DOI:10.22092/VJ.2022.357197.1927
شماره ۱۳۷ زمستان ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

جداسازی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده از دستگاه تناسلی مادیان نژاد ترکمن با تاکید بر جداسازی تایلور لا اکویی جنیتالیس

• **یاسر نفس‌پور**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
• **آنیا آهنی‌آذری (نویسنده مسئول)**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
• **احمد دانش**
مرکز تحقیقات مدیریت سلامت و توسعه اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰-۱۰-۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰-۱۲-۰۷
Email: ania_783@yahoo.com

چکیده

یکی از بیماری‌های مقاربتی اسب، متریت واگیردار است که توسط باکتری تایلورلا اکوئی جنیتالیس ایجاد می شود. علاوه بر این باکتری که یکی از مهم‌ترین عوامل ناباروری است سایر باکتری‌ها نیز ممکن است سبب ناباروری شوند. پژوهش حاضر با هدف جداسازی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده از دستگاه تناسلی مادیان نژاد ترکمن با تاکید بر جداسازی تایلورلا اکویی جنیتالیس در شهرستان کلاله انجام شد. در این مطالعه تعداد ۵۲ نمونه به طور تصادفی از ناحیه گودی و سینوس کلیتوریس مادیان گرفته شد. پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژی، آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. برای شناسایی تایلورلااکویی جنتیالیس از دو روش کشت و واکنش زنجیری پلی مراز (PCR) استفاده شد. از هیچیک از نمونه‌ها به روش کشت و PCR تایلورلااکویی جنتیالیس جدا نشد. در مجموع ۹۱ سویه باکتریایی جداسازی شد که به ترتیب فراوانی عبارت بودند از: ۲۲ درصد استافیلوکوکوس اورئوس، ۲۱ درصد اشرشیا کلی، ۱۴/۵ درصد کلبسیلا، ۱۲درصد ویریو، ۱۱درصد شیگلا، ۹ درصد سودوموناس آئروژینوزا، ۹ درصد کورینه باکتریوم و ۲/۵ درصد انتروکوک. جدایه‌های گرم منفی و مثبت به ترتیب بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به آنتی بیوتیک‌های ونکومایسین (۵۰/۸ درصد) و پنی‌سیلین (۶۰ درصد) از خود نشان دادند. همة جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نئومایسین، تری‌متوپریم/سولفامتوکسازول و آمیکاسین حساسیت داشتند. در این بررسی استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی بیشترین فراوانی را در بین جدایه‌ها داشتند و تایلورلا اکوئی جنیتالیس به عنوان عامل ناباروری در اسب های ترکمن شهرستان کلاله مطرح نمی‌باشد.

کلمات کلیدی: تایلورلا اکویی جنیتالیس، مقاومت دارویی، دستگاه تناسلی، مادیان، شیوع

Veterinary Researches & Biological Products No 137 pp: 83-90

Isolation and antibiotic resistance pattern of bacteria isolated from genital tract of Turkmen mares with emphasis on the isolation of *Taylorella equigenitalis*

By: Nafaspour, Y., Department of Microbiology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran. Ahani Azari, A., (Corresponding Author) Department of Microbiology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran. and Danesh, A., Health Management and Social Development Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

Received: 2021-12-22 Accepted:2022-02-26

Emali: ania_783@yahoo.com

Contagious equine metritis (CEM) is one of the highly communicable venereal diseases of horses, caused by the bacterium *Taylorella equigenitalis*. That is responsible for great economic damage to the horse breeding club. In addition to *T. equigenitalis* as a most important causes of infertility, other bacteria can also cause infertility.The aim of this study was to isolate and determine the antibiotic resistance pattern of bacteria from the genital tract of Turkmen mares by emphasizing the isolation of *T. equigenitalis* in Kalaleh. In this study, 52 samples were randomly taken from the clitoria fossa and sinuses of mares. After performing standard biochemical and microbiological tests, antibiotic susceptibility testing was performed by disk diffusion method according to CLSI instructions. Two methods of culture and PCR were used to identify *T. equigenitalis*. *T. equigenitalis* was not isolated from any of the samples by culture and PCR methods. A total of 91 bacterial strains were isolated, which were: 22% *Staphylococcus aureus*, 21% *Escherichia coli*, 14.5% *Klebsiella*, 12% *Vibrio*, 11% *Shigella*, 9% *Pseudomonas aeruginosa*, 9% *Corynebacterium* and 2.5%, respectively. *Enterococcus*. Gram-negative and Gram-positive isolates showed the highest antibiotic resistance to vancomycin (50.8%) and penicillin (60%), respectively. All isolates were sensitive to the antibiotics neomycin, trimethoprim / sulfamethoxazole and amikacin (100%). Conclusion: In this study *S. aureus* and *E. coli* had the highest frequency among isolates and *T. equigenitalis* was not considered as a cause of infertility in Turkmen horses in Kalaleh.

Key words: *Taylorella equigenitalis*, Drug resistance, Genital tract, Mares, Prevalence

مقدمه

یکی از دلایل عمده کاهش باروری در مادیان آلودگی دستگاه تولیدمثل این حیوانات با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا خصوصاً با منشاء باکتریایی می‌باشد. این عوامل بیماری‌زا می‌توانند به دنبال زایمان و یا در هنگام جفت‌گیری به دلیل باز بودن کانال زایمانی و مناسب بودن مایع آمنیوتیک و جفت برای تکثیر و رشد باکتری‌ها از مهبل به رحم نفوذ کرده و ایجاد عفونت نمایند (۵).

عامل محوری در پاتوژنز اندومتریت باکتریایی اسب، میزان توانایی پاکسازی رحم است. فاکتورهای میزبانی موثر در ایجاد عفونت باکتریایی رحم، ساختار ژنتیکی و وضعیت هورمونی مادیان، وجود انحرافات آناتومیک در دستگاه تناسلی، سن و از همه مهم‌تر فعالیت‌های موضعی سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی حیوان می‌باشند. سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی برای افزایش پاسخ التهابی آندومتر لازم هستند تا به فرایند فیزیولوژیکی پاکسازی رحم بعد از جفت‌گیری کمک کنند. اختلال در فرآیند پاکسازی ممکن است منجر به آندومتریت مزمن فعال گردد (۱۹). شایع‌ترین پاتوژن‌های باکتریایی فرصت‌طلب جدا شده از مهبل مادیان، استرپتوکوکوس اکوئی زیرگونه اپیدمیکوس، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس ائروژینوزا هستند که عفونت دستگاه تناسلی با این عوامل در طی لقاح طبیعی یا مصنوعی ممکن است منجر به اندومتریت و نازایی شود (۵ و۱۴). علاوه بر آن‌ها یکی از بیماری‌های مقاربتی مسری در مادیان متریت واگیر اسب است که توسط باکتری تایلورلا اکوئی جنیتالیس ایجاد شده و در موارد حاد سبب اندومتریت، نازایی موقت و به ندرت سقط می‌گردد (۶ و ۱۳). این بیماری عمدتاً از اروپا گزارش شده اما در اکثر کشورهای جهان مشاهده شده است. شناسایی و تشخیص این باکتری به دلیل سخت رشد بودن آن در محیط کشت اندکی سخت است (۱۵). در اکثر موارد بیماری ناشی از آن بهبود می یابد اما برخی از مادیان و نریان ممکن است ناقل شوند و کره اسب‌هایی که در هنگام زایمان آلوده می‌شوند می‌توانند به ناقل‌های بالینی بلندمدت تبدیل شوند. در اغلب موارد عفونت اولیه در مادیان به صورت تحت‌بالینی بوده و یکی از نشانه‌های عفونت در آن‌ها، بازگشت ماده اسب به سیکل های فحلی ناقص پس از جفت‌گیری با نر ناقل است. نرهای آلوده از نظر بالینی علائمی نداشته و در صورت عدم درمان، ماه‌ها

یا سال‌ها به عنوان ناقل‌های بدون علامت عمل کرده و با تماس جنسی یا لقاح مصنوعی بیماری را به مادیان منتقل می‌کنند. انتقال همچنین می‌تواند از طریق آلودگی ناخواسته کره اسب‌ها در زمان وضع حمل اتفاق بیفتد (۱۶ و۱۷).

ضررهای زیاد ناشی از این عفونت‌ها در صنعت پرورش اسب سبب شده است تا عفونت‌های رحمی باکتریایی طی دهه‌های اخیر مورد مطالعه قرار بگیرند (۱۹). به همین دلیل برای دامپزشکان بسیار مهم است که مادیان مثبت از نظر آلودگی رحم را تشخیص داده و آن‌ها را تحت درمان آنتی‌بیوتیکی قرار دهند. درمان آنتی بیوتیکی موثر باید مبتنی بر کشت و آزمایش تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی عوامل بیماری‌زای مربوطه باشد. اما به دلیل گران بودن و وقت‌گیر بودن این روش، دامپزشکان اغلب به صورت تجربی اقدام به تجویز آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف بر اساس شرایط مادیان می‌کنند. در این ارتباط می‌توان به گسترش مقاومت عوامل باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف نظیر پنی‌سیلین و تتراسیکلین در دهه‌های هفتاد تا نود قرن بیستم به دلیل استفاده بی‌رویه از آن‌ها به منظور پیشگیری از عفونت اشاره کرد. بنابراین با توجه به این که اطلاعات محدودی در این زمینه وجود دارد و برنامه‌های کنترل ملی فقط روی حیوانات تولید کننده مواد غذایی تمرکز می‌کنند، انجام مطالعات در خصوص شناسایی و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی عوامل بیماری‌زای باکتریایی ایجاد کنندهٔ عفونت در دستگاه تناسلی اسب‌ها به ویژه مادیان ضروری به نظر می‌رسد (۵).

لذا هدف از انجام این پژوهش جداسازی و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های جدا شده از دستگاه تناسلی مادیان نژاد ترکمن با تاکید بر جداسازی تایلورلا اکویی جنیتالیس در یک مطالعه مقطعی با استفاده از نمونه‌گیری تصادفی از مراکز پرورش و نگهداری اسب شهرستان کلاله واقع در استان گلستان بود که یکی از مراکز مهم پرورش این حیوان با ارزش در کشور به حساب می آید.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، کشت و شناسایی

در این مطالعه توصیفی- مقطعی با استفاده از سواب‌های استریل از ناحیه‌ی گودی و سینوس کلیتوریس مادیان ترکمن اسبداری‌های شهرستان کلاله به صورت تصادفی نمونه‌برداری صورت گرفت. از هر اسب ۳ سواب تهیه گردید. ۲ تا از سواب‌ها بلافاصله در محیط انتقالی آمس قرار داده شده و در کنار یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند. سوآب تهیه شده جهت انجام PCR درون میکروتیوب حاوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات قرار داده می‌شد. نمونه‌های گرفته شده کدگذاری شده و در پرسشنامه درج می‌گردید و مشخصات هر اسب شامل سن، سابقهٔ سقط، ناباروی، زایمان و وجود علائم ثبت می‌شد.

یکی از سواب‌های محیط انتقالی را روی محیط‌های بلاد آگار، بروموکروزول لاکتوز پرپل آگار و کینگ B به روش خطی کشت داده و پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. باکتری‌ها بر اساس مشخصات کلنی، رنگ‌آمیزی گرم، اندل، اوره، کواگولاز و سایر تست‌های بیوشیمیایی شناسایی گردیدند. برای تهیه کشت خالص از محیط کشت بلاد آگار استفاده شد (۳).

سواب دیگر روی محیط‌های کشت شکلات آگار بدون مهارکننده (مهارکننده‌ها ممکن است از جداسازی بعضی از سویه‌های تایلورلا اکوئی جنیتالیس جلوگیری کنند)، شکلات آگار حاوی سولفات استرپتومایسین (۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای تمایز بیوتیپ‌های حساس یا مقاوم به استرپتومایسین، و شکلات آگار با مهارکننده (حاوی ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر تری‌متوپریم، ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر کلیندامایسین و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر آمفوتریسین B) که امکان رشد هر دو بیوتیپ مقاوم و حساس به استرپتومایسین را فراهم می‌کند و به خصوص برای سرکوب رشد باکتری کومنسال و مهار رشد قارچ مفید است به روش خطی کشت داده و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۶ روز در ۵ درصد CO_2 گرماگذاری شدند (۱۶). کلنی‌های سفید پهن ۰/۸ تا ۱ میلی‌متر، میله‌ای گرم منفی، کاتالاز و اکسیداز مثبت، نیترات، اندل، اوره آز، دکستروز و تولید H_2S منفی مشکوک به تایلورلا اکوئی جنیتالیس در نظر گرفته شده و برای تایید از تست PCR استفاده می گردد (۸).

تست حساسیت آنتی بیوتیکی

برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها به دیسک‌های آنتی بیوتیکی (خریداری شده از شرکت پاتن طب، ایران) شامل آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، تری‌متوپریم/سولفامتوکسازول (۱/۲۵ میکروگرم)، سفازولین (۳۰ میکروگرم)، سفالوتین (۳۰ میکروگرم)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم) و نئومایسین (۳۰ میکروگرم) از روش انتشار از دیسک کربی بائر مطابق با دستورالعمل‌های مؤسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) استفاده شد. برای کنترل کیفیت از سویهٔ استاندارد *E. coli* ATCC ۲۵۹۲۲ استفاده شد.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق (۶).

محصول PCR	توالی (۳⟵۵)	آغازگر
۵۸۵ bp	‘۳ ;CAGCATAAGGAGAGCTTGCTT’YTCT-‘۵	۱۶S-F
	‘۳;CTCGACAGYTAGAAATGCAGT-‘۵	۱۶S-R

(تهیه شده از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) استفاده شد. پس از گرماگذاری پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت هالهٔ عدم رشد اندازه‌گیری شده و نتایج تفسیر شدند. حساسیت جدایه‌ها به هر آنتی‌بیوتیک به صورت حساس، نسبتا مقاوم یا مقاوم گزارش شدند (۷).

شناسایی مولکولی

برای ردیابی تایلورلا اکوئی جنیتالیس میکروتوپ حاوی بافر فسفات و سوآب تهیه شده جهت آزمایش PCR ورتکس گردید تا مواد چسبیده به سواب با بافر یکنواخت شود. با کمك پنس استریل سوآب از درون میکروتیوپ خارج شده و میکروتیوب به مدت ۲ دقیقه در دور g ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس محلول بالایی خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به میکروتیوب اضافه گردید و میکروتیوب مجدداً ورتکس شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. بعد از ۱ دقیقه سانتریفوژ در دور g ۱۳۰۰۰ از مایع رویی به عنوان DNA در آزمایش PCR استفاده گردید (۱۵). البته ابتدا کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با بردن روی ژل آگاروز ۱ درصد بررسی شد.

با استفاده از یک جفت آغازگر که توالی‌های آنها در جدول ۱ آورده شده است واکنش PCR انجام شد. برای انجام PCR، به مسترمیکس ۲X (سیناژن، ایران) یک میکرولیتر از هر آغازگر (۲۰پیکومول)، ۵ میکرولیتر DNA و ۱۹ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده شد. تکثیر با ۳۰ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، پیوند در دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد برای یک دقیقه انجام شد. واسرشت اولیه و گسترش نهایی به ترتیب در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه و دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس فرآورده PCR روی ژل آگاروز یک درصد برده شد. اندازه قطعه تکثیر شده مورد نظر ۵۸۵ bp می‌باشد (۶).

نتایج

طی یک دوره ۶ ماهه (از فروردین تا شهریور ۱۳۹۹) در مجموع تعداد ۵۲ نمونه از مادیان جمع‌آوری و جهت شناسایی هر یک از جدایه‌ها تست‌های تشخیصی مربوطه گذاشته شد. همچنین اطلاعاتی نظیر (سن، سابقه سقط و نازایی، وجود علائم و سابقه زایمان) ثبت گردید. همه مادیان تحت بررسی به ظاهر سالم بوده و علائم بالینی نداشتند. حداقل و حداکثر سن مادیان به ترتیب ۲ و ۱۵ سال بود و ۱۹/۲درصد از آن‌ها (۱۰راس) سابقه سقط و نازایی داشتند. ۲۵ درصد از مادیان (۱۳ راس) آبستن بودند. ۷۱/۱ درصد از آن‌ها (۳۷ راس) کمتر از یکسال از زایمان آن‌ها می‌گذشت.

در این مطالعه از هیچیک از نمونه‌ها به روش کشت و PCR تایلورلااکویی جنتیالیس جدا نشد. در مجموع ۹۱ باکتری جداسازی و شناسایی شدند که ۶۷ درصد آن‌ها گرم منفی و ۳۳ درصد آن‌ها گرم مثبت بودند. این جدایه‌ها به ترتیب از نظر فراوانی عبارت بودند از: استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه، ویبریو، شیگلا، سودوموناس آئروژینوزا، کورینه باکتر و انتروکوک. تعداد و درصد باکتری‌های جدا شده از نمونه‌ها در جدول دو آورده شده است.

جدایه‌های گرم منفی بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین (۵۰/۸ درصد) از خود نشان دادند، در حالی که در جدایه‌های گرم مثبت بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک پنی‌سیلین (۶۰ درصد) مشاهده شد. همهٔ جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نئومایسین، تری‌متوپریم/سولفامتوکسازول و آمیکاسین (۱۰۰ درصد) حساسیت داشتند. جدایه‌های اشرشیاکلی با بیشترین فراوانی در بین گرم منفی‌ها بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین (۱۰۰درصد)، ونکومایسین (۸۹/۴ درصد) و پنی سیلین (۴۷/۳ درصد) از خود نشان دادند.

جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با بیشترین فراوانی در بین گرم مثبت‌ها بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های

جدول ۲- تعداد و درصد باکتری‌های جداشده از نمونه‌های جمع‌آوری شده در این مطالعه.

جدایه ها	تعداد	فراوانی (درصد)
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۰	۲۲
اشرشیا کلی	۱۹	۲۱
کلبسیلا پنومونیه	۱۳	۱۴/۵
ویبریو	۱۱	۱۲
شیگلا	۱۰	۱۱
سودوموناس ائروژینوزا	۸	۹
کورینه باکتر	۸	۹
انتروکوک	۲	۲/۵

پنی‌سیلین (۸۰ درصد)، ونکومایسین (۳۰ درصد) و تتراسایکلین (۱۵درصد) از خود نشان دادند و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش حساس بودند. جدایه‌های کورینه باکتر نسبت به هیچیک از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم نبودند (جداول ۳ و۴).

در بین جدایه‌های گرم منفی به ترتیب ۹ درصد، ۱۵/۳ درصد و ۵۰ درصد جدایه‌های اشرشیاکلی، کلبسیلا و سودوموناس ائروژینوزا دارای مقاومت چندگانه بودند. در سایر جدایه‌های گرم منفی (شیگلا و ویبریو) هیچ گونه مقاومتی نسبت به بیش از سه کلاس آنتی‌بیوتیکی مشاهده نشد. در بین جدایه‌های گرم مثبت به ترتیب ۱۵ درصد و ۵۰ درصد جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوک دارای مقاومت چندگانه بودند.

بحث

متریت واگیر اسب یک بیماری مقاربتی بسیار مسری است که می‌تواند به طور گسترده‌ای از یک ناقل بدون علامت به ویژه اسب نر گسترش یابد. اسب‌های آلوده به طور سیستماتیک بیمار نمی‌شوند یا نمی‌میرند، اما شانس باروری در آن‌ها کاهش می‌یابد و از این نظر خسارت‌های اقتصادی زیادی به بار می‌آورند. بنابراین تشخیص به هنگام و دقیق این بیماری می‌تواند به طور قابل توجهی شیوع و خسارات احتمالی آن را کاهش دهد. همانطور که پیشتر گفته شد یکی از مشکلات تشخیص این بیماری سخت‌رشد بودن تایلورلا اکویی جنیتالیس در محیط کشت می‌باشد. به علاوه آزمایشات سرولوژیکی فقط در مادیان و برای دوره‌های کوتاه مفید است. در سال‌های اخیر استفاده از روش های مولکولی از جمله PCR شناسایی دقیق و سریع این بیماری را میسر کرده است (۱۶ و ۱۷). لذا با توجه به این که در استان گلستان تحقیقی در خصوص وجود این باکتری در باشگاه‌های پرورش اسب صورت نگرفته بود در یک مطالعه مقطعی از مادیان نژاد ترکمن باشگاه‌های پرورش اسب شهرستان کلاله نمونه‌برداری صورت گرفت که نتیجه آن هم به روش کشت و هم PCR منفی بود.

اولین بار در سال ۱۳۸۰ تایلورلا اکویی جنیتالیس در ایران توسط ابراهیمی و همکاران از دو راس مادیان در یک باشگاه پرورش اسب در شهرکرد به روش کشت گزارش شد (۸). در سال ۱۳۸۴ الیاسی با بررسی ۸۰ رأس اسب در اسبداری‌های اطراف تهران با استفاده از روش PCR موفق به شناسایی و تشخیص تایلورلا اکویی جنیتالیس از ۹ رأس مادیان و ۳ رأس نریان شد که ۷ رأس از این مادیان، از نظر بالینی بدون علامت بوده و تنها ۲ رأس دارای عفونت رحمی بودند. همچنین در این مطالعه مشخص شد وجود تایلورلا به سن مادیان، وجود علائم و آبستن بودن یا نبودن بستگی ندارد (۹). در سال ۱۳۹۳ پورمهدی بروجنی و همکاران وجود تایلورلا اکویی جنیتالیس را در اسب عرب استان خوزستان از طریق کشت و PCR بررسی کردند که مطابق با نتایج مطالعه حاضر در هیچیک از روش‌ها این باکتری جدا نشد (۱۵). Erdam و همکاران طی دو سال تحقیق بر روی ۱۰۰۰ رأس اسب (۲۷۸ نریان، ۷۲۷ مادیان) در ۴۸ ایالت آمریکا موفق به جداسازی تایلورلا اکویی جنیتالیس در ۲۲ رأس نریان و ۵ رأس مادیان شدند. از مادیان مثبت، تنها ۲ مورد دارای ترشحات مهبلی بودند و فقط یکی از آنها مشکل ناباروری داشت (۱۰). Ozgur و همکاران نیز در سال ۲۰۰۱ اولین بار در ترکیه تایلورلا اکویی جنیتالیس از

جدول ۳- مقاومت آنتی بیوتیکی هر یک از جدایه ها در این مطالعه.

جدایه ها	تعداد	N	P	S	GM	C	CP	TE	SXT	CZ	AN	CF	V
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۰	۰	۱۶	۱	۰	۰	۰	۳	۰	۰	۰	۰	۶
اشرشیا کلی	۱۹	۰	۹	۰	۰	۰	۱۹	۴	۰	۰	۰	۱	۱۷
کلبسیلا پنومونیه	۱۳	۰	۲	۰	۰	۱	۰	۲	۰	۰	۰	۰	۲
ویبریو	۱۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱
شیگلا	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۳
سودوموناس ائروژینوزا	۸	۰	۰	۱	۱	۸	۲	۰	۰	۳	۰	۴	۸
کورینه باکتر	۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
انتروکوک	۲	۰	۲	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۱	۰

P ، پنی سیلین S، استرپتومایسین GM ، جنتامایسین، AN، آمیکاسین، CP ، سیپروفلوکساسین ، SXT ، تری متوپریم/ سولفامتوکسازول، N نئومایسین، C کلرامفنیکل، CZ سفازولین،V ونکومایسین،TE تتراسایکلین،CF سفالوتین.

دو مادیانی جدا کردند که یکی از آن‌ها سابقه ناباروری داشت و دیگری مبتلا به اندومتریت بود. علاوه بر این، طی مطالعات جداسازی، از اکثر نمونه‌ها استرپتوکوک، استافیلوکوک، اشرشیا، کلبسیلا، انتروباکتر، کورینه باکتریوم و باسیلوس جدا شده بود (۱۳). طبق گزارش Rocha نیز در سال ۲۰۰۸، ۷ مورد مثبت تایلورلا اکویی جنیتالیس در پرتغال (در ۱ راس اسب وارداتی و ۴ راس اسب همان اسبداری) مشاهده شد که تحت درمان قرار گرفتند. مجددا در سال ۲۰۱۶ همه نریان و مادیان از نظر وجود این باکتری آزمایش شدند که نتیجه کشت و PCR همهٔ آن ها منفی بود (۱۶). در ژاپن Anzai و همکاران در سال ۲۰۰۱ از بررسی ۱۲۳۵۶ رأس اسب ۱۱ مورد مثبت تایلورلا اکویی جنیتالیس گزارش کردند. بعدها در سال ۲۰۰۲ چهار مورد، در سال ۲۰۰۳ دو مورد و در سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵ یک مورد مثبت مشاهده شد. در سال ۲۰۱۱ هیچ موردی از این بیماری در اسب‌ها مشاهده نشد (۴). در مطالعه‌ای در کرواسی در سال ۲۰۱۷ نیز هیچ کشت مثبتی از تایلورلا اکوئی یجنیتالیس به دست نیامد اما PCR یکی از نمونه‌ها مثبت شد (۱۷). در سال ۲۰۰۹ Tel و همکاران به روش PCR در ۸ رأس نریان و ۵ رأس مادیان موفق به شناسایی تایلورلا اکویی جنیتالیس از اسب‌های تروبرد (۹۰ نریان، ۸۰ مادیان) ناحیه Sunliurfa ترکیه شدند، در حالی که این نمونه‌ها در روش کشت منفی بودند (۱۸). به طور مشابه Zdovc و همکاران درسال ۲۰۰۵ در اسلونی به روش PCR تنها سه مورد مثبت از نظر تایلورلا اکویی جنیتالیس از بین ۲۴۵ رأس نریان گزارش کردند و تمامی آنها به روش کشت منفی بودند (۲۰). بر اساس نتایج مطالعه اخیر و سایر مطالعات درصد جداسازی تایلورلا اکوئی جنیتالیس بین صفر تا ۷/۶ درصد بوده است که بیانگر شیوع بسیار کم این باکتری در نقاط مختلف دنیا می باشد.

البته در سراسر دنیا علاوه بر تایلورلا اکویی جنیتالیس در خصوص آلودگی دستگاه تناسلی مادیان با سایر باکتری‌ها نیز تحقیقاتی انجام شده است. در پژوهش حاضر فراوان‌ترین باکتری‌های جدا شده استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی بودند که به ترتیب بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۵۳/۳ درصد) و سیپروفلوکساسین (۳۱/۱ درصد) از خود نشان دادند.

در تحقیقی که Albihn و همکاران در سال ۲۰۰۳ در سوئد و Benko و همکاران در سال ۲۰۱۵ در اسلواکی انجام دادند در بین باکتری‌های جدا شده از رحم مادیانی که مشکلات باروری داشتند بیشترین فراوانی مربوط به استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک و اشرشیا کلی بود (۲ و ۵). در مطالعه‌ای مشابه در ایتالیا استرپتوکوک‌های گروه C و اشرشیا کلی بیشترین فراوانی را در بین جدایه‌ها داشتند (۱۲). Ferrer و Palomares در سال ۲۰۱۸ از مادیان مبتلا به متریت بعد از زایمان انواع باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را جدا کردند که اشرشیاکلی بیشترین فراوانی را در بین جدایه‌ها داشت (۱۱). Pisello و همکاران نیز در سال ۲۰۱۹ اشرشیاکلی و استرپتوکوکوس اکوئی زیرگونه اپیدمیکوس را به عنوان فراوان‌ترین باکتری‌های جدا شده از اندومتریت گزارش کردند (۱۴). در سوئد نیز طی سال‌های ۲۰۰۷ تا ۲۰۱۷ کلبسیلا پنومونیه و استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک بیشترین فراوانی را در دستگاه تناسلی نریان داشتند و هیچ موردی از تایلورلا اکوئی جنیتالیس مثبت نبود (۳). مطالعه‌ای در عراق باکتری‌های

جدول ۴- نتایج آزمایش حساسیت ضدمیکروبی جدایه‌ها در این مطالعه.

آنتی‌بیوتیک‌ها	حساسیت تعداد (درصد)	نسبتا مقاوم تعداد (درصد)	مقاوم تعداد (درصد)
سیپروفلوکساسین	۶۹ (۷۵/۸)	۱ (۱)	۲۱ (۲۳)
جنتامایسین	۹۰ (۹۷/۸)	۰ (۰)	۱ (۱)
پنی سیلین	۶۰ (۶۵/۹)	۲ (۲/۱)	۲۹ (۳۱/۸)
تری متوپریم/سولفومتوکسازول	۹۱ (۱۰۰)	۰(۰)	۰ (۰)
آمیکاسین	۹۱ (۱۰۰)	۰(۰)	۰ (۰)
استرپتومایسین	۸۱ (۸۹)	۸ (۸/۷)	۲ (۲/۱)
سفازولین	۸۵ (۹۳/۴)	۳ (۳/۲)	۳ (۳/۲)
کلرامفنیکل	۸۴ (۹۲/۳)	۲ (۲/۱)	۵ (۵/۴)
نئومایسین	۹۱ (۱۰۰)	۰(۰)	۰ (۰)
ونکومایسین	۴۱ (۴۵)	۱۳ (۱۴/۲)	۳۷ (۴۰/۶)
تتراسایکلین	۷۳ (۸۰/۲)	۸ (۸/۷)	۱۰ (۱۰/۹)
سفالوتین	۸۲ (۹۰/۱)	۳ (۳/۲)	۶ (۶/۵)

جدا شده از عفونت دستگاه تناسلی مادیان عرب را به ترتیب فراوانی کلستریدیوم تتانی، آرکانوباکتریوم پیوژنز و سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتر ائروژنز، کلبسیلا پنومونیه، استرپتوکوکوس‌دیس‌آگالاکتیه زیرگونه اکوئی‌سمیلیس، اکتینوباسیلوس اکوئی‌لی، استرپتوکوکوس زئواپیدمیکوس، استافیلوکوکوس اورئوس، پروتئوس ولگاریس و اشرشیا کلی گزارش کرد (۱).

بر اساس نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر و سایر مطالعات باکتری اشرشیاکلی یکی از فراوان‌ترین باکتری‌های جدا شده از دستگاه تناسلی مادیان بود. در خصوص حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها گزارشات مختلفی وجود دارد اما در اکثر مطالعات به مقاومت زیاد جدایه‌ها به پنی‌سیلین و حساسیت نسبتا بالای آن‌ها به آمیکاسین اشاره شده است. در این مطالعه همچنین ۵۰ درصد جدایه‌های سودوموناس ائروژینوزا و انتروکوک دارای مقاومت چندگانه بودند. باید توجه نمود که گونه‌های باکتریایی جدا شده و همچنین حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها با گذشت زمان و در بین جمعیت اسب ها متفاوت می‌باشند. این تفاوت ممکن است ناشی از اختلاف در سیاست‌های درمان آنتی‌بیوتیکی، مدیریت مراکز نگهداری اسب، نژاد و تاریخچه بالینی مادیان مورد مطالعه و همچنین روش‌های رایج میکروبیولوژیکی باشد (۲).

نتیجه‌گیری

خوشبختانه در مطالعه حاضر و اکثر مطالعات تایلورلا اکویی جنیتالیس به دو روش کشت و PCR جدا نشد و یا فراوانی آن‌ها کمتر از ۷/۶ درصد بود اما از آنجایی که حیوانات ناقل بدون علامت هستند تشخیص به هنگام و دقیق این بیماری لازم و ضروری به نظر می‌رسد. لذا انجام مطالعات دوره‌ای برای بررسی کاهش خسارت‌های اقتصادی ناشی از آن و سایر باکتری‌ها توصیه می‌شود. از طرفی برای به روز شدن اطلاعات در خصوص پروتکول‌های درمانی عفونت‌های دستگاه تناسلی مادیان و نریان و همچنین به منظور جلوگیری از ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم انجام تست آنتی بیوگرام پیش از تجویز دارو پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر مستخرج از پایان‌نامه آقای یاسر نفس پور برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشتهٔ میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی گرگان می‌باشد. محققین این مطالعه برخود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی و مسئولین آزمایشگاه که نهایت همکاری را با ما داشته اند صمیمانه تشکر به عمل آورند.

منابع مورد استفاده

1- AL-Abidy, H. F. 2010. Isolation and identification of pathogenic bacteria from genital tract of the Arabian mares affected with genital tract infection and antimicrobial sensitivity. *Iraqi Journal of Veterinary Science* 24(2): 143-148.

2- Albihn, A., Båverud, V., Magnusson, U. 2003. Uterine Microbiology and Antimicrobial Susceptibility in Isolated Bacteria from Mares with Fertility Problems. *Acta Veterinaria Scandinavica* 44: 121-129.

3- Al-Kass, Z., Eriksson, E., Bagge, E., Wallgren, M., Margaret Morrell, J. 2019. Bacteria detected in the genital tract, semen or pre-ejaculatory fluid of Swedish stallions from 2007 to 2017. *Acta Veterinaria Scandinavica* 61 (25): 1-6.

4- Anzai, T., Kamada, M., Niwa, H. 2011. Contagious Equine Metritis Eradicated from Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 74 (4): 519-522.

5- Benko, T., Boldizar, M., Novotny, F., Hura, V., Valocky, I., Dudrikova, K., Karamanova, M., Petrovic, V. 2015. Incidence of bacterial pathogens in equine uterine swabs, their antibiotic resistance patterns, and selected reproductive indices in English thoroughbred mares during the foal heat cycle. *Veterinarni Medicina* 60 (11): 613–620.

6- Bleumink-Pluym, N. M. C., Werdler, M. E. B., Houwers, D.J., Parlevliet, J. M., Colenbrander, B. and Van der Zeijst, B.A. M. 1994. Development and evaluation of PCR test for detection *Taylorella equigenitalis*. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 893–896.

7- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 2013. Approved Standard M2-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Institute.

8- Ebrahimi, A., Esfandabadi, N., Zahraei Salehi, T. 2003. Investigation of *Taylorella equigenitalis* in clitorial samples mare populations in Shahrekord. *Journal of Faculty Veterinary Medicine University of Tehran* 58(2), 95-96.

9- Eliassy, M.A. 2005. Investigation of contagious equine metritis using culture and PCR in a number of farms around Tehran. DVM thesis. Tehran University, Tehran, Iran.

10- Erdam, M., Creekmore, L.H., Fox, P.E., Pelzel, A.M., Spalding, B.A., Aalsburg, A.M. and Cox, L.K. 2011. Diagnostic and epidemiologic analysis of the 2008-2010 investigation of multi-year outbreak of contagious equine metritis in the United States. *Preventive Veterinary Medicine* 101: 219-228.

11- Ferrer, MS., Palomares, R. 2018. Aerobic uterine isolates and antimicrobial susceptibility in mares with post-partum metritis. *Equine Veterinary Journal* 50(2): 202-207.

12- Frontoso, R., De Carlo, E., Pasolini, MP., van der Meulen, K., Pagnini, U., Iovane, G., De Martino, L. 2008. Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. *Research in Veterinary Science* 84(1): 1-6.

13- Ozgur, N. Y., Ikiz, S., Carioglu, B., Kilicarslan, R., Yilmaz, H., Akay, 0, Ilgaz, A. 2001. Contagious equine metritis in Turkey: first isolation of *Taylorella equigenitalis* from mares. *Veterinary Record* 149: 120-122.

14- Pisello, L., Rampacci, E., Stefanetti, V., Beccati, F., Rose Hyatt,Mauro Coletti D., Passamonti, F. 2019. Temporal efficacy of antimicrobials against aerobic bacteria isolated from equine endometritis: an Italian retrospective analysis (2010–2017). *Veterinary Record* 1-6pp.

15- Pourmahdi Borujeni, M., Gharibi, D., Memari, S. 2014. Detection of *Taylorella equigenitalis* in Arabian horse of Khuzestan province by culture and PCR. *Veterinary Journal* 104: 2-8.

16- Rocha, T. 2016. Contagious equine metritis in Portugal: A retrospective report of the first outbreak in the country and recent contagious equine metritis test results. *Veterinary Journal* 6(3): 263-267.

17- Štritof, Z., J. Habuš, V. Mojčec Perko, M. Majh ut, N. Brkljača Bottegaro, M. Perharić, S. Hađina, Z. Milas, N. Turk. 2017. Detection of *Taylorella equigenitalis* and *Taylorella asinigenitalis* in horses in Croatia as a result of small scale survey. *Veterinarski arhiv* 87: 535-541.

18- Tel, O.Y., Kesin, O., Zonturlu, A., and Yurdidin, N. 2010. Detection of *Taylorella equiegenitalis* in horses by Means of Bactriological Culture and PCR in Sanliurfa, Turkey. *Kafkas University of veterinary Fak Derg* 16 (4), 605-609.

19- Wittenbrink, M., Hoelzle, K., Hoelzle, L. 2008. What's new in bacteriology of the mare's genital tract? *Pferdeheilkunde* 24 (1): 53-55.

20- Zdovc, I., Ocepek, M., Gruntar, I., Pate, M., Klobucar, I., and Krt, B. 2005. Prevalence of *Taylorella equigenitalis* infection in stallions in Slovenia: bacteriology compared with PCR examination. *Equine Veterinary Journal* 37(3): 217-221.