NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.10/37 , 2020

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

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۰ - شماره -۳۷ زمستان ۱۳۹۸
مقاله تحقیقی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

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

لیلا کیانی بروجنی، حسن ممتاز*

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

چکیده

سابقه و هدف: اندومتریوز 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 اندومتریوز در مادیان بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش جهت تعیین الگوی عوامل بیماری‌زایی باکتری *اشریشیاکلی* بر روی ۱۳۶رأس مادیان دارای سابقهٔ ناباروری و مشکلات آبستنی در سطح استان چهار محال و بختیاری بررسی انجام شد و به‌منظور تشخیص اولیه اندومتریوز از تصاویر اولتراسونوگرافی استفاده شد. پس از اخذ نمونه‌ها به‌وسیله سیفوناژ رحمی وکشت 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 طوری‌که ژن‌های *fimH* با فراوانی ۹۰/۹ درصد و *afa/draBC, cnf1* با حضور ۷۲/۷ درصد شایع‌ترین و ژن‌های *PapGIII* با فراوانی ۲۷/۲ درصد و *traT* با حضور ۱۸/۸درصد نادرترین ژن‌های بیماری‌زایی ردیابی شده در این ایزوله‌ها بود.

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

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

مقدمه

اندومتریوز (Endometritis) عفونی یکی از علل عمده نازایی در اسب و در نتیجه آسیب جدی در صنعت پرورش اسب است. اندومتریوز 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 اندومتریت‌های حاد، التهاب و عفونت، مزمن شده و باعث تغییرهای مزمن تحلیل برنده، در رحم شده و اندومتریت مزمن ایجاد می‌شود (۱،۲).

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

اندومتریوز یک نوع التهاب مزمن و یا عفونت مخاطی دهانه رحم است. تحقیقات نشان می‌دهد برخی بیماری‌های دستگاه ادراری اسب می‌تواند روی باروری تأثیرگذار باشد؛ اندومتریوز یک اصطلاح کلی است که به این عوارض اشاره دارد و عوامل مختلفی می‌تواند منشأ بروز آن باشد؛ که شامل: اندومتریوز قارچی و اندومتریوز باکتریایی است. بسیاری از قارچها می-توانند به‌واسطه ضعیف شدن سیستم ایمنی بدن اسب به خاطر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، فعال شوند و اسب را دچار مشکل کنند. اندومتریوز 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 می-دانند (۱،۳،۴).

اندومتریوز 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 زواپیدمیکوس* (*Streptococcus zooepidemicus*)، *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli*)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *کلبسیلا پنومونیه* (*Klebsiella pneumonia*)، *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*)، *باکتریوئیدس فراژیلیس* (*Bacteroides fragilis*) و *باکتریوئیدس آائرئولیتیکوس* (*Bacteroides ureolyticus*)، *پروتئوس میرابیلیس* (*Proteus mirabilis*) (۵، ۴).

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

hly ،iroN 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 ،ibeA ، kpsMTII, hra1 ،hlyE

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 اندومتریوز 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 در۱۵۰۰ دور به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب حاصله در محیط مایع TSB (Tryptic Soy Broth) به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شد. باکتری غنی شده در محیط EMB

(Merck, Germany) (Eosin Methylene Blue) کشت و پرگنه‌های لاکتوز مثبت واجد جلای سبز فلزی (متالیک) انتخاب و جهت تأیید هویت *E.coli* آزمون‌های بیوشیمیایی نظیر کشت در محیط(Merck, Germany) TSI (Triple 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، به‌عنوان 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. به‌منظور 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’CCGTCAATTCATTTCAGTTT 3’

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۱ میلی‌مول Mgcl2، ۱۵۰ میکرومول dNTP Mix (Fermentas, Lithuania)، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهایF و R (CinnaGen, Iran)، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (Fermentas, Lithuania) و ۴ میکرولیتر از DNA مربوط به هر نمونه در دستگاه ترموسایکلر (Germany و Flexcycler) تنظیم گردید. برنامه حرارتی مورد استفاده در این مرحله شامل یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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* جداشده از موارد اندومتریوز 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 به‌روش PCR استفاده شد (۱۱).

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

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی عوامل بیماری‌زایی در *اشریشیاکلی*

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

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

شرایط PCR (حجم=۵۰ میکرولیتر)	برنامه حرارتی	نام ژن
PCR buffer 10X= ۵ میکرولیتر $Mgcl_2$= ۱/۵ میلی‌مول dNTP mix= ۲۰۰ میکرومول پرایمرF و R مربوط به ژن = ۰/۵ میکرومول آنزیم پلی‌مراز = ۱/۲۵ واحد DNA = ۴ میکرولیتر	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	***afaldraBC , Cnd1 , CSgA , CVaC , iutA , fyu A***
PCR buffer 10X = ۵ میکرولیتر $Mgcl_2$= ۲ میلی‌مول dNTP mix= ۱۵۰ میکرومول پرایمرF و R مربوط به ژن = ۰/۷۵میکرومول آنزیم پلی‌مراز = ۱/۲۵ واحد DNA = ۴ میکرولیتر	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	***Cnfz*** ***kpSMTIT*** ***PAI*** ***PaPC***
PCR buffer 10X = ۵ میکرولیتر $Mgcl_2$= ۲ میلی مول dNTP mix= ۲۰۰ میکرومول پرایمرF و R مربوط به ژن = ۰/۵ میکرومول آنزیم پلی‌مراز = ۱/۵ واحد DNA = ۴ میکرولیتر	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	***fim H*** ***ibe A*** ***papG II, III*** ***spal fac DE*** ***tra T***

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

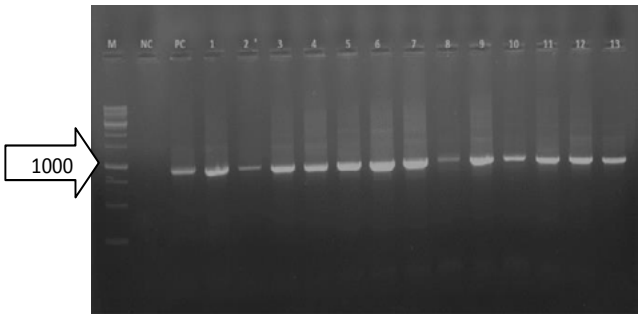
تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز نتایج حاصل از انجام آزمایش و تعیین ارتباط بین فراوانی آلودگی به *اشریشیاکلی* و حضور انواع عوامل بیماری-زایی در ایزوله‌های جداشده 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 وتحت بالینی تعداد۲۲ نمونه (۱۶/۷درصد)

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* جداشده از موارد عفونت رحمی در مادیان (ستون M=مارکر ۱ کیلو بازی DNA، ستون NP= نمونه کنترل منفی، ستون PC= نمونه کنترل مثبت، ستون‌های 1- 13= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۹۱۹ جفت بازی DNA مربوط به ژن *16srRNA*).

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

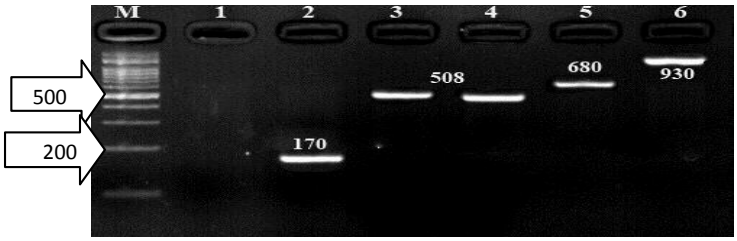
در بخشی دیگر از این تحقیق دارو مورد نظر در غلظت‌های مختلف بر روی رده‌های سلولی سرطانی سینه، پروستات و لوسومی لنفوبلاستی با ۴ غلظت مختلف ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانو مولار از ترکیب‌های پیریدوپیریمیدین سنتزی تیمار و بررسی گردیدند، بعد از دفریز و رو آمدن سلول‌ها زمانی‌که تراکم سلولی به ۸۰ درصد رسید سلول‌ها 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 به‌دست آمده با نرم‌افزار $SPSS_{16}$ گزارش گردید، جهت تعیین تفاوت بین میانگین‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه و متعاقب آن تست توکی استفاده و سطح معنی‌داری بودن P value<۰/۰۵ در نظر گرفته شد، هم‌چنین برای اندازه‌گیری غلظتی از دارو که ۵۰ درصد سلول‌ها از بین می‌روند (شاخص IC50)، بعد از مراحل از تیمار کردن سلول‌ها و اندازه‌گیری مقدار جذب آن 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 (IC50) بر اساس فرمول (۲) محاسبه‌گردید. 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 *afa/draBC, cnf1*، فراوانی ۷۲/۷ درصدی شایع‌ترین ژن‌ها و ژن‌های *papGIII* با فراوانی ۲۲/۷۲ درصد و *traT* بافراوانی ۱۸/۱۸درصد 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 *cvaC*، *KpsMTII*, *fyuA*، *PAI*, *ibeA*, *traT*، *PapGIII, Sfa/focDE* با ژن‌های *fimH* , *PapC* , *csgA* , *iutA*, *Cnf1*, *afa/draBC* در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p= 0. 038) مشاهده شد.

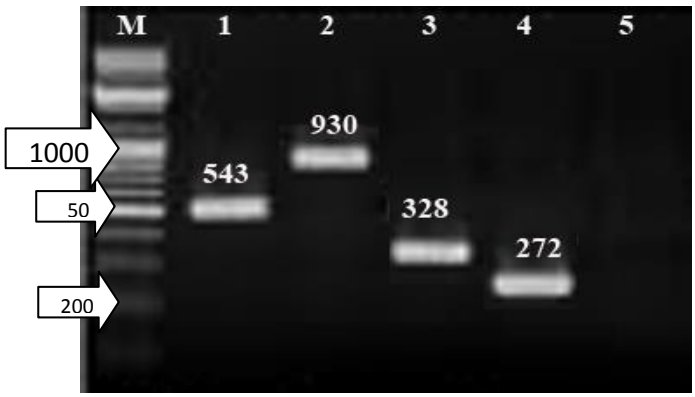
ژل حاصل از ردیابی تعدادی از ژن‌های بیماری‌زایی مورد مطالعه در شکل‌های ۲ و ۳ آورده شده است.

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

No. Isolates	Kps/MT II	PAI	ibeA	papC	PapG II	PapG III	Sfa/focDE	afa/draBC	traT	CnfI	Cnf2	csgA	cvaC	iutA	fyuA	fimH
۱	−	+	−	−	−	−	+	−	−	+	−	+	−	+	−	+
۲	−	+	−	+	−	−	+	+	+	+	+	+	-	−	-	+
۳	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	+	−	−	+	−	+
۴	+	−	−	+	−	+	−	+	-	+	-	+	+	+	+	+
۵	−	−	+	−	+	−	+	−	−	+	−	+	+	−	−	+
۶	+	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+
۷	−	−	−	+	−	+	−	+	-	+	+	+	−	+	+	+
۸	−	+	−	−	−	−	−	−	+	+	-	−	−	+	−	+
۹	−	−	+	+	+	−	+	+	−	−	−	+	+	−	−	+
۱۰	+	−	+	−	+	−	+	+	−	+	−	+	−	+	-	+
۱۱	−	−	−	+	+	−	-	+	−	+	−	+	-	+	−	+
۱۲	+	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−	+	−	-	+	+
۱۳	−	+	−	+	+	−	−	+	−	+	+	−	+	−	−	+
۱۴	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	+	−	+	+	+	+
۱۵	+	−	−	+	−	−	+	−	−	+	−	−	−	+	−	−
۱۶	−	−	+	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	−	+
۱۷	−	+	−	−	+	−	-	+	−	+	+	+	+	+	+	+
۱۸	−	−	−	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−	+
۱۹	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+
۲۰	−	+	+	+	−	−	−	+	−	−	+	−	−	+	−	+
۲۱	+	−	−	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	−	−	+
۲۲	−	−	−	+	+	−	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+
Total	۶	۷	۷	۱۳	۱۰	۵	۸	۱۶	۴	۱۶	۱۰	۱۴	۸	۱۴	۶	۲۰



شکل۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی تعدادی از ژن‌های بیماری‌زایی در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جداشده 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 ژن‌های *cnf2* (قطعه ۵۴۳ جفت بازی)، *PAI* (قطعه ۹۳۰ جفت بازی)، *papC* (قطعه ۳۲۸ جفت بازی) و *kpsMTII* (قطعه ۲۷۲ جفت بازی)، ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون ۵= کنترل منفی

میزان بروز اندومتریوز ناشی از *E.coli* در مادیان رابطه مستقیمی با سن مادیان دارد؛ به‌طوری‌که در تعداد ۱۷ نمونه از ۱۳۶ نمونه ترشحات رحمی مادیان‌های مورد بررسی که سن زیر ۵ سال داشتند، آلودگی به *E.coli* مشاهده نشد. در ۶۵ مادیان با سن بین ۵ تا ۷ سال ۷ نمونه (۱۰/۷ درصد) آلوده به *E.coli* بودند. در مادیان‌هایی با سن بیش‌تر از ۷ سال از ۵۴ نمونه مبتلا به اندومتریوز ۱۵ نمونه (۲۷/۷ درصد) واجد *E. coli* بودند. این نتایج نشان دهندهٔ آن است که میزان مبتلا شدن مادیان‌های با سن بالا، به اندومتریوز ناشی از *اشریشیاکلی*، بیش‌تر از مادیان‌های جوان است. نتایج به‌دست آمده در جدول ۴ مشهود است:

جدول ۴- فراوانی آلودگی با *E.coli* در مادیان‌های مبتلا به عفونت‌های رحمی بر حسب سن

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

در تجزیه وتحلیل اطلاعات حاصل از جدول فوق با مدل آماری دقیق فیشر، اختلاف آماری معنی‌داری بین فراوانی عفونت‌های رحمی ناشی از *E.coli* در گروه سنی بالای ۷ سال با سایر گروه‌های سنی در مادیان‌های 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 مادیان‌ها در سال قبل رو برو هستند. این امر به‌شدت بر روند تصمیم‌گیری استراتژیک فروش سریع مادیان و یا صبر و تلاش دوباره برای آبستن کردن مادیان در سال جاری تأثیرگذار است و اندومتریوز یعنی التهاب رحم مهم‌ترین و اصلی‌ترین علت حامله نشدن مادیان‌ها است.

اندومتریوز در نتیجه ضعف رحم در پاکسازی میکروارگانیسم‌ها است که با ایجاد التهاب رحم منجر به خسارات اقتصادی در صنعت اسب می‌شود (۱۲).

مطالعه‌های مهم و گسترده‌ای در سراسر دنیا بر روی علل بروز اندومتریوز مادیان‌ها و عوامل میکروبی مولد آن انجام شده و در حال انجام است. اتیولوژی عفونت‌های رحم به‌طور معمول پلی-میکروبیال (میکروارگانیسم‌های هوازی وبی‌هوازی) است.

ارگانیسم‌های دخیل عموما شامل کوکسی‌های گرم مثبت، استرپتوکوک‌های گروه A, B، گرم منفی‌ها شامل *اشریشیاکلی*، *کلبسیلا*، *کلامیدیا*، *انتروباکتر*، *نیسریاگونوره‌آ*، بی‌هوازی‌ها و سایر موارد مانند *مایکوپلاسما*، *اوره آپلاسما* و *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* است (۱۳).

باکتری *اشریشیاکلی* از علل اصلی ایجاد اندومتریوز است که با تولید اندوتوکسین لیپوپلی‌ساکاریدی (LPS) بیماری‌زایی خود را اعمال می‌کند. LPS که توسط رسپتورهای Toll-Like سلول‌های اندومتریوم رحم شناسایی می‌شوند باعث ترشح سایتوکاین‌ها، واسطه‌های شیمیایی و پپتیدهای ضد میکروبی می‌شوند (۱۳).

مطالعه‌های بسیارمحدودی در خصوص نقش عوامل باکتریایی در ایجاد عفونت‌های تولیدمثلی مادیان در ایران انجام شده است در مطالعه حاضر سعی شد ضمن جداسازی *اشریشیاکلی* به‌عنوان یکی از عوامل شایع اندومتریوز از ترشحات رحمی مادیان‌های استان چهارمحال و بختیاری، الگوی حضور عوامل بیماری‌زایی در ایزوله های جدا شده مورد بررسی قرار گیرد.

در مطالعه حاضر از جمع ۱۳۶ سواپ اخذ شده از ترشحات رحمی مادیان‌های مبتلا به مشکلات تولید مثلی، تعداد ۲۲ نمونه آلوده به *اشریشیاکلی* بودند.

در مطالعه Benko و همکاران (۲۰۱۵)، ۶۹/۷ درصد از سواپ‌های اخذ شده از ترشحات رحمی مادیان‌های مورد مطالعه در اولین استروس بعد از زایمان، آلوده به پاتوژن‌های رحمی بودند که در این میان ۲۹/۷درصد از سواپ‌های مثبت واجد میکروارگانیسم‌های ساپروفیت بودند. از ۳۰۷ سواپ آلوده به عوامل پاتوژن، ۴۰/۴ درصد واجد *استرپتوکوک‌های* بتا همولیتیک و ۲۰/۴ درصد از آن‌ها آلوده به *اشریشیاکلی* بودند (۱۴).

در مطالعه‌ای دیگر در سوئد که توسط Albihn و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام شد از ۲۳۹ رأس مادیان مبتلا به مشکلات تولیدمثلی، ۱۵۲ رأس آلوده به عوامل پاتوژن رحمی بودند که در این میان ۱۰۴ ایزوله *اشریشیاکلی*، ۳۱ ایزوله *استرپتوکوک* 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 سواب رحم اخذ و حضور باکتری‌های *E. coli*، *Trueperella pyogenes* و *E. coli VF* ارزیابی نمودند. در مجموع ۴۰ سویه VF با استفاده از روش هیبریداسیون پروب رادیواکتیو شناسایی شد. شیوع *E. coli*، *T. pyogenes* و *E. coli VF* به‌ترتیب 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 اندومتریوز 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 اندومتریوز می‌شوند. عوامل مستعدکنندهٔ مختلفی نظیر سخت‌زایی، جفت ماندگی و فصل نیز در ایجاد اندومتریوز دخالت دارند. به‌طور مثال زایمان در زمستان و بهار میزان اندومتریوز 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 مادیان تولیدی با سابقه خوب تولیدمثلی قبلی، پس از انجام اولتراسونوگرافی (برای سال جاری تولید) دریافتند که مستعد ابتلا به اندومتریوز هستند. تعداد ۱۸ سواپ رحمی از این مادیان‌ها 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)، *Citrobacter freundii*, *Streptococci*= هر کدام ۲ ایزوله (۱۱/۱ درصد).

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

Madoz و همکارانش در سال ۲۰۱۴ با بررسی بر روی ۲۶۲ رأس مادیان دریافتند که *اشریشیاکلی* با شیوع ۲۵ درصد، عامل اصلی در ایجاد اندومتریوز در مادیان‌های با سابقه مشکلات ناباروری است و پس از آن *تروپرلا پیوژنز* با فراوانی ۱۰ درصد یافت شد (۱۸).

تفاوت در میزان شیوع عفونت‌های تولیدمثل ناشی از *اشریشیاکلی* در مطالعه ما با مطالعه‌های مشابه ذکر شده می-تواند به زمان نمونه‌گیری از رحم، فصل نمونه‌گیری،سن و تعداد زایمان مادیان‌های مورد مطالعه، موقعیت جغرافیایی دام‌ها و سطح بهداشت هر منطقه مربوط باشد و امروزه با پیشرفت سطح بهداشت اسب‌داری‌ها ورعایت اصول صحیح نگهداری اسب، شیوع عوامل محیطی مولد اندومتریوز از جمله *اشریشیاکلی* 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 *اشریشیاکلی* یافت نشد در حالی که مادیان‌های مسن با سن بالای ۷ سال بیش‌ترین میزان آلودگی با *اشریشیاکلی* را نشان دادند.

گروه‌های متفاوت اختصاصی از *اشریشیاکلی* در حیوانات مبتلا به عفونت‌های رحم شناسایی شده‌اند که این سویه‌ها از *E.coli* پاتوژن مولد اسهال یا خارج روده‌ای متفاوت هستند. *E.coli* پاتوژن اندومتر (EnPEC) برای سلول‌های اپیتلیال واسترومای اندومتر بیماری‌زایی بیش‌تری نسبت‌به *اشریشیاکلی* جدا شده از رحم حیوانات بدون التهاب دارد. مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی عوامل بیماری‌زایی *اشریشیاکلی* در بروز اندومتریوز در مادیان‌ها 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, Cnf1* 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 *اشریشیاکلی* نشان‌گر دخالت مستقیم این عوامل در بیماری-زایی باکتری بوده ولازم است جهت شناسایی بیماری‌زایی *اشریشیاکلی* توزیع حضور عوامل بیماری‌زایی مورد ارزیابی قرار گیرد.

اشریشیاکلی فاکتورهای ویرولانس از جمله چسبنده‌ها، توکسین‌ها و سیستم‌های جذب آهن را دارا است. ژن‌های ویرولانس 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 *اشریشیاکلی* 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 *اشریشیاکلی* جدا شده از اندومتریوز در مادیان‌ها 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 مادیان تولیدی، مشخص شد که *E. coli* و برخی از عوامل بیماری‌زایی آن با اندومتریوز مرتبط هستند و ۳ عامل

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

مادیان‌ها در هفته اول بعد از زایمان به این نتیجه رسید که عوامل بیماری زایی *papGII* ,*papC, afa/draBC* با فراوانی ۸۵ درصد، ۵۹ درصد و۴۵ درصد رایج‌ترین و شناخته شده-ترین عوامل بیماری‌زایی در بروز اندومتریت هستند که به نتایج پژوهش حاضر بسیار نزدیک است. در این مطالعه ۱۶ درصد از مادیان‌ها 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 درسال۲۰۱۰ انجام دادند، دریافتند 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 شایع-ترین 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 مادیان‌های 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 ویرولانس مهم *اشریشیاکلی* در ایجاد اندومتریوز است که با مطالعه LeBlanc و Causey در سال ۲۰۱۰ که بر روی مادیان‌های 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 سال۲۰۱۴ 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 اندومتریوز در مادیان 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 اندومتریوز و مشکل عدم باروری و یا مشکلات حاملگی و تلفات جبران‌ناپذیر ناشی از اندومتریوزیس داشته باشند.

با توجه به شیوع بالای عفونت‌های رحمی بعد از زایش و زیان-های 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 اندومتریوز در اسب و مدیریت صحیح اسب‌داری‌ها مفید باشد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه 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 می-نمایند.

منابع

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, Dzięcioł 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- Albihn 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, Giuliodori 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.