نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۴ پاییز ۱۳۹۳

بررسی وجود تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس در اسب عرب استان خوزستان از طریق کشت و PCR

• **مهدی پورمهدی بروجنی (نویسنده مسئول)**
دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
• **داریوش غریبی**
استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
• **سعد گورانی‌نژاد**
استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
• **سارا معماری**
دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
تاریخ دریافت: اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: شهریورماه ۱۳۹۲
Email: pourmahdim@scu.ac.ir

چکیده

متریت واگیر اسب بیماری مقاربتی و غیر سیستمیک اسب می‌باشد. عامل این بیماری باکتری گرم منفی، باسیل یا کوکوباسیل و غیر متحرک، تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس است که منجر به ناباروری موقت و گذرا در مادیان می‌شود. شناسایی این باکتری بر مبنای کشت در شرایط میکروآئروفیلیک می‌باشد، اما ضعف این باکتری در رشد نسبت به باکتری‌های ثانویه و همزیست موجب شده است که امروزه از تکنیک PCR به عنوان یکی از حساس‌ترین و سریع‌ترین روش در شناسایی آن استفاده گردد. در این تحقیق به منظور ردیابی تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس در اسب‌های عرب استان خوزستان، از ناحیه‌ی گودی و سینوس کلیتوریس و پیشابراهی ۷۶ رأس مادیان و پوست قضیب و یا گودی پیشابراهی ۴ رأس نریان نمونه برداری صورت گرفت. بررسی نمونه‌ها به روش کشت میکروآئروفیلیک بر روی محیط آگار شکلاتی و همچنین روش PCR با استفاده از کیت تشخیصی GENEKOM (ساخت کشور آلمان) نشان داد که مورد مثبتی از نظر تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس وجود ندارد. بررسی‌های بیشتر روی سایر باکتری‌های رشد کرده منجر به شناسایی باکتری‌های دیگری نظیر اشریشیا کولای، گونه‌ای از جنس کلبسیلا، گونه‌ای از جنس استافیلوکوکوس و گونه‌ای از جنس استرپتوکوکوس گردید. نتایج این بررسی نشان داد که تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس به عنوان عامل ناباروری در اسب‌های عرب استان خوزستان مطرح نمی‌باشد و به منظور جلوگیری از ورود آن بایستی مسؤولین بهداشتی استان اقدامات کنترلی و تشخیصی را روی اسب‌های ورودی از سایر استان‌های کشور مد نظر داشته باشند.

کلمات کلیدی: تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس، متریت واگیر اسب، اسب، کشت، PCR

● Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 104 pp: 2-8

Detection of *Taylorella equigenitalis* in Arabian horse of Khuzestan province by culture and PCR

By: Pourmahdi Borujeni, M., Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran (Corresponding Author)

Gharibi, D., Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

Gooraninejad, S., Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

Memari, S., Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.

Email: pourmahdim@scu.ac.ir

Received: April 2013 Accepted:August 2013

Contagious Equine Metritis (CEM) is a venereal transmissible and non-systemic disease of horses caused by a gram negative, bacillus or cocco-bacillus and non-motile bacterium, *Taylorella equigenitalis* which can lead a transient infertility in mares. Identification of this bacterium is based on microaerophilic culture, but weakness of this bacterium in growth compared with secondary and symbiotic bacteria, has caused that PCR is used as one of the most sensitive and fast technique to identification of this bacterium. In the present study, in order to detection of *Taylorella equigenitalis* in Arabian horses of Khuzestan province, samples were taken from the clitoral fossa and sinus of 76 mares and also urethral fossa and penile sheath of 4 stallions. The results of miroaerophilic culture on chocolate agar medium and PCR with diagnostic GENEKOM kit (made in Germany) showed that there is no positive case of *Taylorella equigenitalis* in the specimens. Further studies on other bacteria which were grown on media lead to identification of other bacteria like *Escherichia coli*, Klebsiella spp. Streptococcus spp. and staphylococcus spp. The result of this study showed that *Taylorella equigenitalis* is not as the cause of infertility in Arabian horses of Khouzestan province and health authorities should be considered quarantine and preventive proceedings on entering horses from other provinces and countries.

Key words: *Taylorella equigenitalis*, Contagious Equine Metritis, Horse, Culture, PCR

مقدمه

تایلـورلا اکوئی‌جنیتالیـس عامـل ایجاد بیماری متریت واگیر اسـب، باکتری گرم منفی، میله‌ای یا کوکوباسـیل، میکروآئروفیلیک، سخت رشد و غیر متحرک می‌باشد که تنها میزبان طبیعی آن اسب است هرچند عفونت تجربی با این عامل در الاغ ایجاد شده است. از میان نژادهای مختلف اسب، نژاد تروبرد به این باکتری حساسیت زیادی دارد (۴، ۱۳، ۱۹ و ۲۴).

این باکتری روی محیط آگارشـکلاتی، در دمای ۳۷° سـانتی‌گراد و در محیـط حـاوی ۵ درصد CO_2، بعـد از ۲ تا ۵ روز رشـد می‌کند و دارای پرگنه‌های کوچک، خاکسـتری رنگ و شـفاف و غیر همولیتیک است (۸، ۱۱ و ۲۰).

تایلـورلا اکوئی‌جنیتالیـس از گودی و سـینوس کلیتوریـس ، گودی پیشـآبراهی و جفت مادیان و از غلاف قضیب و سـینوس پیشآبراهی نریان آلوده جدا شـده است همچنین این باکتری از کره اسب‌های نر و ماده جدا شـده است و احتمال داده می‌شـود که آنها در داخل رحم و متعاقب خارج شـدن از رحم در هنگام زایمان آلوده شـده باشند (۷). عفونت باکتریایی از طریق روش‌های باکتریولوژی و سرولوژیک نظیر الیزا ، CFT ، آگلوتیناسیون سـرم ، هماگلوتیناسـیون غیـر فعال و ایمنوفلورسـانس قابل شناسـایی می‌باشـد(۲۰). تایلـورلا اکوئی‌جنیتالیس به بسـیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله پنی‌سیلین، آمپی‌سـیلین، نئومایسـین، کلرامفنیکل، نیتروفورازون، جنتامایسـین، تتراسـیکلین، اریترومایسـین و پلی میکسـین B حساس می‌باشد. واکسن مفید و قابل استفاده‌ای علیه عفونت ایجاد شده توسط این باکتری هنوز در دسترس نیست (۱۲، ۲۳ و ۲۵).

متریت واگیر اسـب عمدتاً از اروپا گزارش شده است و به دلیل سخت رشد بودن این باکتری بر روی محیط کشت، شناسایی و تشخیص آن اندکی سـخت اسـت. به طور کلی این بیماری در اکثر کشورهای جهان مشاهده و گزارش شـده است (۲۴). این بیماری شدیداً مسری و انتقال آن معمولاً در فصول جفت گیری و به دو صورت مستقیم و غیرمستقیم است.

در انتقال مسـتقیم معمولاً باکتری از راه جفت‌گیری منتقل می‌شـود (۲۲ و ۲۵). نریـان آلوده معمولاً علائمی از خود نشـان نمی‌دهد و مادیان عمدتاً بیماری را به صورت متریت پیشـرفته و ناباوری موقتی و گذرا، البته بدون هیچ نوع نشـانه عمومی، نشـان می‌دهد (۱۹ و ۲۳). تحقیق حاضر به منظور ردیابی تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس در اسب‌های عرب استان خوزستان صورت گرفت.

مواد و روش کار

تحقیق حاضر در فاصله زمانی آذرماه ۱۳۹۰ لغایت خرداد ۱۳۹۱ در اسب‌داری‌های شهرهای اهواز، شوشتر، شوش، رامهرمز، دزفول، امیدیه، آبادان و رامشیر در استان خوزستان صورت گرفت. در این تحقیق از ناحیه‌ی گودی و سینوس میانی کلیتوریس و سینوس پیشابراهی ۷۶ رأس مادیان اصیل عرب و پوست قضیب و یا گودی پیشابراهی ۴ رأس نریان عرب نمونه برداری صورت گرفت. لازم به ذکر است که از هر حیوان ۲ سوآب استریل، یکی جهت آزمایشات کشت و دیگری برای آزمایش PCR و ردیابی تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس تهیه گردید.

سوآب تهیه شده جهت کشت درون لوله‌ی آزمایش استریل دربدار حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط انتقالی AMIES قرار داده می‌شد و در عرض کمتر از ۱۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل و کشت داده می‌شد. سوآب تهیه شده جهت آزمایش PCR نیز درون میکروتیوپ حاوی ۵۰۰ میکرولیتر، PBS قرار داده می‌شد. نمونه‌های گرفته شده کد گذاری شده و کد هر کدام در پرسشنامه‌ای درج می‌گردید و مشخصات هر اسب شامل سن، وضعیت تولید مثلی و سابقه‌ی ناباروی، وجود ترشحات و محل زندگی در این پرسشنامه ثبت می‌شد.

در آزمایشگاه نمونه سوآب‌های تهیه شده جهت کشت به صورت استریل در زیر هود و در مقابل شعله و به کمک پنس استریل از لوله‌های حاوی محیط انتقالی AMIES خارج شده و روی محیط آگار شکلاتی B (بدون استرپتومایسن، آمفوتریسین B، کلیندامایسن و تری‌متوپریم)، S (دارای استرپتومایسین) و NS (بدون استرپتومایسین) به کمک آنس حلقوی و به صورت ایزوله خطی کشت داده شدند و برای مدت ۲ تا ۶ روز در انکوباتور CO_2دار، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با ۱۰- ۵ درصد CO_2 انکوبه و پایش شدند (۱۷، ۲۳ و ۲۵).

در این تحقیق برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، روش Direct PCR بر روی نمونه‌های سواب اخذ شده استفاده گردید که به این منظور کیت شرکت GENEKAM، ساخت کشور آلمان برای ردیابی RNA ریبوزومی تایلورلا اکوئی جنیتالیس به کار برده شد و تمام مراحل PCR طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. اساس کار این کیت بر اساس آزمایشPCR آشیانه‌ای (nested PCR) بوده که قادر است آلودگی به تایلورلا اکوئی جنیتالیس را در نمونه‌های مشکوک در طی دو مرحله نمایان سازد. برنامه دمایی مورد استفاده در مرحله اول PCR به ترتیب شامل واسرشت اولیه DNA در۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ سیکل از قرار: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر(eppendrof، ساخت آلمان)صورت پذیرفت. برنامه مرحله دوم PCR نیز شامل واسرشت اولیه DNA در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و۲۵ سیکل شامل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه،۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰دقیقه بود. متعاقب الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵درصد (سیناژن، ایران) و در صورت آلودگی در مرحله اول PCR، باندی در حدود ۴۴۵ bp و در مرحله دوم PCR باند ۲۳۸ bp مشاهده می‌شود. برای نمونه‌های کنترل و مثبت نیز به همین ترتیب عمل شد.

همچنین به منظور کنترل صحت واکنش PCR و صحت استخراج DNA باکتریایی به روش جوشاندن، در این تحقیق از توالی پرایمرهای عمومی (universal) مربوط به تکثیر RNA ریبوزومی پروکاریوتی به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. توالی این پرایمرها شامل پرایمر پیشرو (۳' ggttaccttgttacgactt - ۳') و پرایمر معکوس (۵'-agagtttgatcctggctcag - ۵') بود(۲۱). مخلوط واکنش PCR شامل ۴ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۰/۲ میکرومول از هر کدام از پرایمرها (سیناژن- ایران)، غلظت ۱ میلی مولار Mgcl۲ (سیناژن- ایران)، ۲۰۰ میکرومول از هر کدام از بازهای نوکلئوتیدی (سیناژن- ایران) و ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (سیناژن- ایران) درحجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. برنامه دمایی مورد استفاده به ترتیب شامل واسرشت اولیه DNA در۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ سیکل از قرار: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش نهایی در۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت۱۰ دقیقه بود و اندازه قطعه تکثیر یافته ۷۰۰bp می‌باشد.

ضمنا DNA نمونه‌های اخذ شده از دستگاه تناسلی از طریق جوشاندن استخراج گردید. بدین ترتیب که سوآب‌های تهیه شده جهت آزمایش PCR که در داخل میکروتیوپ‌های حاوی PBS تهیه گردیده بودند ورتکس گردید تا مواد چسبیده به سوآب با PBS موجود در میکروتیوپ هموژن گردد. سپس به کمک پنس استریل سوآب‌ها از درون میکروتیوپ‌ها خارج گردید و میکروتیوب‌ها به مدت ۲ دقیقه در g۱۳۰۰۰ و در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند. در ادامه محلول بالایی دور ریخته گردید و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به میکروتیوب اضافه شد و محتویات میکروتیوپ‌ها مجدداً به کمک دستگاه ورتکس مخلوط شدند و به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. در ادامه میکروتیوپ‌ها به مدت ۱ دقیقه در g۱۳۰۰۰ سانترفیوژ گردیدند و از مایع رویی به عنوان DNA در آزمایش PCR استفاده گردید (۴ و ۶).

نتایج

۹۵ درصد از نمونه‌های اخذ شده مربوط به دستگاه تناسلی مادیان (۷۶ نمونه) و مابقی از نریان بود. میانگین و انحراف معیار سن اسبان تحت بررسی به ترتیب ۱۰/۲ و ۷ سال (حداقل و حداکثر ۲ و ۳۵ سال) بود. میانگین و انحراف معیار سن نریان‌های تحت بررسی به ترتیب ۷/۲۵ و ۲/۷۵ سال (حداقل و حداکثر ۴ و ۱۰ سال) بود. میانگین و انحراف معیار سن مادیان‌های تحت بررسی به ترتیب ۱۰/۳۶ و ۷/۱ سال (حداقل و حداکثر ۲ و ۳۵ سال) بود. سابقه ناباروری در ۵۷/۹ درصد (۴۶ رأس) از مادیان‌های تحت بررسی وجود داشت. ترشحات مهبلی موکوسی- چرکی در ۷/۹ درصد از مادیان‌ها (۶ رأس) دیده می‌شد که نابارور نیز بودند. در ۶۴/۵ درصد (۴۹ رأس) از مادیان‌ها یک سال یا کمتر از زمان زایمان آنها می‌گذشت و مابقی بیشتر از یک سال از زمان زایمان آنها می‌گذشت. ۲۶/۳ درصد از مادیان‌ها (۲۰ رأس) آبستن بودند.

متعاقب کشت سوآب‌های اخذ شده بر روی سه نوع محیط آگار شکلاتی، به خصوص در محیط آگار شکلاتی B و NS در مواردی پرگنه‌های ریز مشکوک به باکتری تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس مشاهده گردید (شکل ۱)

شکل ۱- پرگنه‌های مشکوک به تایلورلا اکوئی جنیتالیس (نوک پیکان‌ها)

ولی پس از رنگ آمیزی گرم و مشاهده شکل ظاهری باکتری‌های رشد کرده و همچنین انجام آزمایشاتی نظیر کاتالاز، اکسیداز و فسفاتاز هیچکدام خصوصیات تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس را نداشتند و بنابراین تمامی نمونه‌های اخذ شده از دستگاه تناسلی از لحاظ کشت این باکتری منفی بودند. البته در محیط‌های کشت شده به خصوص محیط آگار شکلاتی B باکتری‌های دیگری به فراوانی به خصوص در انکوباسیون‌های ۴۸-۲۴ ساعت مشاهده گردید که با بررسی برخی خصوصیات کلی این باکتری‌های رشد کرده در برخی نمونه‌ها مواردی شامل اشرشیا کلی، پروتئوس، کلبسیلا، استافیلوکوکوس آرئوس کوآگولاز مثبت، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استرپتوکوکوس و کورینه باکتریوم شناسایی شدند. در محیط آگار شکلاتی S همواره در مقایسه با دو محیط دیگر باکتری‌ای رشد نمی‌کرد و یا میزان رشد باکتری خیلی اندک بود. لازم به ذکر است نتیجه کشت سوش استاندارد تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس (NTCC۶۰۰۵۱۹) که از گروه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شده بود در شرایطی که برای سایر نمونه‌ها نیز استفاده می‌شد، مثبت بود.

در آزمایش PCR که با استفاده از کیت تجارتی مربوط به RNA ریبوزومی تایلورلا انجام شد نیز کلیه نمونه‌ها از نظر حضور تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس منفی بودند.

این نتایج در مورد کنترل مثبت کیت PCR و DNA حاصل از جوشاندن سوش استاندارد تهیه شده از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران مثبت و برای کنترل منفی نیز منفی مشاهده شد. همچنین به منظور کنترل صحت استخراج DNA به روش جوشاندن، روی DNA نمونه‌های استخراج شده و DNA سوش استاندارد با استفاده از آغازگرهای RNA ریبوزومی عمومی باکتریایی نیز آزمون PCR انجام شد. این آغازگرها حالت عمومی(universal) دارند و قادر هستند توالی RNA ریبوزومی-اکثر پروکاریوت-ها را شناسایی و تکثیر کنند. از آنجایی که در این تحقیق باند bp۷۰۰ مربوط به توالی RNA ریبوزومی پروکاریوتی در تمام نمونه‌های DAN استخراج شده به روش جوشاندن مشاهده گردید در نتیجه صحت استخراج DNA با این روش در نمونه-ها مورد تایید قرار گرفت (شکل‌های ۲، ۳ و ۴).

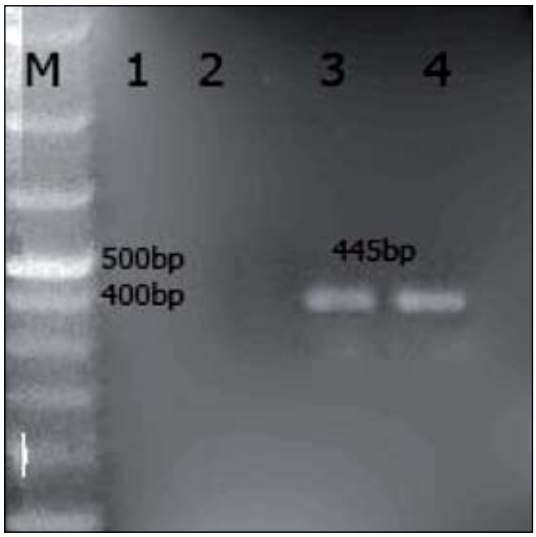
بحث

متریت واگیر اسب به علت نداشتن علائم بالینی و اختصاصی مشخص و همچنین به علت حامل ماندن تعدادی از مادیان و نریان‌های آلوده، به عنوان یکی از مهمترین بیماری‌های مقاربتی در نظر گرفته می‌شود و باعث ایجاد خسارات اقتصادی فراوانی در باشگاه‌های پرورش اسب می‌گردد، لذا تشخیص سریع و دقیق این بیماری برای جلوگیری از شیوع آن و خسارات احتمالی، لازم و ضروری می‌باشد. البته یکی از مشکلات تشخیص دقیق این بیماری سخت و دیر رشد بودن تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس در محیط کشت و همچنین مشکل شناسایی این عامل از تایلورلا آسینی جنیتالیس (غیر بیماریزا در اسب) به علت شباهت مورفولوژیک، بیوشمیایی و ساختاری این دو باکتری است، اما خوشبختانه محققین در سال‌های اخیر با استفاده از روش-های مولکولی از جمله PCR و PCR در زمان حقیقی موفق به شناسایی دقیق و سریع این بیماری شده‌اند (۱۳).

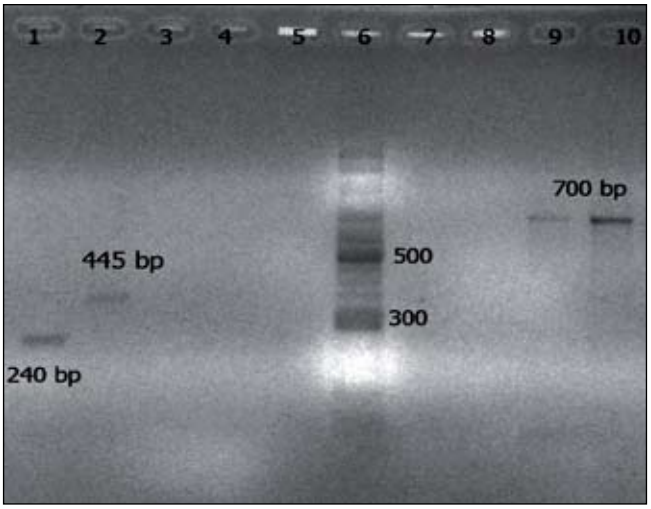
در استان خوزستان قریب به ۱۵۰۰ رأس اسب نژاد عرب وجود دارد که در تحقیق حاضر وجود تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس در مادیان‌های بارور و نابارور و همچنین نریان به کمک روش کشت و روش PCR در ۸۰ رأس بررسی گردید که در هر دو روش تشخیصی مورد مثبتی یافت نگردید.

اولین بار در ایران ابراهیمی و همکاران در سال ۱۳۸۰ با آزمایش روی ۵۷ رأس مادیان موفق به یافتن تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس در ۲ رأس مادیان با روش کشت شدند که هر ۲ مادیان مربوط به یک باشگاه پرورش اسب در شهرکرد بودند (۱).

الیاسی در سال ۱۳۸۴ با بررسی ۸۰ رأس اسب در اسب‌داری‌های اطراف تهران موفق به شناسایی و تشخیص تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس از ۹ رأس مادیان و ۳ رأس نریان با استفاده از روش PCR شد. در این تحقیق ۷ رأس از مادیان‌های مثبت، از نظر بالینی فاقد نشانه بوده و تنها ۲ رأس دارای نشانه عفونت رحمی بوده‌اند. الیاسی بیان می‌کند جداسازی تایلورلا از



شکل شماره ۲- نتایج PCR کنترل مثبت و منفی کیت و برخی نمونه‌های منفی از نظر حضور تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس. گوده شماره ۱ مارکر مولکولی(۱۰۰ bp)، گوده شماره ۱کنترل منفی کیت، گوده شماره۲ نمونه منفی و گوده‌های شماره ۳و ۴ کنترل‌های مثبت کیت



شکل ۳- نتایج PCR بر روی DNA سوش استاندارد تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس و برخی نمونه‌های سواب واژینال با استفاده از کیت تجاری و همچنین پرایمرهای عمومی RNA ریبوزومی باکتریایی. گوده شماره ۱: باند ۲۴۰ بازی مربوط به مرحله دوم PCR، گوده شماره ۲: باند ۴۴۵ بازی مربوط به مرحله اول PCR، گوده شماره ۳: کنترل منفی، گوده‌های ۴، ۵، ۷ و ۸ نمونه‌های سواب واژینال منفی، گوده‌های شماره ۹ و ۱۰ باند مربوط به RNA ریبوزومی تکثیر یافته از DNA ژنومی سوش استاندارد تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس با استفاده از پرایمرهای عمومی-RNA ریبوزومی-باکتریایی و گوده شماره ۶ مارکر مولکولی(۱۰۰ bp)

مادیان به سن، آبستن و یا آبستن نبودن، داشتن فحلی منظم و یا نامنظم، وجود یا نبود عفونت رحمی و به میزان ترشحات ارتباطی ندارد. همچنین بیان می‌کند که ۷ نمونه مربوط به مادیان‌ها در روش PCR مستقیم و ۲ نمونه در روش Culture PCR مثبت تشخیص داده شدند (۲).

Bleumink-Pluym و همکاران در سال ۱۹۹۴، اولین روش PCR را جهت شناسایی و تشخیص سریع و دقیق باکتری تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس ابداع کردند. آنها از روش کشت، PCR مستقیم و Culture PCR استفاده کردند و نشان دادند که از ۱۴ رأس مادیان تحت بررسی، ۴ مادیان در روش Culture PCR مثبت هستند، اما تمام مادیان‌ها در روش PCR مستقیم و کشت منفی می‌باشند. آنها نتیجه گرفتند روش Culture PCR حساسیت بالاتری نسبت به PCR مستقیم دارد و آن را به دادن فرصت لازم به باکتری جهت رشد روی محیط کشت و افزایش تعداد آن نسبت دادند (۶).

Premanandh و همکاران در سال ۲۰۰۳ با انجام تغییراتی بر روی روش Bleumink و همکاران، روش Real-time Culture PCR را جهت تشخیص این بیماری به کار بردند و نشان دادند که از ۲۱ رأس مادیان نمونه‌گیری شده از هلند و ۴۳ رأس مادیان نمونه‌گیری شده از دبی، تنها ۱۰ رأس مادیان مربوط به هلند از نظر حضور تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس مثبت می‌باشند و تمامی مادیان‌های مربوط به دبی منفی می‌باشند که نتایج مطالعه مربوط به دبی از این نظر شبیه به مطالعه حاضر است (۱۵).

Parleviet و همکاران در سال ۱۹۹۷ با بررسی ۱۰۷ رأس مادیان که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند و از نظر بالینی هیچ کدام علائمی نداشتند نشان دادند که در روش کشت نمونه مثبتی از نظر تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس وجود ندارد اما در روش PCR، ۵۴ مورد مثبت (۴۹ درصد) وجود دارد. این تحقیق نشان می‌دهد که روش PCR دقیق‌تر و حساس‌تر از روش کشت برای تشخیص این باکتری می‌باشد (۱۴).

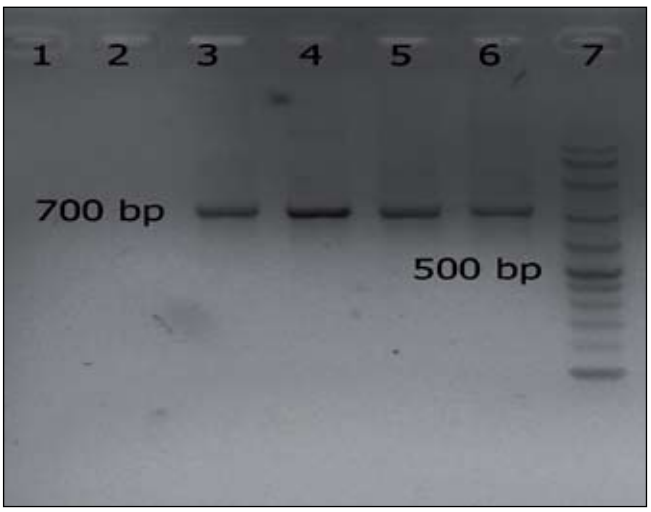
تحقیقات انجام شده در سال ۲۰۰۳ نشان می‌دهد ۳ مورد آلودگی به تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس در انگلستان شناسایی شده است (۱۳).

Zdovc و همکاران در اسلونی نشان دادند از بین ۲۴۵ رأس نریان تحت آزمایش، تنها ۳ مورد در روش PCR از نظر تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس مثبت می‌باشند و تمامی آنها در روش کشت منفی هستند (۲۶).

Duquesne و همکاران در سال ۲۰۰۶ موفق به شناسایی تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس و همچنین تشخیص تفریقی این باکتری از تایلورلا آسینی‌جنیتالیس با روش PCR مستقیم شدند. بررسی آنها نشان می‌دهد که روش PCR مستقیم، دقیق‌ترین، حساس‌ترین و سریع‌ترین روش برای تشخیص و جداسازی تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس بدون نیاز به رشد باکتری در محیط کشت می‌باشد (۸).

در اواخر سال ۱۹۷۷ تایلورلا اکوئی جنیتالیس، برای اولین بار در آمریکا شناسایی شد و در سال ۱۹۷۸ این بیماری در آمریکا شیوع یافت و حدود ۵۰ رأس اسب آلوده به تایلورلا شناسایی شد. این باکتری در سال‌های ۱۹۷۹ و ۱۹۸۲ نیز جداسازی شد (۳، ۱۰ و ۱۶). در فاصله زمانی سال‌های ۱۹۷۸ تا ۲۰۱۰ در امریکا تعداد ۸۶ رأس اسب از نظر تایلورلا اکوئی جنیتالیس در کشت مثبت تشخیص داده شدند. از این تعداد ۵۰ مورد در سال ۱۹۷۸، ۴ مورد در سال ۱۹۷۹، ۳ مورد در سال ۲۰۰۶، ۲۸ مورد در سال ۲۰۰۹ و یک مورد در سال ۲۰۱۰ شناسایی و مورد تایید قرار گرفتند (۳).

Erdam و همکاران حد فاصل سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۰، با انجام تحقیق گسترده‌ای به روش کشت باکتری بر روی ۱۰۰۰ رأس اسب (۲۷۸ نریان،



شکل ۴- نتایج PCR مربوط به تکثیر RNA ریبوزومی پروکاریوتی(باند bp۷۰۰) در نمونه‌های سواب واژینال که از نظر تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس و با استفاده از پرایمرهای RNA ریبوزومی اختصاصی مربوط به این باکتری منفی بوده‌اند. گوده‌های شماره ۱و۲ نمونه‌هایی که اصلاً فاقد DNA بوده‌اند، گوده‌های شماره ۳، ۴، ۵ و ۶ دارای DNA باکتریایی بوده و لذا از نظر RNA ریبوزومی پروکاریوتی در واکنش PCR مثبت شده‌اند، گوده شماره ۷ مارکر مولکولی(۱۰۰ bp)

۷۲۷ مادیان) در ۴۸ ایالت آمریکا موفق به تشخیص تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس در ۲۲ رأس نریان و ۵ رأس مادیان شدند. از ۵ مادیان مثبت، تنها ۲ مادیان دارای ترشحات مهبلی بودند که فقط یکی از آنها مشکل ناباروری داشت. آنها همچنین اعلام نمودند که آزمایش این اسب‌ها بعد از درمان نشان می‌دهد ۳ نریان و ۱ مادیان همچنان مثبت هستند (۹).

در سال ۲۰۰۹ Tel و همکاران موفق به شناسایی تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس از اسب‌های تروبرد ناحیه Sunliurfa در ترکیه شدند. در روش PCR از میان ۸۰ رأس مادیان مورد بررسی ۵ مورد (۲/۷ درصد) و از میان ۹۰ رأس نریان ۸ مورد (۴/۴ درصد) مثبت اعلام شدند. نمونه‌هایی که در روش PCR مثبت شناخته شدند در روش کشت منفی بودند (۱۸).

در ژاپن برای اولین بار در سال ۱۹۸۵ بیماری متریت واگیر اسب مشاهده شد. Anzai و همکاران در سال ۲۰۰۱ پژوهش خود را در این زمینه آغاز نمودند و در همان سال از بررسی ۱۲۳۵۶ رأس اسب، ۱۱ مورد مثبت مشاهده نمودند. موارد مثبت در سال ۲۰۰۲ به ۴ رأس، در سال ۲۰۰۳ به ۲ رأس و در سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵ به یک رأس کاهش یافت. این کشور در سال ۲۰۱۱ موفق به ریشه‌کنی این بیماری در اسب‌ها شد (۵).

خوشبختانه در بررسی حاضر مورد مثبتی از لحاظ آلودگی به تایلورلا اکوئی‌جنیتالیس در اسب‌های عرب استان خوزستان یافت نشد لذا توصیه می‌گردد مسؤولین بهداشتی استان به منظور جلوگیری از ورود این عامل، اقدامات کنترلی و تشخیصی را روی اسب‌های ورودی از سایر استان‌های کشور مد نظر داشته باشند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر تأمین هزینه اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

۱- ابراهیمی، ع.، اسفندآبادی، ن. و زهرایی صالحی، ت.(۱۳۸۲). جداسازی باکتری تایلورلا اکویی جنیتالیس از مادیان‌های موجود در باشگاه‌های سوارکاری شهرکرد، مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۸، شماره ۲.

۲- الیاسی، م. ع.(۱۳۸۴). بررسی وجود عامل متریت واگیر اسب با استفاده از روش کشت PCR در تعدادی از فارم‌های اطراف تهران. پایان‌نامه دکتری عمومی از دانشگاه تهران، ۳۰۵۸.

3. Aalsburg, A.M., Erdman, M.M. (2011) Pulsed-field gel electrophoresisgenotyping of *Taylorella equigenitalis* isolated in the United States:1978–2010. Journal of Clinical Microbiology, 49:829–833.

4. Anzai, T., Eguchi, M., Sekizaki, T., Kamada, M., Yamamoto, K., and Okuda, T. (1999)
Development of a PCR test for rapid diagnosis of contagious equine metritis. Journal of Veterinary Medical Science, 61(12):1287-1292.

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

6. Bleumink-Pluym, N., Werdler, M. E., Houwers, D. J., Parleviet, J. M., Colenbrander, B., and Van der Zeijst, B. A. (1994) Development and evaluation of PCR test for detection of *Taylorella equigenitalis*. Journal of Clinical Microbiology, 32(4):893-896.

7. Couto, M.A. (1993).Sexually transmitted (venereal) diseases of horse in equine reproduction. 1st ed. (edit by McKinnon).Philadelphia, Lea & Febiger, 845-854.

8. Duquesne, F., Pronost, S., Laugier, C., and Petry, S. (2007) Identification of *Taylorella equigenitalis* responsible for contagious equine metritis in equine genital swabs by direct polymerase chain reaction. Research in Veterinary Science, 82(1):47-49.

9. 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 Medicine101, 219-228.

10. Fales, W.H., Blackburn, B.O., Youngquist, R.S., Braun, W.F., Schlater, L.K. and Morehouse, L.G. (1979) Laboratory methodology for the diagnosis of contagious equine metritis in Missouri. In: Proceedings of 22nd American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians , San Diego,CA, vol. 22, pp. 187–197.

11. Jang, S. S., Donahue, J. M., Arata, A. B., Goris, J., Hansen, L. M., Earley, D. L., Vandamme, P. A. R., Timoney, P. J., and Hirsh, D. C. (2001) *Taylorella asinigenitalis* sp. nov., a bacterium isolated from the genital tract of male donkeys (*Equus asinus*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51(3):971-976.

12. Luddy, S. and Kutzler, M.A. (2010) Contagious equine metritis within the United States: a review of the 2008 outbreak. Journal of Equine Veterinary Science, 30(8):393-400.

13. Matsuda, M. and Moore, J. E. (2003) Recent advances in molecular epidemiology and detection of *Taylorella equigenitalis* associated with contagious equine metritis (CEM). Veterinary Microbiology, 97(1-2):111-122.

14. Parleviet, J.M., Bleumink-Pluym, N.M., Houwers, D.J., Remmen, J.L., Sluijter, F.J. and Colenbrander, B. (1997) Epidemiologic aspects of *Taylorella equigenitalis.* Theriogenology, 47:1169-1177.

15. Premanandh, J., George, L. V., Wernery, U., and Sasse, J. (2003) Evaluation of a newly developed real-time PCR for the detection of *Taylorella equigenitalis.* and discrimination from *T. asinigenitalis*. Veterinary Microbiology, 95(4):229-237.

16. Swerczek, T.W. (1978) The first occurrence of contagious equine metritis in the United States. Journal of American Veteri-

nary Medicine Association, 173: 405–407.
17. Taylor, C.E.D., Rosenthal, R.O., Brown, D.F.J., Lapage, S.P., Hill, L.R. and Legros, R.M. (1978). The causative organism of contagious equine metritis 1977: proposal for a new species to be known as *Haemophilus equigenitalis*. Equine Veterinary Journal, 10: 136–144.
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. Timoney, P.J. (1996) Contagious equine metritis. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases, 19(3):199-204.
20. Timoney, P.J., Gillespie, J.H., Scoll, F.W., and Brulough, J.E. (1988) Hegan and Bruners Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals, 8th ed., published by Coruell University, 100-103.
21. Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., and Palmer, J.D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. Journal of Eukaryotic Microbiology 46: 327–338.
22. United States Animal Health Association. (2008) The grey book foreign animal diseases (FAD). 7th ed. St Joseph, MO: United States Animal Health Association, 16:225-229.
23. Wakeley, P. R., Errington, J., Hannon, S., Roest, H. I., Carson, T., Hunt, B. and et al (2006) Development of a real time PCR for the detection of *Taylorella equigenitalis* directly from genital swabs and discrimination from *Taylorella equigenitalis.* Veterinary Microbiology, 118(3-4):247-254.
24. World Organization for Animal Health (OIE). (2009) Contagious equine metritis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris, France: World Organization for Animal Health, 25.2:838-844.
25. World Organization for Animal Health (OIE). (2012) Contagious equine metritis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris, France: World Organization for Animal Health, 68.5:624-648.
26. 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.