



Scan online to view this article

## Virulence factors pattern of *Escherichia coli* strain isolated from endometritis in mares in Chaharmahal and Bakhtiari province

Leila Kiani Borujeni, Hasan Momtaz \*

Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

**Aim and Background:** Endometriosis is one of the major causes of decreased fertility in mares which is caused by various infectious agents, the most common of which is *Escherichia coli*. The aim of this study was to determine the virulence factors pattern in *Escherichia coli* isolated from endometriosis cases in mares.

**Materials and Methods:** In this study, 136 mares with a history of infertility and pregnancy problems were studied in Chaharmahal and Bakhtiari province. After sampling by uterine siphoning and microbial culture of the samples, molecular confirmation of the isolated *Escherichia coli* strains and the presence of the most common virulence factors in these strains were used by PCR method.

**Results:** From 136 studied samples, 22 (16.17%) were infected with *Escherichia coli*. It was recognized that *fimH* (90.9%), *afa/draBC* and *cnf1* (72.7%) had the highest while *papGIII* (27.2%), and *traT* (18.8%) had the lowest distributions of virulence genes in these strains.

**Conclusions:** The results of this study showed that one of the dominant bacteria causing endometriosis in *Escherichia coli* material is the presence of a variety of virulence factors in *Escherichia coli* strains indicating direct involvement of these agents in bacterial pathogenicity.

**Keywords:** Endometriosis, *Escherichia coli*, virulence factors, mare, Chaharmahal and Bakhtiari province.

#### Corresponding author:

Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Email: hamomtaz@iaushk.ac.ir



## تعیین الگوی فاکتورهای بیماری‌زایی در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از مادیان‌های آلوده به اندومتريوز در استان چهارمحال و بختیاری

لیلا کیانی بروجنی، حسن ممتاز\*

گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** اندومتريوز یکی از علل مهم کاهش باروری در مادیان است که توسط عوامل عفونی مختلفی ایجاد می‌شود که شایع‌ترین آن‌ها *اشریشیاکلی* است. هدف از این تحقیق تعیین الگوی عوامل بیماری‌زایی در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد اندومتريوز در مادیان بود.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش جهت تعیین الگوی عوامل بیماری‌زایی باکتری *اشریشیاکلی* بر روی ۱۳۶ رأس مادیان دارای سابقه ناباروری و مشکلات آبستنی در سطح استان چهارمحال و بختیاری بررسی انجام شد و به‌منظور تشخیص اولیه اندومتريوز از تصاویر اولتراسونوگرافی استفاده شد. پس از اخذ نمونه‌ها به‌وسیله سیفوناژ رحمی و کشت میکروبی نمونه‌ها، جهت تأیید مولکولی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده و حضور شایع‌ترین عوامل بیماری‌زایی در این ایزوله‌ها از روش PCR استفاده شد.

**یافته‌ها:** از ۱۳۶ نمونه مورد مطالعه، تعداد ۲۲ نمونه (۱۶/۱۷) آلوده به *اشریشیاکلی* بودند. در ایزوله‌های جدا شده اکثر عوامل بیماری‌زایی در بیماری‌زایی جرم ردیابی شد طوری که ژن‌های *fimH* با فراوانی ۹۰/۹ درصد و *afa/draBC, cnfI* با حضور ۷۲/۷ درصد شایع‌ترین و ژن‌های *PapGIII* با فراوانی ۲۷/۲ درصد و *traT* با حضور ۱۸/۸ درصد نادرترین ژن‌های بیماری‌زایی ردیابی شده در این ایزوله‌ها بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این بررسی نشان داد که یکی از باکتری‌های غالب ایجاد کننده اندومتريوز در مادیان باکتری *اشریشیاکلی* بوده و حضور انواع فاکتورهای بیماری‌زایی در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* نشان‌گر دخالت مستقیم این عوامل در بیماری‌زایی باکتری است.

**واژه‌های کلیدی:** اندومتريوز، *اشریشیاکلی*، عوامل بیماری‌زایی، مادیان، استان چهارمحال و بختیاری

### مقدمه

اندومتريوز (Endometritis) عفونی یکی از علل عمده نازایی

#### نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران  
پست الکترونیکی: hamomtaz@iaushk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۵

در اسب و در نتیجه آسیب جدی در صنعت پرورش اسب است. اندومتريوز یکی از مهم‌ترین علل کاهش باروری در مادیان است که در حالت حاد، نفوذ سلول‌های چند هسته‌ای به اندومتر رحم در پاسخ به عامل التهابی را در بر می‌گیرد. به‌طور عمومی به‌دنبال عدم موفقیت در درمان اندومتريت‌های حاد، التهاب و عفونت، مزمن شده و باعث تغییرهای مزمن تحلیل برنده، در رحم شده و اندومتريت مزمن ایجاد می‌شود (۱،۲).

توانایی ایجاد بیماری در رحم را دارد. که این عوامل بیماری-زایی در ایزوله‌های مختلف دارای توزیع متفاوتی هستند (۷-۵).

اشریشیاکلی یا به‌طور اختصار *E. coli* نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه (*Enterobacteriaceae*) است که به‌طور شایع در روده جانوران خون‌گرم وجود دارد. بیش‌تر سویه‌های اشریشیاکلی، بی‌آزارند اما برخی از سروتیپ‌ها مانند HV موجب مسمومیت غذایی و اسهال می‌شوند. این سویه‌های بی‌آزار، بخشی از فلور نرمال روده هستند. آن‌ها در تولید ویتامین K نقش دارند و از استقرار باکتری‌های بیماری‌زا در روده جلوگیری می‌کنند. هم‌چنین شایع‌ترین عامل عفونت دستگاه ادراری هستند (۸،۹).

در این مطالعه ضمن جداسازی *E. coli* از موارد اندومتريوز در مادیان‌هایی که دارای مشکلات تولیدمثلی هستند و آبستن نشده‌اند، الگوی توزیع انواع عوامل بیماری‌زایی، به‌روش مولکولی بررسی شده است.

## روش کار

### جمع‌آوری نمونه‌ها

تعداد ۱۳۶ نمونه مایع حاصل از شست‌وشوی رحم (قبل از تزریق آنتی‌بیوتیک) از مادیان‌های مبتلا به مشکلات تولید-مثلی (عدم آبستنی به دنبال کشش) با استفاده از سوندرحمی، در حجم ۲۰ میلی‌لیتر در ظروف استریل مخصوص نمونه‌گیری ادرار اخذ شد. همراه هر نمونه اطلاعاتی نظیر سن مادیان، تعداد شکم زایمان کرده، سابقه مشکلات تولیدمثلی (سقط جنین، عفونت رحمی، عفونت واژن و...) تهیه و نمونه‌ها در مجاورت یخ در اسرع وقت به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد شهرکرد منتقل گردید.

### کشت و جداسازی باکتری اشریشیاکلی

نمونه‌های مایع رحمی اخذ شده در ۱۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب حاصله در محیط مایع TSB (Tryptic Soy Broth) به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شد. باکتری غنی شده در محیط EMB

اندومتريوز یک نوع التهاب مزمن و یا عفونت مخاطی دهانه رحم است. تحقیقات نشان می‌دهد برخی بیماری‌های دستگاه ادراری اسب می‌تواند روی باروری تأثیرگذار باشد؛ اندومتريوز یک اصطلاح کلی است که به این عوارض اشاره دارد و عوامل مختلفی می‌تواند منشأ بروز آن باشد؛ که شامل: اندومتريوز قارچی و اندومتريوز باکتریایی است. بسیاری از قارچ‌ها می‌توانند به‌واسطه ضعیف شدن سیستم ایمنی بدن اسب به خاطر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، فعال شوند و اسب را دچار مشکل کنند. اندومتريوز باکتریایی که شناخته شده‌تر است یکی از رایج‌ترین علل ناباروری در اسب به شمار می‌رود. برخی این عارضه را اصلی‌ترین عامل ناباروری یا عدم تحمل جنین در اسب می‌دانند (۱،۳،۴).

اندومتريوز رتبه سوم اهمیت را بعد از کولیک و بیماری‌های تنفسی در اسب دارد. مطالعه‌های قبلی نشان داده است که شایع‌ترین علل باکتریایی عفونت رحم عبارتند از: استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک (*Streptococcus β hemolytic*)، استرپتوکوکوس زوایدیمیکوس (*Streptococcus zooepidemicus*)، اشریشیاکلی (*Escherichia coli*)، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*)، سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*)، باکتریوئیدس فراژیلیس (*Bacteroides fragilis*) و باکتریوئیدس آئروژولیتیکوس (*Bacteroides ureolyticus*)، پروتئوس میرابیلیس (*Proteus mirabilis*) (۴، ۵).

از میان این عوامل اشریشیاکلی یکی از مهم‌ترین آن‌هاست، که به‌دلیل داشتن عوامل بیماری‌زایی (Virulence Factors) از جمله:

*hly aroN fimH, iuc fimA, cbpA, plo, lktA, MDR fyuA, ompT, iha, lysP, iss, icd A, fadD, clpX acp C, uidA, mdh, sfaE, focG, afaC, sfaD, afaB, papC abeA, kpsMTII, hra1 hlyE*

ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. وجود قطعه ۹۱۹ جفت بازی تکثیر یافته در این واکنش نشان‌گر وجود اشریشیاکلی در ایزوله‌های مورد مطالعه بود.

### ردیابی ژن‌های بیماری‌زایی

جهت ردیابی شایع‌ترین عوامل بیماری‌زایی در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از موارد اندومتريوز شامل ژن‌های *fimH*, *Afa/draBC*, *cnf1*, *cnf2*, *csgA*, *cvaC*, *fyuA*, *ibeA*, *iutA*, *KpsMTII*, *PAI*, *papC*, *papGII,III*, *sfa/focDE*, *traT* از زوج‌های پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ به روش PCR استفاده شد (۱۱).

بسته به اندازه قطعه مربوط به هر یک از ژن‌های فوق واکنش PCR در ۳ واکنش جداگانه طبق اجزاء و شرایط ذکر شده در جدول ۲ انجام شد (۱۱):

(Eosin Methylene Blue) (Merck, Germany) کشت و پرگنه‌های لاکتوز مثبت واجد جلای سبز فلزی (متالیک) انتخاب و جهت تأیید هویت *E. coli* آزمون‌های بیوشیمیایی نظیر کشت در محیط (TSI Triple) (Merck, Germany) (Sugar Iron)، انجام آزمایش IMViC و اوره روی پرگنه‌های منتخب انجام گرفت. پرگنه‌هایی که دارای واکنش اندول مثبت، متیل رد مثبت، وژس پروسکوئر منفی و سیترات منفی در آزمایش IMViC، واکنش اسید/اسید در محیط TSI و اوره آز منفی بودند، به عنوان پرگنه‌های اشریشیاکلی انتخاب شدند. ایزوله‌های *E. coli* جدا شده جهت مطالعه‌های بعدی در محیط TSB کشت و نگهداری شدند (۱۰).

### تأیید قطعی اشریشیاکلی

جهت استخراج DNA ژنومی از ایزوله‌های اشریشیاکلی رشد یافته در محیط TSB از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد. به منظور تأیید قطعی باکتری از ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله‌ها استفاده شد. جهت ردیابی ژن فوق از زوج پرایمرهای زیر به روش PCR استفاده گردید (۱۰).

16srRNAF: 5'AGAGTTTCATCMTGGCTCAG 3'

16srRNAR: 5'CCGTCAATTCATTCAGTTT 3'

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر 10x PCR buffer، ۱ میلی‌مول MgCl<sub>2</sub>، ۱۵۰ میکرومول dNTP Mix (Fermentas, Lithuania)، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R (CinnaGen, Iran)، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (Fermentas, Lithuania) و ۴ میکرولیتر از DNA مربوط به هر نمونه در دستگاه ترموسایکلر (Flexcycler و Germany) تنظیم گردید. برنامه حرارتی مورد استفاده در این مرحله شامل یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی عوامل بیماری‌زایی در /شریشیاکلی

نام ژن	توالی پرایمر (5'-3')	اندازه محصول (جفت باز)
<i>afa/draBC</i>	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG	۷۵۰
<i>cnf1</i>	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT	۴۹۸
<i>cnf2</i>	AATCTAATTAAGAGAAC CATGCTTTGTATATCTA	۵۴۳
<i>csgA</i>	ACTCTGACTTGACTATTACC AGATGCAGTCTGGTCAAC	۲۰۰
<i>cvaC</i>	CACACACAAACGGGAGCTGTT CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	۶۸۰
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	۵۰۸
<i>fyuA</i>	TGATTAACCCCGCGGACGGGAA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	۸۸۰
<i>ibeA</i>	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	۱۷۰
<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAACCTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	۳۰۰
<i>KpsMT II</i>	GCGCATTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	۲۷۲
<i>PAI</i>	GGACACCTGTTACAGCGCGCA TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	۹۳۰
<i>papC</i>	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	۳۲۸
<i>PapG II,III</i>	CTGTAATTACGGAAGTGATTTCTG ACTATCCGGCTCCGGATAAACCAT	۱۰۷۰
<i>sfa/focDE</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	۴۱۰
<i>traT</i>	GGTGTGGTGCATGAGCACAG CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	۲۹۰

جدول ۲- شرایط واکنش PCR جهت ردیابی عوامل بیماری‌زایی در اشریشیاکلی

نام ژن	برنامه حرارتی	شرایط PCR (حجم = ۵۰ میکرولیتر)
<i>afaldraBC , CndI , CSgA , CVaC , iutA , fyu A</i>	۱ سیکل 95°C ----- ۴ دقیقه ۳۰ سیکل 95°C ----- ۵۰ ثانیه 58°C ----- ۶۰ ثانیه 72°C ----- ۴۵ ثانیه ۱ سیکل 72°C ----- ۸ دقیقه	PCR buffer 10X = ۵ میکرولیتر Mgcl <sub>2</sub> = ۱/۵ میلی‌مول dNTP mix = ۲۰۰ میکرومول پرایمر F و R مربوط به ژن = ۰/۵ میکرومول آنزیم پلی‌مراز = ۱/۲۵ واحد DNA = ۴ میکرولیتر
<i>Cnfz kpSMTIT PAI PaPC</i>	۱ سیکل 94°C ----- ۶ دقیقه ۳۴ سیکل 95°C ----- ۵۰ ثانیه 58°C ----- ۷۰ ثانیه 72°C ----- ۵۵ ثانیه ۱ سیکل 72°C ----- ۱۰ دقیقه	PCR buffer 10X = ۵ میکرولیتر Mgcl <sub>2</sub> = ۲ میلی‌مول dNTP mix = ۱۵۰ میکرومول پرایمر F و R مربوط به ژن = ۰/۷۵ میکرومول آنزیم پلی‌مراز = ۱/۲۵ واحد DNA = ۴ میکرولیتر
<i>fim H ibe A papG II, III spal fac DE tra T</i>	۱ سیکل 95°C ----- ۴ دقیقه ۳۴ سیکل 94°C ----- ۶۰ ثانیه 56°C ----- ۴۵ ثانیه 72°C ----- ۶۰ ثانیه ۱ سیکل 72°C ----- ۱۰ دقیقه	PCR buffer 10X = ۵ میکرولیتر Mgcl <sub>2</sub> = ۲ میلی‌مول dNTP mix = ۲۰۰ میکرومول پرایمر F و R مربوط به ژن = ۰/۵ میکرومول آنزیم پلی‌مراز = ۱/۵ واحد DNA = ۴ میکرولیتر

### تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز نتایج حاصل از انجام آزمایش و تعیین ارتباط بین فراوانی آلودگی به اشریشیاکلی و حضور انواع عوامل بیماری‌زایی در ایزوله‌های جدا شده از نرم‌افزار آماری SPSS ver. 21 و مدل‌های آماری مربع کای و دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید.

### یافته‌ها

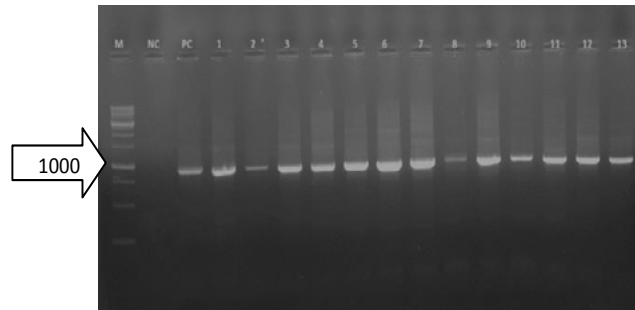
از ۱۳۶ نمونه ترشحات رحمی اخذ شده از اسب‌های مبتلا به اندومتریوز بالینی و تحت بالینی تعداد ۲۲ نمونه (۱۶/۷ درصد)

در انجام آزمایش PCR در هر کدام از مراحل فوق از آب مقطر به‌عنوان نمونه کنترل منفی و از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC 25922 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

### الکتروفورز

جهت ارزیابی محصول PCR در هر کدام از روش‌های فوق از الکتروفورز محصول PCR روی ژل ۲ درصد آگاروز استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت حدود ۶۰ دقیقه انجام گرفت. پس از انجام الکتروفورز با انتقال ژل به دستگاه قرائت کننده ژل (Gel Documentation)، نتیجه مورد بررسی قرار گرفت.

آلوده به *اشریشیاکلی* بودند. ایزوله‌های جدا شده در کشت میکروبی با ردیابی ژن *16srRNA* در آن‌ها به روش PCR تأیید شدند که ژل حاصل از ردیابی این ژن در شکل (۱) نشان داده شده است.



شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد عفونت رحمی در مادیان (ستون M=مارکر ۱ کیلو بازی DNA، ستون NP=نمونه کنترل منفی، ستون PC=نمونه کنترل مثبت، ستون‌های ۱-13=نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۹۱۹ جفت بازی DNA مربوط به ژن *16srRNA*).

با رسم منحنی خطی درصد مهار رشد سلولی برحسب غلظت، تعیین شیب و عرض از مبدأ با قرار دادن در معادله خط، غلظت ۵۰ درصد کشندگی ( $IC_{50}$ ) بر اساس فرمول (۲) محاسبه گردید. همان‌گونه که در جدول فوق مشهود است، ۲۲ ایزوله *اشریشیاکلی* مورد مطالعه واجد اکثر عوامل بیماری‌زایی بوده و در این میان ژن‌های *fimH* با فراوانی ۹۰/۹ درصد و ایزوله *اشریشیاکلی* مورد مطالعه واجد اکثر عوامل بیماری‌زایی *lafa/draBC, cnfl* با فراوانی ۷۲/۷ درصدی شایع‌ترین ژن‌ها و ژن‌های *papGIII* با فراوانی ۲۲/۷۲ درصد و *traT* با فراوانی ۱۸/۱۸ درصد نادرترین ژن‌های بیماری‌زایی ردیابی شده در ایزوله‌های مورد مطالعه بودند.

در تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از جدول فوق، اختلاف آماری معنی‌داری بین حضور ژن‌های *KpsMTII, cvaC, PapGIII, Sfa/focDE, traT, ibeA, PAI, fyuA* با ژن‌های *afa/draBC, Cnfl, iutA, csgA, PapC, fimH* در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $p=0.038$ ) مشاهده شد.

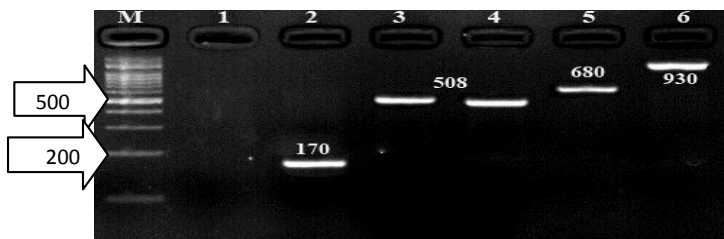
ژل حاصل از ردیابی تعدادی از ژن‌های بیماری‌زایی مورد مطالعه در شکل‌های ۲ و ۳ آورده شده است.

در ایزوله‌های جدا شده حضور شایع‌ترین ژن‌های کد کننده فاکتورهای بیماری‌زایی ارزیابی شد که نتایج در جدول ۳ آورده شده است.

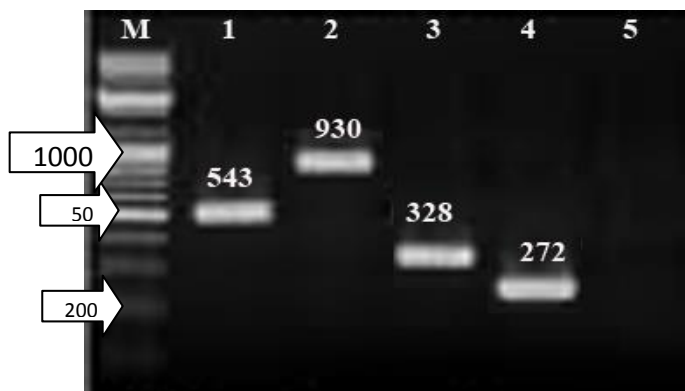
در بخشی دیگر از این تحقیق دارو مورد نظر در غلظت‌های مختلف بر روی رده‌های سلولی سرطانی سینه، پروستات و لوسومی لنفوبلاستی با ۴ غلظت مختلف ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ نانومولار از ترکیب‌های پیریدوپیریمیدین سنتزی تیمار و بررسی گردیدند، بعد از دفریز و رو آمدن سلول‌ها زمانی‌که تراکم سلولی به ۸۰ درصد رسید سلول‌ها پاساژ داده شدند، سپس مقدار مشخصی سلول ۱۰ الی ۲۰ هزار سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ بر اساس بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه برای تست MTT کشت داده شد، سپس ترکیب‌های مورد نظر به پلیت‌ها اضافه گردید، بعد از بازه زمانی مشخص مقدار جذب نوری سلول‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد، سپس آنالیز داده‌های به دست آمده با نرم‌افزار SPSS<sup>16</sup> گزارش گردید، جهت تعیین تفاوت بین میانگین‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه و متعاقب آن تست توکی استفاده و سطح معنی‌داری بودن  $P \text{ value} < 0.05$  در نظر گرفته شد، هم‌چنین برای اندازه‌گیری غلظتی از دارو که ۵۰ درصد سلول‌ها از بین می‌روند (شاخص  $IC_{50}$ )، بعد از مراحل از تیمار کردن سلول‌ها و اندازه‌گیری مقدار جذب آن

جدول ۳- توزیع ژن‌های بیماری‌زایی در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از موارد عفونت‌های رحمی در مادیان بر مبنی نتایج حاصل از PCR

No. Isolates	<i>KpsMT II</i>	<i>PAI</i>	<i>ibeA</i>	<i>papC</i>	<i>PapG II</i>	<i>PapG III</i>	<i>SfaI</i>	<i>focDE</i>	<i>traT</i>	<i>afuI</i>	<i>draBC</i>	<i>CnfI</i>	<i>Cnf2</i>	<i>csgA</i>	<i>cvaC</i>	<i>iutA</i>	<i>fyuA</i>	<i>fimH</i>
۱	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
۲	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
۳	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
۴	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
۵	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
۶	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
۷	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
۸	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+
۹	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
۱۰	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
۱۱	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
۱۲	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
۱۳	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
۱۴	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
۱۵	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
۱۶	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
۱۷	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
۱۸	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
۱۹	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
۲۰	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
۲۱	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
۲۲	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
<b>Total</b>	<b>۶</b>	<b>۷</b>	<b>۷</b>	<b>۱۳</b>	<b>۱۰</b>	<b>۵</b>	<b>۸</b>	<b>۴</b>	<b>۱۶</b>	<b>۱۶</b>	<b>۱۶</b>	<b>۱۶</b>	<b>۱۰</b>	<b>۱۴</b>	<b>۸</b>	<b>۱۴</b>	<b>۶</b>	<b>۲۰</b>



شکل ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی تعدادی از ژن‌های بیماری‌زایی در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از موارد عفونت رحمی در مادیان (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون ۱= نمونه کنترل منفی، ستون‌های ۲-۶= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۱۷۰ جفت بازی DNA مربوط به ژن *ibeA*، قطعه ۵۰۸ جفت بازی DNA مربوط به ژن *fimH*، قطعه ۶۸۰ جفت بازی DNA مربوط به ژن *cvaC*، قطعه ۹۳۰ جفت بازی DNA مربوط به ژن *PAI*)



شکل ۳- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن های *cnf2* (قطعه ۵۴۳ جفت بازی)، *PAI* (قطعه ۹۳۰ جفت بازی)، *papC* (قطعه ۳۲۸ جفت بازی) و *kpsMTH* (قطعه ۲۷۲ جفت بازی)، ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون ۵= کنترل منفی

نمونه مبتلا به اندومتريوز ۱۵ نمونه (۲۷/۷ درصد) واجد *E. coli* بودند. این نتایج نشان دهنده آن است که میزان مبتلا شدن مادپان های با سن بالا، به اندومتريوز ناشی از *اشریشیاکلی*، بیش تر از مادپان های جوان است. نتایج به دست آمده در جدول ۴ مشهود است:

میزان بروز اندومتريوز ناشی از *E. coli* در مادپان رابطه مستقیمی با سن مادپان دارد؛ به طوری که در تعداد ۱۷ نمونه از ۱۳۶ نمونه ترشحات رحمی مادپان های مورد بررسی که سن زیر ۵ سال داشتند، آلودگی به *E. coli* مشاهده نشد. در ۶۵ مادپان با سن بین ۵ تا ۷ سال ۷ نمونه (۱۰/۷ درصد) آلوده به *E. coli* بودند. در مادپان هایی با سن بیش تر از ۷ سال از ۵۴

جدول ۴- فراوانی آلودگی با *E. coli* در مادپان های مبتلا به عفونت های رحمی بر حسب سن

تعداد موارد مثبت	تعداد نمونه	گروه های سنی (سال)
-	۶	۲-۳
-	۶	۳-۴
-	۵	۴-۵
۳	۲۹	۵-۶
۴	۳۶	۶-۷
۱۵	۵۴	بالای ۷
۲۲	۱۳۶	جمع کل

مادپان و یا صبر و تلاش دوباره برای آبستن کردن مادپان در سال جاری تأثیرگذار است و اندومتريوز یعنی التهاب رحم مهم ترین و اصلی ترین علت حامله نشدن مادپان ها است.

اندومتريوز در نتیجه ضعف رحم در پاکسازی میکروارگانيسم ها است که با ایجاد التهاب رحم منجر به خسارات اقتصادی در صنعت اسب می شود (۱۲).

مطالعه های مهم و گسترده ای در سراسر دنیا بر روی علل بروز اندومتريوز مادپان ها و عوامل میکروبی مولد آن انجام شده و در حال انجام است. اتیولوژی عفونت های رحم به طور معمول پلی- میکروبیال (میکروارگانيسم های هوازی و بی هوازی) است.

در تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصل از جدول فوق با مدل آماری دقیق فیشر، اختلاف آماری معنی داری بین فراوانی عفونت های رحمی ناشی از *E. coli* در گروه سنی بالای ۷ سال با سایر گروه های سنی در مادپان های مورد مطالعه در سطح اطمینان ۹۵ درصد مشاهده شد ( $P= ۰/۰۱۹$ ).

## بحث

هر ساله مزرعه داران پرورش اسب و اسب دارها با مسئله مهم و هزینه بر حامله نشدن مادپان ها در سال قبل رو برو هستند. این امر به شدت بر روند تصمیم گیری استراتژیک فروش سریع

ارگانسیم‌های دخیل عموماً شامل کوکسی‌های گرم مثبت، استرپتوکوک‌های گروه A, B، گرم منفی‌ها شامل /شیریشیالکی، کلبسیلا، کلامیدیا، انتروباکتر، نیسریاگونوره/آ، بی‌هوازی‌ها و سایر موارد مانند مایکوپلازما، اوره آپلازما و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است (۱۳).

باکتری /شیریشیالکی از علل اصلی ایجاد اندومتريوز است که با تولید اندوتوکسین لیپوپولی‌ساکاریدی (LPS) بیماری‌زایی خود را اعمال می‌کند. LPS که توسط رسپتورهای Toll-Like سلول‌های اندومتريوم رحم شناسایی می‌شوند باعث ترشح سایتوکاین‌ها، واسطه‌های شیمیایی و پپتیدهای ضد میکروبی می‌شوند (۱۳).

مطالعه‌های بسیار محدودی در خصوص نقش عوامل باکتریایی در ایجاد عفونت‌های تولیدمثلی مادبان در ایران انجام شده است در مطالعه حاضر سعی شد ضمن جداسازی /شیریشیالکی به‌عنوان یکی از عوامل شایع اندومتريوز از ترشحات رحمی مادبان‌های استان چهارمحال و بختیاری، الگوی حضور عوامل بیماری‌زایی در ایزوله‌های جدا شده مورد بررسی قرار گیرد.

در مطالعه حاضر از جمع ۱۳۶ سوآپ اخذ شده از ترشحات رحمی مادبان‌های مبتلا به مشکلات تولید مثلی، تعداد ۲۲ نمونه آلوده به /شیریشیالکی بودند.

در مطالعه Benko و همکاران (۲۰۱۵)، ۶۹/۷ درصد از سوآپ‌های اخذ شده از ترشحات رحمی مادبان‌های مورد مطالعه در اولین استروس بعد از زایمان، آلوده به پاتوژن‌های رحمی بودند که در این میان ۲۹/۷ درصد از سوآپ‌های مثبت واجد میکروارگانسیم‌های ساپروفیت بودند. از ۳۰۷ سوآپ آلوده به عوامل پاتوژن، ۴۰/۴ درصد واجد /ستریتوکوک‌های بتا همولیتیک و ۲۰/۴ درصد از آن‌ها آلوده به /شیریشیالکی بودند (۱۴).

در مطالعه‌ای دیگر در سوئد که توسط Albihn و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام شد از ۲۳۹ رأس مادبان مبتلا به مشکلات تولیدمثلی، ۱۵۲ رأس آلوده به عوامل پاتوژن رحمی بودند که در این میان ۱۰۴ ایزوله /شیریشیالکی، ۳۱ ایزوله /ستریتوکوک بتا همولیتیک و ۱۶ ایزوله عوامل قارچی جدا شد (۱۵).

MacKintosh و همکاران (۲۰۱۳) در ۳ مزرعه تجاری گاو شیری از ۳۷۱ گاو شیری هلشتاین، در شروع دوره شیردهی، ۱ تا ۷ روز اول دوره شیردهی سوآپ رحم اخذ و حضور باکتری‌های *E. coli*، *Trueperella pyogenes* و *VF* ارزیابی نمودند. در مجموع ۴۰ سویه *VF* با استفاده از روش هیبریداسیون پروب رادیواکتیو شناسایی شد. شیوع *E. coli VF* و *T. pyogenes*، *coli* به ترتیب ۴۲، ۳۴ و ۱۵ درصد بود (۱۶).

Hurtgen و همکاران در سال ۱۹۷۲ رحم ۵۰ درصد از ۱۲۰ گاو غیر آبستن مورد مطالعه را مبتلا به اندومتريوز تشخیص دادند. عوامل باکتریایی در اثر جفت‌گیری، تلقیح مصنوعی، پس از زایش از طریق مهبل و در نتیجه دستکاری‌های متعدد افراد غیرمسئول و هم‌چنین از طریق جریان خون به رحم رسیده و باعث ایجاد اندومتريوز می‌شوند. عوامل مستعدکننده مختلفی نظیر سخت‌زایی، جفت ماندگی و فصل نیز در ایجاد اندومتريوز دخالت دارند. به‌طور مثال زایمان در زمستان و بهار میزان اندومتريوز را افزایش می‌دهد (۱).

LeBlance و Causey در سال ۲۰۰۹ در مطالعه‌های خود در زمینه ارزیابی اولتراسونوگرافی مایع رحم به این نتیجه رسیدند که حضور میزان مایع با عمق بالای ۲ سانتی‌متر در طی زمان فحلی نشانگر حساسیت حیوان است. که این مقدار بالای مایع، میزان آبستنی را کاهش می‌دهد (۱۳).

Barbary و همکارانش در تحقیق خود در سال ۲۰۱۶ با مطالعه روی ۱۸ مادبان تولیدی با سابقه خوب تولیدمثلی قبلی، پس از انجام اولتراسونوگرافی (برای سال جاری تولید) دریافتند که مستعد ابتلا به اندومتريوز هستند. تعداد ۱۸ سوآپ رحمی از این مادبان‌ها جمع‌آوری و مورد ارزیابی قرار گرفت و ایزوله‌های باکتریایی آن‌ها مورد شناسایی قرار گرفتند که فراوانی پاتوژن‌ها به شرح زیر بود (۳):

*E. coli* = ۹ ایزوله (۵۰ درصد)، *Staphylococcus aureus* = ۵ ایزوله (۲۷/۸ درصد)، *Klebsiella pneumoniae* = ۳ ایزوله (۱۶/۷ درصد)، *Streptococci*، *Citrobacter freundii* = هر کدام ۲ ایزوله (۱۱/۱ درصد).

پاتوژن مولد اسهال یا خارج روده‌ای متفاوت هستند. *E. coli* پاتوژن اندومتر (EnPEC) برای سلول‌های اپیتلیال و استرومای اندومتر بیماری‌زایی بیش‌تری نسبت به /شیرشیکلی جدا شده از رحم حیوانات بدون التهاب دارد. مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی عوامل بیماری‌زایی /شیرشیکلی در بروز اندومتريوز در مادبان‌ها با سابقه ناباروری انجام شد. در این مطالعه اکثر عوامل بیماری‌زایی در بیماری‌زایی جرم ردیابی شد. به‌طوری‌که ژن‌های *fimH* با فراوانی ۹۰/۹ درصد، *afa/draBC, CnfI* با فراوانی ۷۲/۷ درصد و *papC* با فراوانی ۵۹ درصد بیش‌ترین شیوع و ژن‌های *PapGIII* با فراوانی ۲۲/۷ درصد و *traT* با فراوانی ۱۸ درصد کم‌ترین فراوانی رو شامل شدند. حضور انواع فاکتورهای بیماری‌زایی در ایزوله‌های /شیرشیکلی نشان‌گر دخالت مستقیم این عوامل در بیماری‌زایی باکتری بوده و لازم است جهت شناسایی بیماری‌زایی /شیرشیکلی توزیع حضور عوامل بیماری‌زایی مورد ارزیابی قرار گیرد.

/شیرشیکلی فاکتورهای ویروالانس از جمله چسبنده‌ها، توکسین‌ها و سیستم‌های جذب آهن را دارا است. ژن‌های ویروالانس بر روی عناصر ژنتیکی متحرک و یا در نواحی خاصی از کروموزوم که جزایر بیماری‌زایی نامیده می‌شوند، قرار دارند. به‌دنبال ورود باکتری، یکی از عوامل مهم در عفونت‌های ناشی از /شیرشیکلی و سایر باکتری‌های گرم منفی، چسبیدن باکتری به سطح سلول میزبان است؛ که با دخالت عوامل فیمبریه از جمله محصولات ژن *PapC, afa/draBC, fimH, PapGII*، انجام می‌شود. بنابراین مهار اتصال باکتری، راهکاری مناسب جهت مهار عفونت است. در مطالعه ما فراوانی حضور ژن‌های ذکر شده در ۲۲ ایزوله /شیرشیکلی جدا شده از اندومتريوز در مادبان‌ها به‌ترتیب ۹۰/۹ درصد، ۷۲/۷ درصد، ۴۵/۴ درصد و ۵۹ درصد بود و این ژن‌ها به‌عنوان شایع‌ترین عوامل بیماری‌زایی شناسایی شدند.

این یافته با مطالعه‌های قبلی از جمله Kasse و همکارانش در سال ۲۰۱۶ هم‌راستا است. در این مطالعه با بررسی بر روی تعداد ۳۷۱ مادبان تولیدی، مشخص شد که *E. coli* و برخی از عوامل بیماری‌زایی آن با اندومتريوز مرتبط هستند و ۳ عامل

در مطالعه‌ای که توسط Santos و همکارانش بین سال‌های ۲۰۱۱-۲۰۱۲ در دانشگاه مونترآل کانادا و وزارت کشاورزی و دامپروری آن کشور بر روی تعداد ۴۹۷ رأس مادبان از ۶ مزرعه انجام شد، دریافتند که گونه‌های مختلف باکتری‌های موجود در رحم مادبان به اضافه عوامل بیماری‌زایی /شیرشیکلی در هفته اول پس از زایمان به تخمین رسیک ابتلا به اندومتريوز در هفته ۲ و ۳ و ۴ بعد از زایمان کمک می‌کند. یافته‌های آنان /شیرشیکلی را با فراوانی ۲۶۱ نمونه (۵۲/۵ درصد) شایع‌ترین عامل ایجاد کننده اندومتريوز در مادبان معرفی کرد و باکتری‌های دیگر از جمله: تروپیرلا پیوژنز ۱۴۹ (۳۰ درصد) و فوزوباکتریوم تکروفرم ۶۷ (۱۳ درصد) با فراوانی کم-تری یافت شدند (۱۷).

Madoz و همکارانش در سال ۲۰۱۴ با بررسی بر روی ۲۶۲ رأس مادبان دریافتند که /شیرشیکلی با شیوع ۲۵ درصد، عامل اصلی در ایجاد اندومتريوز در مادبان‌های با سابقه مشکلات ناباروری است و پس از آن تروپیرلا پیوژنز با فراوانی ۱۰ درصد یافت شد (۱۸).

تفاوت در میزان شیوع عفونت‌های تولیدمثل ناشی از /شیرشیکلی در مطالعه ما با مطالعه‌های مشابه ذکر شده می‌تواند به زمان نمونه‌گیری از رحم، فصل نمونه‌گیری، سن و تعداد زایمان مادبان‌های مورد مطالعه، موقعیت جغرافیایی دام‌ها و سطح بهداشت هر منطقه مربوط باشد و امروزه با پیشرفت سطح بهداشت اسب‌داری‌ها و رعایت اصول صحیح نگهداری اسب، شیوع عوامل محیطی مولد اندومتريوز از جمله /شیرشیکلی کاهش یافته است.

در مورد اکثر عوامل عفونی به موازات افزایش سن دام به‌دلیل مواجهه بیش‌تر با عوامل عفونی، فراوانی آلودگی با عوامل پاتوژن افزایش می‌یابد. در مطالعه حاضر نیز این یافته به اثبات رسید طوری‌که در ۳ گروه سنی ۲-۵ سال آلودگی رحم با /شیرشیکلی یافت نشد در حالی که مادبان‌های مسن با سن بالای ۷ سال بیش‌ترین میزان آلودگی با /شیرشیکلی را نشان دادند.

گروه‌های متفاوت اختصاصی از /شیرشیکلی در حیوانات مبتلا به عفونت‌های رحم شناسایی شده‌اند که این سویه‌ها از *E. coli*

بیماری‌زایی زیر بیش‌ترین فراوانی را داشتند. *fimH* (89%), *hlyE* (87%), *iss* (70%) (۱۹).

مادبان‌ها در هفته اول بعد از زایمان به این نتیجه رسید که عوامل بیماری‌زایی *papC*, *papGII*, *afa/draBC* با فراوانی ۸۵ درصد، ۵۹ درصد و ۴۵ درصد رایج‌ترین و شناخته شده‌ترین عوامل بیماری‌زایی در بروز اندومتريت هستند که به نتایج پژوهش حاضر بسیار نزدیک است. در این مطالعه ۱۶ درصد از مادبان‌ها آلوده به *اشریشیاکلی* بودند و مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی ردیابی شده در این ایزوله‌ها ژن، *fimH* با فراوانی ۸۹ درصد بود (۱۲).

Bicalho و همکارانش در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ انجام دادند، دریافته‌اند که از بین عوامل بیماری‌زایی بررسی شده در *اشریشیاکلی* ۳ عامل بیماری‌زایی *fimH* با فراوانی ۹۰ درصد، *hlyE* با فراوانی ۸۷ درصد و *iss* با فراوانی ۸۴ درصد شایع‌ترین عوامل دخیل در بیماری‌زایی بودند و ژن‌های *sfa*, *papGIII* با فراوانی ۲۲ درصد و ۳۶ درصد نادرترین ژن‌های بیماری‌زایی شناسایی شده بودند (۴).

از اصلی‌ترین عوامل غذایی مورد نیاز باکتری جهت رشد در لایه اندومتر رحم، آهن است و باکتری‌های پاتوژن با دارا بودن عوامل جذب کننده آهن یا تولید سیدروفور، آهن مورد نیاز خود را تأمین می‌کنند. از جمله ژن‌های دخیل در جذب ترکیب‌های آهن، ژن‌های *fyuA*, *iutA*, *ibeA* است که با فراوانی ۳۲ درصد، ۶۴ درصد و ۲۷/۲ درصد در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از مادبان‌های مورد مطالعه در این بررسی ردیابی شدند. Bicalho و همکاران در مطالعه‌های خود میزان حضور ژن *ibeA* را حدود ۸ درصد و فراوانی ژن *fyuA* را ۱۸ درصد گزارش کردند که با نتایج مطالعه حاضر متفاوت است (۴).

در مطالعه حاضر حضور ۶۷ درصدی ژن *CsgA* نشان دهنده دخالت این ژن به‌عنوان یک عامل ویرولاکس مهم *اشریشیاکلی* در ایجاد اندومتريوز است که با مطالعه Causey و LeBlanc در سال ۲۰۱۰ که بر روی مادبان‌های مبتلا به مشکلات تولیدمثلی ناشی از *اشریشیاکلی* انجام دادند و میزان حضور این ژن را ۶۳ درصد گزارش کردند، هم‌راستا است (۱۳).

Dascanio و همکارانش در سال ۲۰۱۴ با تعیین عوامل بیماری‌زایی *اشریشیاکلی* در ایزوله‌های جدا شده از رحم

## نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشانگر اهمیت بالای *اشریشیاکلی* و عوامل مختلف بیماری‌زایی آن در ایجاد اولیه اندومتريوز در مادبان است و همین موضوع کمک زیادی به نحوه مقابله و یا پیشگیری از این بیماری می‌کند زیرا دامپزشکان و دامپروران و اسب‌دارها می‌توانند رویکرد بسیار مؤثرتری در برخورد با اندومتريوز و مشکل عدم باروری و یا مشکلات حاملگی و تلفات جبران‌ناپذیر ناشی از اندومتريوزیس داشته باشند.

با توجه به شیوع بالای عفونت‌های رحمی بعد از زایش و زیان‌های اقتصادی ناشی از آن، به‌کارگیری روش‌های دقیق و در عین حال کاربردی برای تشخیص زود هنگام این عفونت‌ها امری ضروری است لذا استفاده از آزمایش PCR به‌عنوان یک آزمایش دقیق و حساس جهت ردیابی ژن‌های بیماری‌زایی می‌تواند در شناسایی سریع باکتری‌های پاتوژن و برنامه‌ریزی صحیح جهت کنترل موارد اندومتريوز در اسب و مدیریت صحیح اسب‌داری‌ها مفید باشد.

## سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد است و از تمامی افرادی که در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

- 1- Hurtgen JP. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. *Theriogenology*. 2006;66(3):560-6.
- 2- Nielsen JM, Nielsen FH, Petersen MR. Diagnosis of equine endometritis—Microbiology, cytology and histology of endometrial biopsies and the correlation to fertility. *Pferdeheilkunde*. 2012;28(1):8-13.
- 3- Barbary HA, Abo-ghonema II, El-Bawab IE, Fadel MS. Diagnosis and treatment of bacterial endometritis in Arabian Mares. *Alexandria J Vet Sci*. 2016;49(2):116-25.
- 4- Bicalho ML, Machado VS, Oikonomou G, Gilbert RO, Bicalho RC. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. *Vet Microbiol*. 2012;157(1-2):125-31.
- 5- Sheldon IM, Rycroft AN, Dogan B, Craven M, Bromfield JJ, Chandler A, Roberts MH, Price SB, Gilbert RO, Simpson KW. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *Plos one*. 2010;5(2):e9192.
- 6- LeBlanc MM. Advances in the Diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the Mare. *Reproduct Domestic Anim*. 2010;45:21-7.
- 7- Pugh DG, Martin MT, Shull JW, Bowen JM. Endometrial candidiasis in five mares. *J Equine Vet Sci*. 1986;6(1):40-3.
- 8- Buczkowska J, Kozdrowski R, Sikora M, Dziecioł M, Matusz A. Non-traditional treatments for endometritis in mares. *Bulgarian J Vet Med*. 2015;18(4):285-93.
- 9- Christoffersen M, Woodward E, Bojesen AM, Jacobsen S, Petersen MR, Troedsson MH, Lehn-Jensen H. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. *BMC Vet Res*. 2012;8(1):41.
- 10 Momtaz H, Karimian A, Madani M, Dehkordi FS, Ranjbar R, Sarshar M, Souod N. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013;12(1):8.
- 11- Tavakol M, Momtaz H, Mohajeri P, Shokoohizadeh L, Tajbakhsh E. Genotyping and distribution of putative virulence factors and antibiotic resistance genes of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from raw meat. *Antimicrob Resist Infect Cont*. 2018;7(1):120.
- 12- Dascanio J, McCue P, editors. *Equine reproductive procedures*. John Wiley & Sons, Wiley-Blackwell, 2014, pp. 473-9.
- 13- LeBlanc MM, Causey RC. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reproduct Domestic Anim*. 2009;44:10-22.
- 14- Benko T, Boldizar M, Novotny F, Hura V, Valocky I, Dudrikova K, Karamanova M, Petrovic V. 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. *Vet Med*. 2015;60(11):613-20.

- 15- Albiñ A, Båverud V, Magnusson U. Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. *Acta Vet Scandinavica*. 2003;44(3):121.
- 16- MacKintosh SB, Schuberth HJ, Healy LL, Sheldon IM. Polarised bovine endometrial epithelial cells vectorially secrete prostaglandins and chemotactic factors under physiological and pathological conditions. *Reproduc*. 2013;145(1):57-72.
- 17- Santos TM, Bicalho RC. Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. *PLoS One*. 2012;7(12):e53048.
- 18- Madoz LV, Giuliadori MJ, Migliorisi AL, Jaureguiberry M, de la Sota RL. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J Dairy Sci*. 2014;97(1):195-201.
- 19- Kassé FN, Fairbrother JM, Dubuc J. Relationship between *Escherichia coli* virulence factors and postpartum metritis in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2016;99(6):4656-67.