفی		مثبت		منفی	
		فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی
زیر یک سال	۳۰	۲۶	٪۲۱/۳۲	۴	٪۱۹/۰۵	۲۴	٪۳۵/۸۲	۲	٪۳/۶۳
۳-۱ سال	۸۲	۶۷	٪۵۴/۹۱	۱۵	٪۷۱/۴۳	۲۸	٪۴۱/۸۰	۳۹	٪۷۰/۹۱
بالای ۳ سال	۳۱	۲۹	٪۲۳/۷۷	۲	٪۹/۵۲	۱۵	٪۲۲/۳۸	۱۴	٪۲۵/۴۶
جمع	۱۴۳	۱۲۲	٪۱۰۰	۲۱	٪۱۰۰	۶۷	٪۱۰۰	۵۵	٪۱۰۰



نمودار۱- فراوانی *استافیلوکوکوس*های کوآگولاز مثبت جدا شده از سگ‌های مورد مطالعه

بحث

*استافیلوکوکوس*های کوآگولاز مثبت بیماری‌های مختلفی با میزان متغیر ابتلا و مرگ و میر را در حیوانات باعث می‌شوند. در میان *استافیلوکوکوس*های کوآگولاز مثبت *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از بعد دامپزشکی دو گونه مهم به خاطر توانایی ایجاد بیماری و همچنین پتانسیل زئونوتیک بودنشان محسوب می‌شوند (۱۷ و ۱۹).

در این تحقیق شناسایی گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* در جدایه‌های بالینی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن ترمونوکلئاز (nuc) مورد بررسی قرار گرفت. این ژن در اعضای جنس *استافیلوکوکوس* محافظت شده است و تنوع آن در حد متوسط می‌باشد. Takashi Sasaki و همکاران بر اساس تعیین توالی نوکلئوتیدی این ژن در گونه‌های مختلف جنس *استافیلوکوکوس*، پرایمرهایی را طراحی کردند که در آزمایش PCR دوگانه به طور موفق با حساسیت و ویژگی ۹۹/۸ درصد و ۱۰۰ درصد گونه‌های کوآگولاز مثبت جنس *استافیلوکوکوس* را از هم متمایز می‌نمود (۱۵). نتایج این تحقیق نشان داد که تعداد ۶۷ (۵۴/۹۱ درصد) جدایه‌های *استافیلوکوکوس*، کوآگولاز مثبت بودند که ۱۳ مورد آن *استافیلوکوکوس اورئوس* و ۵۴ مورد *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* تشخیص داده شدند و شیوع *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* ۸۰/۵۹ درصد و *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۹/۴۰ درصد در بین سگ‌های ارجاعی به بیمارستان دانشکده دامپزشکی اهواز تعیین گردید. این نتایج نشان داد که باکتری *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* شیوع نسبتا بالایی در سگ‌ها دارد که با نتایج سایر محققین همخوانی دارد. Senthi Kumar و همکاران (۲۰۱۰) از ۷۷ مورد پیودرمای سگ، شیوع ۶۰ درصدی باکتری *استافیلوکوکوس اینترمدیوس* را گزارش دادند (۱۴). Hanselman و همکاران در مطالعه‌ای، کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس اورئوس* را در انسان، سگ و گربه‌های خانگی به ترتیب ۲۸، ۱۴ و ۴/۳ درصد و کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* را ۴/۱، ۶۱ و ۱۱ درصد در انسان، سگ و گربه گزارش نمودند (۶). Rubin و همکاران (۲۰۱۱) شیوع *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* در سگ را ۸۷/۴ درصد گزارش نمودند (۱۱). Sasaki و همکاران (۲۰۰۷) شیوع *استافیلوکوکوس*های کوآگولاز مثبت مقاوم به متی-سیلین را بررسی کردند. از تعداد ۵۷ سگ ارجاعی به بیمارستان بیمارستان آموزشی دامپزشکی (۲۶ سگ

بستری شده و ۳۱ سگ سرپایی) ۱۸ جدایه *استافیلوکوکوس* کوآگولاز مثبت مقاوم به متی‌سیلین جدا گردید که ۱۲ مورد آن از ۲۶ سگ بستری شده (۴۶/۲ درصد) و ۶ مورد از ۳۱ سگ‌های سرپایی (۱۹/۴ درصد) بودند که با استفاده از روش‌های مولکولی مشخص گردیده است که تمامی‌آنها *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* تشخیص داده شدند (۱۲). Griffeth و همکاران (۲۰۰۸) شیوع *استافیلوکوکوس*‌های کوآگولاز مثبت را در پوست سگ‌های سالم و سگ-های با پوست ملتهب به ترتیب ۷۴ و ۸۸ درصد گزارش کردند. از ۷۴ درصد *استافیلوکوکوس* کوآگولاز مثبت در سگ‌های سالم ۱۶ درصد *استافیلوکوکوس اورئوس* و ۹۲ درصد *استافیلوکوکوس اینترمدیوس* بودند (۵). میزان بالای کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* در سگ‌ها در این مطالعات شاید دلیلی بر اختصاصی بودن میزبان (سگ) برای این باکتری باشد (۱۳). همچنین نتایج متنوع در مورد این شیوع‌ها در مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از اختلافات جغرافیایی، اختلاف در نژادهای سگ‌های ارجاعی و مورد مطالعه، روش‌های تشخیص و محل نمونه‌گیری باشد. در سگ-ها به نظر می‌رسد شیوع *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* در مقایسه با *استافیلوکوکوس اورئوس* بالاتر باشد (۱ و ۱۰). معمولا حامل بودن سگ‌های سالم نسبت به *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* معمول‌تر می‌باشد ولی دینامیک کلونیزاسیون این باکتری در سگ‌ها هم در مورد فرکانس حامل بودن و هم در مورد تنوع سویه‌ها در طول زمان و در قسمت‌های مختلف بدن متفاوت از آنچه *استافیلوکوکوس اورئوس* در انسان دارد می‌باشد. بدین صورت که شیوع *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* در سگ‌های سالم در مقایسه با شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در انسان (معمولا ۳۰-۲۰ درصد جمعیت افراد سالم ناقل *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشند) بالاتر است (۲۱) و این مساله احتمالا مربوط به استانداردهای بهداشتی پایین و رفتار اجتماعی سگ‌ها (مانند خود تیماری سگ‌ها و تماس نزدیک آنها با دیگر سگ‌ها و محیط) باشد. همچنین بینی، دهان و ناحیه پرینه مهمترین مکان‌های کلونیزاسیون این باکتری در سگ‌ها می‌باشد (۸). همچنین Duijkeren Van و Weese نشان دادند که کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس اورئوس* در سگ‌ها ممکن است موقتی باشد چرا که این باکتری یک باکتری همزیست طبیعی غالب در سگ نمی‌باشد. لذا با توجه به اینکه *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* غالب‌ترین همزیست در سگ می‌باشد بنابراین دوام کلونیزاسیون آن نیز در سگ بیشتر خواهد بود ولی با این حال مطالعات بیشتری در مورد ارزیابی مدت زمان دوام کلونیزاسیون این باکتری نیازمند است (۱۷ و ۱۹).

از آنجایی که پتانسیل استقرار و کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس*‌های به خصوص *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* در انسان وجود دارد و علاوه براین، وقوع *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* در صاحبان سگ به میزان قابل توجهی بالاتر از افراد دیگر می‌باشد (۴). بنابراین، احتمالا عفونت با *استافیلوکوکوس-سودانیترمدیوس* و به تبع آن سویه‌های مقاوم به متی-سیلین این باکتری خطر بیشتری برای صاحبان سگ در مقایسه با سایر افراد دارد و همین امر لزوم توجه به ریشه‌کنی موضعی و اقدام برای مبارزه و از بین‌بردن کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس*‌های مقاوم به متی‌سیلین در حیوانات حامل برای جلوگیری از آلودگی مجدد حیوانات دیگر و جلوگیری از انتقال این باکتری‌ها به انسان را مضاعف می‌کند.

با توجه به شیوع نسبتا بالای *استافیلوکوکوس*های کوآگولاز مثبت و بخصوص *استافیلوکوکوس سودانیترمدیوس* در سگ در این مطالعه و احتمال انتقال آنها به صاحبان آنها، رعایت اصول بهداشتی در مواجهه با این حیوانات از طرف صاحبان آنها ضروری به نظر می‌رسد. همچنین با توجه به احتمال بروز مقاومت‌های دارویی به خصوص در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین *استافیلوکوکوس* و شیوع متفاوت آنها از لحاظ جغرافیایی، بررسی اپیدمیولوژی کلونیزاسیون *استافیلوکوک*های مقاوم به متی‌سیلین به منظور درک ظهور آشکار این سویه‌ها و توسعه استراتژی‌های کنترل مناسب این باکتری‌ها و تعیین الگوی حساسیت آنتی-بیوتیکی آنها برای درمان موفقیت‌آمیز و جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ضروری می-باشد.

تشکر و قدردانی

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

منابع

1. Beiberstein, E.L., Jang, S.S., Hirsh, D.C. (1984). Species distribution of coagulase-positive staphylococci in animals. *Journal of Clinical Microbiology* **19**: 610-15.
2. Bryan, M., Finola, L., Marie Ann, C., Doris, M. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology*. Second edition. London, Mosby Elsevier: 105-20.
3. Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**:1569-73.
4. Guardabassi, L., Loeber, M.E., Jacobson, A. (2004) Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Veterinary Microbiology* **98**: 23-27.
5. Griffeth, G.C., Morris, D.O., Abraham, J.L., Shofer, F.S., Rankin, S.C. (2008). Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Veterinary Dermatology* **19**: 142-9.
6. Hanselman, B.A., Kruth, S.A., Rousseau, J., Weese, J.S. (2009). Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *Canadian Veterinary Journal* **50**: 954-8.
7. Morris, D.O., Rook, K.A., Shofer, F.S., Rankin, S.C. (2006). Screening of *Staphylococcus aureus, Staphylococcus intermedius,* and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: A retrospective review of 749 isolates (2003–04). *Veterinary Dermatology* **17**: 332-7.
8. Paul, N.C., Bärgman, S.C., Moodley, A., Nielsen, S.S., Guardabassi, L. (2012). *Staphylococcus pseudintermedius* colonization patterns and strain diversity in healthy dogs: A cross-sectional and longitudinal study. *Veterinary Microbiology* **160**: 420-7.
9. Pottumarthy, S., Schapiro, J.M., Prentice, J.L. (2004). Clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* masquerading as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 5881-4.
10. Rich, M. (2005). Staphylococci in animals: prevalence, identification and antimicrobial susceptibility, with an emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Biomedical Science* **62**: 98-105.
11. Rubin, J.E., Chirino-Trejo, M. (2011). Prevalence, sites of colonization and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon. *Canadian Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **23**: 351-4.
12. Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., Hiramatsu, K. (2007a). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a

veterinary teaching hospital. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 1118-25.

13. Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., Hiramatsu, K. (2007b). Reclassification of phenotypically-identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2770-8.
14. Senthi Kumar, K., Selvaraj, P., Vairamuthu, S., Nagarajan, B., Nambi, A.P. (2010). Frequency of isolation of *Staphylococus intermedius from* canine pyoderma and its antibiogram pattern. *Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal Sciences* **6**: 242-44.
15. Takashi, S., Sae, T., Yoshikazu, T., Arihito, S., Masayuki, O., Shintaro, H., Tetsuji, K., Tsuneo, F., Keiichi, H. (2010). Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* **48:** 765-9.
16. Tanner, M.A., Everett, C.L., Youvan, D.C. (2000). Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 1628-31.
17. Van Duijkeren, E., Kamphuis, M., VanderMije, I.C. (2011). Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. *Veterinary Microbiology* **150**: 338-43.
18. Van Hoovels, L, Vankeerberghen, A., Boel, A., Van Vaerenbergh, K., De Beenhouwer, H. (2006). First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 4609-12.
19. Weese, J.S., Van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* **140**: 418-29.
20. Weese, J.S., Dick, H., Willey, B., McGeer, A. (2006). Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Veterinary Microbiology* **115**:148-55.
21. Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Verbrugh, H.A., Nouwen, J.L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infectious Diseases* **5**: 751-62.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 12, Issue 1, 2016

Molecular Identification and Colonization of Some Species of *Staphylococcus* in Apparently Healthy Dogs Referred to Veterinary Hospital of Ahvaz

Gharibi, D.[1*], Mosallanejad, B.[2], Hashemi, S.M.[3]

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

Received Date: 20 June 2014 *Accepted Date: 7 May 2015*

Abstract: *The purpose of this study was molecular identification and colonization of Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintemedius in apparently healthy dogs referred to Veterinary teaching Hospital in Ahvaz. Nasal swabs from 143 dogs referred to Veterinary Hospital were cultured and identified using routine biochemical and molecular (duplex PCR) methods. Based on biochemical methods, 13 isolates (40/19%) were identified as Staphylococcus aureus but a definite diagnosis of the remaining isolates (54 isolates) was not possible. Thermonuclease gene (nuc), specified for Staphylococcus pseudintermedius and Staphylococcus aureus was amplified by PCR. 13 (40/19%) and 54(59/80%) of coagulase-positive staphylococci, were identified as Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius respectively by PCR. 7(44/10%) dogs showed mixed infection with Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius. Considering high prevalence of coagulase-positive staphylococci, especially Staphylococcus pseudintermedius in dogs and potential transmission to humans, health care is necessary by the owners in the face of these animals.*

Keywords: *Staphylococcus aureus; Staphylococcus pseudintermedius; Duplex PCR; Dog*

**Corresponding author: Gharibi, D.*
Address: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, *S*hahid Chamran University, Ahvaz, Iran. *Tel: 09132831841*
Email: d.gharibi@scu.ac.ir