

## جداسازی و شناسایی فلور قارچی اندام‌های خارجی سیستم تولید مثل مادیان‌ها

علیرضا آذروندی<sup>۱</sup>، مسعود طالب خان گروسی<sup>۲\*</sup>، علیرضا خسروی<sup>۳</sup>، آرمان حسینی<sup>۲</sup>، فرامرز قراگوزلو<sup>۲</sup>

۱) سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی، ایران

۲) گروه آموزشی مامایی و بیماری‌های تولید مثل، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳) مرکز قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۱۷ مهر ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۲۵ دی ماه ۱۳۹۵)

## چکیده

**زمینه مطالعه:** میکروارگانیسم‌ها به صورت مستقیم یا غیر مستقیم روی تولید مثل و باروری در مادیان‌ها اثر گذار هستند. قارچ‌ها بر روی مخاطات دستگاه تولید مثل حیوانات خون گرم حضور دارند. **هدف:** جداسازی و شناسایی قارچ‌های رشته‌ای قسمت خارجی دستگاه تولید مثل (وستیبول، کلیتورال فوسا و واژن) مادیان‌ها می‌باشد. **روش کار:** در باشگاه‌های سوار کاری و مزارع پرورش اسب نمونه‌برداری توسط سواب پنبه استریل از نواحی وستیبول، کلیتورال فوسا و واژن دستگاه تناسلی مادیان‌ها، از خرداد ماه تا دی ماه ۱۳۹۳ انجام شد. از ۱۵۱ رأس مادیان نمونه‌برداری به عمل آمد. نمونه‌ها در کنار کیسه یخ به آزمایشگاه قارچ‌شناسی منتقل شدند. هر نمونه سواب در محیط ساپورو دکستروز آگار حاوی ۰/۰۰۵٪ کلرامفنیکل کشت و در انکوباتور ۳۰° به مدت ۱۵-۱۰ روز قرار گرفتند. تعداد کلنی‌ها، شمارش و تشخیص قارچ‌ها بر اساس مشخصات ماکروسکوپی، میکروسکوپی صورت پذیرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. **نتایج:** کلیه کلنی‌های مشاهده شده، ۶۶۶ مورد و حداکثر کلنی شمارش شده برای هر ناحیه ۲۰ و برای هر رأس اسب، ۳۷ کلنی بود. از ۴۵۳ ناحیه نمونه‌برداری شده تولید مثل مادیان، ۲۱۹ ناحیه (۴۸/۳٪) عوامل قارچی جداسازی شد. از ۱۲۳ (۸۱/۵٪) مادیان قارچ جدا شد. عمده قارچ‌های جدا شده غالباً شامل: اسپرژیلوس (۵۴/۳۵٪)، اسکوپولاریوپسیس (۱۳/۹۶٪)، کلادوسپوریوم (۵/۲۵٪)، پنی سیلیوم (۴/۶۵٪)، آلترناریا (۳/۹۰٪) و فوزاریوم (۳/۰۳٪) بودند. بیشتر کلنی‌ها مربوط به گونه‌های مختلف اسپرژیلوس با ۲۶۲ کلنی و در بین آن‌ها اسپرژیلوس فومیگاتوس با ۱۵۶ کلنی جداسازی شد. پس از اسپرژیلوس، اسکوپولاریوپسیس با ۹۳، کلادوسپوریوم با ۳۵ و پنی سیلیوم با ۳۱ کلنی قرار داشتند. قارچ‌های رشته‌ای به عنوان مایکوفلور مقیم دستگاه تولید مثل اسب بیشترین مورد را شامل شدند. اسپرژیلوس فومیگاتوس دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به دیگر قارچ‌ها بود. **نتیجه‌گیری نهایی:** قارچ‌های رشته‌ای می‌توانند به عنوان فلور قسمت خارجی سیستم تولید مثل مادیان باشند. این قارچ‌های ساپروفیت فرصت طلب در صورت بروز شرایط مستعد، قادرند در بروز بیماری‌های تولید مثل همانند آندومتريت و ناباروری نقش داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: فلور قارچی، جداسازی، اسپرژیلوس، تولید مثل، مادیان

## مقدمه

مخمرهای ژئوتریکوم، تریکوسپورون، رودوتورولا و کریپتوکوکوس گزارش شده است (۲۸). در مطالعه قارچ‌های دستگاه تولید مثل گاو میش‌ها از ۲۰٪ گاو میش‌های سالم و دارای اختلال تولید مثل، قارچ‌های پنی سیلیوم، اسپرژیلوس، ژئوتریکوم و کاندیدا آلیکنس را شناسایی کرده اند (۱۲، ۳۶). در یک مطالعه، محیط اسب‌ها از نظر حضور مخمر مورد بررسی قرار گرفت، بیشترین مقدار مخمر از محیط اسب‌های نژاد لهستانی و تعداد کم مخمر را از محیط اسب‌های نژاد عرب و توروبرد جدا شد (۲۴). از تروبرد، کاندیدا گیلرموندی، کاندیدا تروپیکالیس، از محیط اسب عرب کاندیدا فاماتا، کاندیدا گلابراتا، کریپتوکوکوس هومیکولا و تریکوسپورون، از اسب لهستانی کاندیدا فاماتا، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا گیلرموندی، کریپتوکوکوس و تریکوسپورون جدا شده است (۲۱). در بررسی فراوانی مخمر در مادیان‌های انگلیسی در گروه‌های مختلف و عفونت کاندیدیایی دستگاه تولید مثل، کاندیدا گیلرموندی، کاندیدا تروپیکالیس از واژن جداسازی و گزارش شده است (۴، ۲۴، ۴۱). گونه‌های اسکوپولاریوپسیس ساپروفیت‌های خاک‌زی هستند که از اشیاء زیادی جدا شده‌اند. پنج گونه اسکوپولاریوپسیس با بیماری‌های انسان همراه بوده است (۱۵، ۳۰، ۳۴). قارچ‌های ساپروفیت مانند

جمعیت ۵۲ میلیون رأسی اسب در جهان، مورد توجه خاص می‌باشند. میکروارگانیسم‌ها به صورت مستقیم یا غیر مستقیم روی تولید مثل و باروری مادیان مؤثرند. قارچ‌ها در پوست و مخاط از جمله مخاطات دستگاه تولید مثل حیوانات خون گرم، تحت عنوان فلور قارچی حضور دارند. برخی قارچ‌ها بالقوه بیماری‌زا هستند. کاندیدا و اسپرژیلوس جزء فلور قارچی واژن بوده و هر دو از عوامل بیماری‌زای فرصت طلب می‌باشند. در تلقیح طبیعی، میکروارگانیسم‌های اندام‌های تناسلی نر می‌توانند به ماده منتقل شوند (۶، ۱۲). در جفت گیری، فلور باکتریایی طبیعی اسب نر به دستگاه تناسلی ماده منتقل شده که در مدت ۷۲-۲۴ ساعت دفع می‌گردد (۲۳). در بررسی صورت گرفته عامل ۲ تا ۹٪ آندومتريت‌ها (۴۱) و ۱۰٪ سقط در مادیان (۸، ۹، ۳۱) عوامل قارچی بوده‌اند. فلور قارچی قسمت خارجی دستگاه تولید مثل مادیان در جهان کمتر مطالعه شده است. از ۳۱/۲٪ گاو آبستن و ۲۱/۴٪ گاو غیر آبستن قارچ‌های پنی سیلیوم، اسپرژیلوس، ژئوتریکوم و کاندیدا آلیکنس جدا شده است (۳۲). در وستیبول و واژن شتر، گونه‌های کاندیدا شامل آلیکنس، تروپیکالیس، زیلانوتیدس، کروژئی و



و نوع کلنی یادداشت و کلنی‌های مخمری نیز، جهت خالص سازی کشت مجدد شدند. قارچ‌ها براساس مشخصه‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک تشخیص داده شدند (۲۳، ۱۰).

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** از آزمون Kolmogorov-Smirnov جهت تعیین نرمال بودن توزیع متغیرها استفاده گردید. از آن جایی که داده‌ها توزیع نرمال نداشتند، لذا از آزمون‌های غیر پارامتریک U man-Whitney و Kruskal-Wallis به ترتیب جهت آزمون تفاوت میانگین قارچ‌ها در گروه‌های دو ارزشی و گروه‌های بیش از دو ارزشی استفاده گردید. همچنین در خصوص همبستگی بین سن و تعداد زایمان با انواع قارچ‌ها، آزمون همبستگی پیرسون مورد استفاده قرار گرفت. آنالیزها داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد.

### نتایج

از ۱۵۱ رأس مادیان، ۱۲۳ (۸۱/۵٪) مورد رشد قارچ، مثبت بود. تعداد نمونه‌ها و درصد موارد مثبت براساس گروه‌های سنی، آبستنی، نوع تلقیح (طبیعی یا مصنوعی)، وضعیت تلقیح و باروری در جدول دو آمده است. همان طور که در جدول یک دیده می‌شود موارد مثبت در همه متغیرها بیشتر از ۷۰٪ بود. از ۴۵۳ ناحیه‌ای که کشت قارچ انجام شد، ۲۱۹ (۴۸/۳٪) ناحیه رشد قارچ رشته‌ای مثبت داشتند که فراوانی آن‌ها به تفکیک شامل: ۷۴ (۴۹٪) مورد وستیبول، ۷۵ (۴۹/۷٪) مورد کلیتورال فوسا و ۷۰ (۴۶/۴٪) مورد واژن بود. جمع کلنی‌های شمارش شده ۶۶۶ کلنی بود که در مورد وستیبول ۲۴۰ (۳۶/۰۴٪)، کلیتورال فوسا ۲۳۱ (۳۴/۶۸٪) و واژن ۱۹۵ (۲۹/۲۸٪) کلنی را شامل گردید (جدول ۲). حداقل یک و حداکثر ۲۰ کلنی در کشت قارچی مشاهده شد و میانگین ۴/۴۱ و ۱/۴۷ کلنی به ترتیب برای اسب و ناحیه ارگان تولید مثلی بدست آمد. در ۵۱٪ مورد فقط قارچ رشته‌ای و در ۸/۱۷٪ مورد هم قارچ رشته‌ای و هم مخمر رشد کرده بودند. فراوانی انواع قارچ‌های جدا شده در جدول ۳ بیان شده است. قارچ‌های جدا شده با فراوانی بالا شامل: آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلووس، آسپرژیلوس گلاکوس، آسپرژیلوس نیجر، اسکوپولاریوپسیس، کلادوسپوریوم، پنی سیلیوم و آلترناریا بود. ۲۳۱ کلنی متعلق به جنس آسپرژیلوس با ۷ گونه بود. آسپرژیلوس فومیگاتوس با ۱۵۶ کلنی بیشترین و پس از آن آسپرژیلوس فلووس با ۵۱ و آسپرژیلوس نیجر با ۲۵ کلنی قرار داشتند. ۸ کلنی متعلق به خانواده آسپرژیلوس‌های سیاه بود. دو گونه آسپرژیلوس شناسایی نشد. از دیگر قارچ‌ها اسکوپولاریوپسیس، کلادوسپوریوم، پنی سیلیوم، آلترناریا و فوزاریوم به ترتیب با ۹۳، ۳۵، ۳۱، ۲۶، ۲۰ کلنی حضور داشتند (جدول ۳). جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها (با متغیرهای مختلف) از آزمون‌های یومن - ویتنی Mann-Whitney U و کروسکال-والیس Kruskal-Wallis و برای بررسی همبستگی از آزمون پیرسون استفاده گردید. آسپرژیلوس فومیگاتوس در آزمون کروسکال-والیس با رتبه

آسپرژیلوس، موکوراسه و کاندیدا فاماتا می‌توانند سبب آندومتريت، سقط و مرگ نوزادان شوند (۸، ۲۱). واژینیت و آندومتريت در سگ در نتیجه عوامل قارچی دیده شده است (۵) و قارچ‌های مختلف از فلور واژن و شیر جداسازی و شناسایی شده‌اند. بیش از ۷۰٪ زنان در طول عمر خود حداقل یک بار تجربه ولوواژینیت را داشته‌اند. شیوع آن عمدتاً با منشاء کاندیدیایی توصیف شده است (۱۱، ۲۶). در مطالعه فلور قارچی چشم اسب، آسپرژیلوس‌ها دارای فراوانی زیادی بودند و بیشترین میزان کلنی قارچی در نژاد پونی خزر ذکر شده است (۱۳). آلترناریا می‌تواند در پوست و بافت ملتحمه انسان و حیوان یافت شود (۱۸، ۴۰)، این قارچ کراراً با التهاب ریه‌های حساس، آسم برونشیتی، سینوزیت آلرژیک و التهاب بینی همراه می‌باشد (۱۷، ۲۸، ۳۳). میکروارگانيسم‌ها مسئول گسترش بسیاری از بیماری‌ها بوده که به طور مستقیم یا غیر مستقیم روی عملکرد تولید مثل دام‌های مختلف مؤثر هستند. افزایش اطلاعات در خصوص میکروفلور پوست و مخاطات حیوانات برای درک بهتر فرآیندهای بیماری‌زا، ضروری است (۲۴). مدارک کمی در مورد وضعیت فلور قارچی (رشته‌ای) طبیعی در دستگاه تولید مثل در دام‌ها در دسترس می‌باشد (۲۴). درمان آنتی بیوتیکی و هورمونی وقوع عفونت‌های قارچی فزاینده را در انسان سبب شده‌اند (۲۶، ۲۷).

نظر به اینکه مطالعات محدودی در زمینه آلودگی قارچی سیستم تولید مثل در مادیان‌ها صورت گرفته است، لذا هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی فلور قارچی ارگان‌های خارجی دستگاه تولید مثل مادیان‌های سالم بود.

### مواد و روش کار

**دام‌ها:** نمونه‌ها از ۱۵۱ رأس مادیان به ظاهر سالم از خرداد تا دی ماه ۱۳۹۳ جمع‌آوری شد. سن مادیان‌ها براساس وجود پرونده‌های در دسترس از ۱ تا ۲۳ سال بود. اسب‌ها در محل استقرار، در تراوا مقید شده و نمونه برداری‌ها انجام می‌شد. سن، وضعیت آبستنی، نوع تلقیح (طبیعی یا مصنوعی) دام تلقیح شده از اوراق مربوطه ثبت شدند (جدول ۱).

**نمونه گیری:** نمونه‌ها از سه ناحیه مختلف جمع‌آوری گردید: (۱) وستیبول (۲) کلیتورال فوسا و (۳) واژن. از هر ناحیه دو نمونه سواب برداشته شد و در لوله استریل درب دار قرار داده شدند. از سواب پنبه‌ای استریل برای نمونه‌برداری استفاده شد. نمونه‌ها در شرایط دمایی پایین در کنار کیسه یخ در مدت حداکثر ۶ ساعت به آزمایشگاه مرکز تحقیقات قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل شدند.

**عملیات آزمایشگاهی (Laboratory examination) (کشت نمونه‌ها):** نمونه‌ها در محیط سابورو دکستروز آگار حاوی ۰/۰۰۵٪ کلرامفنیکل برای جداسازی و شناسایی قارچ‌ها کشت شدند. هر سواب در دو محیط کشت و پلیت‌ها به مدت ۱۵ روز در انکوباتور ۳۰°C قرار داده شدند. رشد کلنی قارچی از روز دوم بررسی و در صورت مثبت بودن، تعداد



جدول ۱. فراوانی موارد مثبت براساس گروه سنی، نوع تلقیح، آبستنی، وضعیت تلقیح و باروری درمادیانهای نمونه گیری شده.

جدایه	سن (سال) (%)			تلقیح		آبستنی		نوع تلقیح		باروری	
	۱-۳	۴-۱۰	۱۱≤	-	+	-	+	طبیعی	مصنوعی	سالم	نابارور
+	۱۶ (۶۹/۵)	۶۰ (۷۸/۹)	۴۶ (۸۸/۴)	۴۰ (۸۱/۶)	۸۳ (۸۱/۴)	۲۳ (۷۶/۷)	۶۰ (۸۴/۵)	۶۳ (۸۱/۸)	۱۹ (۷۹/۲)	۷۷ (۸۱/۱)	۵ (۸۳/۳)
-	۷ (۳۰/۴)	۱۶ (۲۱)	۶ (۱۷/۵)	۹ (۱۸/۴)	۱۹ (۱۸/۶)	۷ (۲۳/۳)	۱۱ (۱۵/۵)	۱۴ (۱۸/۲)	۵ (۲۰/۸)	۱۸ (۱۸/۹)	۱ (۱۶/۷)
جمع	۲۳	۷۶	۵۲	۴۹	۹۲	۳۰	۷۱	۷۷	۲۴	۹۵	۶

جدول ۲. فراوانی و میانگین کلنی قارچ‌های رشته‌ای در قسمت خارجی دستگاه تولید مثل به تفکیک ناحیه.

ناحیه	تعداد	حد اکثر کلنی	تعداد کل کلنی (%)	میانگین کلنی
وستیبول	۱۵۱	۲۰	۲۴۰ (۳۶/۰۴)	۷/۵۹
کلیتورال فوسا	۱۵۱	۱۵	۲۳۱ (۳۴/۶۸)	۷/۵۳
واژن	۱۵۱	۱۲	۱۹۵ (۲۹/۲۸)	۷/۲۹
کل	۴۵۳		۶۶۶ (۱۰۰)	

میانگین ۸۴۸۸/۷۲ دارای اختلاف میانگین با بقیه قارچ‌ها بود ( $p < 0/05$ ). همچنین قارچ اسکوپولاریوپسیس در ناحیه کلیتورال فوسا با دو ناحیه وستیبول و واژن اختلاف معنی دار داشت ( $p < 0/05$ ). قارچ کلادوسپوریوم در این مطالعه با سن و تعداد زایمان به ترتیب با ضریب همبستگی  $r = 0/171$  و  $r = -0/094$  همبستگی ضعیف مستقیم را نشان داد ( $p < 0/05$ ). بین آلترناریا با سن با رتبه میانگین  $r = -0/094$  رابطه ضعیف معکوس وجود داشت ( $p < 0/05$ ).

## بحث

در این مطالعه اکثر قارچ‌های رشته‌ای قسمت خارجی دستگاه تولید مثل مادبان جداسازی و شناسایی شدند. اطلاع از مایکوفلور دستگاه تولید مثل مادبان برای فهم اختلالات و بیماری‌های تولید مثل ضروری است. قارچ‌های جدا شده بیشتر ساپروفیت هستند. اسپرژیلوس جزء فلور قارچی است که یک فرصت طلب بیماری‌زا می‌باشد. داده‌های منتشر شده در خصوص فلور قارچی دستگاه تناسلی حیوانات کم می‌باشد. قارچ‌ها می‌توانند به دلیل تولید مستقیم یا غیر مستقیم توکسین (ها)، باعث اختلالات تولید مثل شوند. Ismail و همکاران سال ۲۰۱۴، اسپرژیلوس فومیگاتوس را شایع ترین گونه جدا شده از اسپرژیلوز مهاجم گزارش داده‌اند (۱۲). Ismar و همکاران سال ۱۹۷۵، پس از اسپرژیلوس فومیگاتوس، گونه‌های شایع را اسپرژیلوس فلاوس، اسپرژیلوس نیجر و اسپرژیلوس ترئوس ذکر کردند و این در حالی است که Kontoyiannis و همکاران سال ۱۹۷۵، و Pugh و همکاران سال ۱۹۷۵، اسپرژیلوس ترئوس را از نظر بالینی به آموتریسین ب (AMB) مقاوم گزارش کرده‌اند (۱۴، ۲۱).

در مطالعه فلور دستگاه تناسلی شترهای ماده توسط Shokri و همکاران در سال ۲۰۱۰، هشت جنس مخمر جدا شد که شامل: کاندیدا، تریکوسپورون، ژنوتریکوم، ردوتورولا، کریپتوکوکوس، کلویورومایسس و آتروبازدیوم بودند که کاندیدا با ۷۳/۱٪ بیشتر از کلیه قارچ‌ها بود. در میان

کاندیداها، کاندیدا زیلانوتیدس بالاترین فراوانی را داشت که می‌تواند به عنوان فلور مخمری مقیم مطرح باشد (۲۸). Garoussi Talebkhان و همکاران در سال ۲۰۰۷ در گاو شیری از واژن و گردن رحم گاو، قارچ‌های پنی‌سیلیوم، اسپرژیلوس فومیگاتوس و اسپرژیلوس نیجر را جدا کردند (۳۲). این قارچ‌ها در این مطالعه نیز جداسازی شدند (جدول ۳). Rota و همکاران سال ۲۰۱۱ در نریان از اورترال فوسا و غلاف قضیب (Prepuce)، پنی‌سیلیوم، اسپرژیلوس، اسکوپولاریوپسیس، آکرومونوم و از مجرای ادراری پنی‌سیلیوم جدا کرده است (۲۳). این قارچ‌ها مشابه قارچ‌های جدا شده از مادبان‌ها می‌باشند ولی تنوع و فراوانی قارچ‌های جدا شده در اینجا از مادبان‌ها بیشتر بود. Ismail و همکاران سال ۲۰۱۴ در گاو میش‌های مبتلا به اندومتريت، متريت و ناباروری، منشاء حدود ۸٪ آن‌ها را عوامل قارچی دانسته‌اند. این قارچ‌ها شامل: پنی‌سیلیوم، اسپرژیلوس فومیگاتوس و اسپرژیلوس نیجر بودند که نقش این قارچ‌ها را در بیماری‌های تولید مثل در صورت وجود عوامل مستعد کننده نشان می‌دهد (۱۲). Blue سال ۱۹۸۳ و Soeria-Atmadja و همکاران سال ۲۰۱۰، گزارش کردند که کلادوسپوریوم، پنی‌سیلیوم، اسپرژیلوس و آتروبازدیوم در ایجاد حساسیت و کاندیدا و اسپرژیلوس در التهاب دستگاه تولید مثل نقش دارند (۱، ۲۷). Traboulsi و همکاران سال ۲۰۰۷، جنس اسپرژیلوس را به عنوان قارچ غالب از آندومتريت و متريت که از بیماری‌های شایع هستند جدا نمودند (۳۷). Zafracas سال ۱۹۷۵ آندومتريت ناشی از کاندیدا را در مادبان‌های نژاد تربورد گزارش نمود (۴۲).

سدوسپوریوم با میانگین رتبه ۵۵۵۳/۳۰ اختلاف معنی دار با دیگر قارچ‌ها را نشان داد. O'Bryan سال ۲۰۰۵، سودوالشریا بوئیدی و شکل غیر جنسی آن سدوسپوریوم آپوسپرموم یک بیماری‌زای فرصت طلب مهم در مایکوز مهاجم در بیماران با ضعف ایمنی ذکر کرده است. بیماری تهاجم ریوی، عفونت سیستم عصبی مرکزی و شکل منتشر بیماری از تظاهرات جدی قارچ سودوالشریا بوئیدی در این بیماران می‌باشد (۱۹). Cuenca-Estrella و همکاران ۲۰۰۳، قارچ اسکوپولاریوپسیس را یک قارچ بیماری‌زای مقاوم در برابر ضد قارچ‌های وسیع الطیف توصیف نموده است (۷). این قارچ در ناحیه کلیتورال فوسا با میانگین رتبه‌ای ۲۳۸/۴۷ از نظر توزیع کلنی قارچی، با وستیبول و واژن دارای اختلاف معنی دار بود ( $p < 0/05$ ). Bouziane و همکاران سال ۲۰۰۵، نقش کلادوسپوریوم را در عفونت‌های ریوی و ایجاد حساسیت توصیف نموده است (۳). قارچ کلادوسپوریوم در این مطالعه با متغیرهای سن و تعداد زایمان به ترتیب با ضریب همبستگی  $r = 0/101$



جدول ۳. فراوانی قارچ‌های رشته‌ای جدا شده از قسمت خارجی دستگاه تولید مثل مادیان.

نوع قارچ	وستیبول (%)	کلیتورال فوسا (%)	واژن (%)	کل (%)
آسپرژیلوس	۱۳۸ (۲۰/۷۲)	۱۲۰ (۱۸/۰۲)	۱۰۴ (۱۵/۶۲)	۳۶۲ (۵۴/۳۶)
اسکوپولاریوپسیس	۲۷ (۴/۰)	۴۸ (۷/۲)	۱۸ (۲/۷)	۹۳ (۱۴)
کلادوسپوریوم	۱۵ (۲/۳)	۸ (۱/۲)	۱۲ (۷/۸)	۳۵ (۵/۲)
پنی سیلیوم	۱۱ (۷/۶)	۱۶ (۲/۴)	۴ (۰/۶)	۳۱ (۴/۷)
آلترناریا	۱۱ (۷/۶)	۸ (۱/۲)	۲ (۷/۰)	۲۶ (۳/۹)
فوزاریوم	۲ (۰/۳)	۸ (۱/۲)	۱۰ (۷/۵)	۲۰ (۳/۰)
آتروپازیدیوم	۶ (۰/۹)	۲ (۷/۰)	۱ (۰/۱)	۱۴ (۲/۱)
سودالشریا بوئیدی	۳ (۰/۴)	۱ (۰/۱)	۲ (۷/۰)	۱۱ (۷/۶)
آکرمونیوم	۴ (۰/۶)	۲ (۰/۳)	۴ (۰/۶)	۱۰ (۷/۵)
کرایزوسپوریوم	۱ (۰/۱)	۱ (۰/۱)	۶ (۰/۹)	۸ (۷/۲)
ژنومایسس	۲ (۰/۳)	۵ (۰/۷)	-	۷ (۷/۰)
گرافیموم	۵ (۰/۷)	-	۲ (۰/۳)	۷ (۷/۰)
سدوسپوریوم	-	۳ (۰/۴)	۴ (۰/۶)	۷ (۷/۰)
یولوکلادیوم	۲ (۰/۳)	-	۵ (۰/۷)	۷ (۷/۰)
فونسکا	۴ (۰/۶)	۱ (۰/۱)	۱ (۰/۱)	۶ (۰/۹)
کورولاریا	۲ (۰/۳)	-	۲ (۰/۳)	۴ (۰/۶)
فیالوفورا	-	۲ (۰/۳)	۲ (۰/۳)	۴ (۰/۶)
چاتمپوم	-	۱ (۰/۱)	۲ (۰/۳)	۳ (۰/۴)
کلادوفیالوفورا	۳ (۰/۴)	-	-	۳ (۰/۴)
تریکوتشیوم	-	۱ (۰/۱)	۲ (۰/۳)	۳ (۰/۴)
بایبولاریس	-	-	۲ (۰/۳)	۲ (۰/۳)
امونسیا	۱ (۰/۱)	-	۱ (۰/۱)	۲ (۰/۳)
استمفیلیوم	۱ (۰/۱)	-	۱ (۰/۱)	۲ (۰/۳)
ونجیلا	۲ (۰/۳)	-	-	۲ (۰/۳)
فتوآکرمونیوم	-	۱ (۰/۱)	-	۱ (۰/۱)
جمع	۱۹۵ (۲۹/۳)	۲۳۱ (۳۴/۷)	۲۴۰ (۳۶/۰)	۶۶۶

هورمونی بعد از آمیزش، ترشح موکوس و تغییرات pH واژنی در زمان فعلی در مادیان‌های تلقیح شده می‌تواند در کاهش میزان آلترناریا در گروه مربوطه دخالت داشته باشد. کلنی آسپرژیلوس‌ها در محیط اطراف انسان و دام‌ها پراکنده است. وجود آسپرژیلوس با تنوع گونه‌ای و فراوانی بالا می‌تواند به عنوان فلور مقیم قسمت واژن محسوب گردد (۳۸،۳۹). آن‌ها می‌توانند در بروز بیماری‌های تولید مثل به صورت مستقیم یا غیر مستقیم و همراه با دیگر عوامل قارچی و عوامل مستعد کننده نقش داشته باشند.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌کند که ممکن است بیشتر قارچ‌های جدا شده جزء قارچی قسمت خارجی دستگاه تولید مثل اسب باشند. این قارچ‌ها در محیط، خاک و آب یافت می‌شوند در نتیجه شاید امکان اجتناب و جلوگیری از حضور آن‌ها در دستگاه تولید مثل مادیان وجود نداشته باشد و در نتیجه آلودگی ناحیه واژن به این قارچ‌های ساپروفیت وجود دارد. بیشتر این قارچ‌ها، فرصت طلب بیماریزا هستند و می‌توانند در صورت وجود شرایط مستعد کننده مثل عفونت‌ها و یا آنتی بیوتیک درمانی گسترده موجب اختلال در دستگاه تولیدمثل گردند. قارچ اسکوپولاریوپسیس که از

و  $t=0/171$ ، همبستگی ضعیف مستقیم را نشان داد ( $p<0/05$ ). یعنی با افزایش سن و نیز تعداد زایمان میزان کلادوسپوریوم افزایش داشت. هر چند این همبستگی شدت قوی را نشان نداد ولی این عوامل قارچی در صورت وجود شرایط مناسب، همانند بروز حساسیت‌های غیر طبیعی، درمانی طولانی با آنتی بیوتیک، درمان‌های موضعی ناحیه واژن و گردن رحم، مصرف مضع‌های ایمنی و زمین‌گیری، می‌توانند ایجاد بیماری نمایند (۳۳). بین آلترناریا با سن رابطه  $r=-0/094$  ضعیف معکوس وجود داشت ( $p<0/05$ ). Nema و همکاران سال ۱۹۶۶ و Yu سال ۱۹۶۵ ذکر کرده اند که آلترناریا می‌تواند در پوست و ملتحمه انسان و حیوان یافت شود (۱۸،۴۱) و Pastor و همکارش ۲۰۰۸ دخالت آلترناریا در بروز عفونت‌های ساپروفیتی و آلرژی در انسان را توصیف کرده است (۲۰). در بررسی Lyke و همکاران ۲۰۰۱ و Shugar و همکاران ۱۹۸۱، قارچ آلترناریا کرارا از التهاب ریه حساس، آسم برونشی و سینوزیت آلرژیک و التهاب بینی در انسان جدا کردند (۱۷،۲۹). قارچ آلترناریا در آزمون یومن-ویتنی در گروه آمیزش نکرده‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $p<0/05$ ). تحریک و تغییرات



## References

1. Blue, M.G. (1983) Mycotic invasion of the mare's uterus. *Vet Rec.* 113: 31-2.
2. Barnes, P.D., Marr, K.A. (2006) Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 20: 545-61.
3. Bouziane, H., Latge, J.P., Fitting, C., Mecheri, S., Lelong, M., David, B. (2005) Comparison of the allergenic potency of spores and mycelium of *Cladosporium*. *Allergol Immunopathol (Madr).* 33: 125-30.
4. Chengappa, M.M., Madux, R.I., Greer, S.C. (1984) Isolation and identification of yeasts and yeastlike organisms from clinical veterinary sources. *J Clin Microbiol.* 19: 427-428.
5. Cleff, M.B., Lima, A.P., Faria, R.O., Meinerz, A.R.M., Antunes, T.A., Araujo, F.B. (2005) Isolation of *Candida* spp from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. *Br J Microbiol.* 36: 201-204.
6. Couto, M.A., Hughes, J.P. (1993) Sexually transmitted (venereal) disease of horses. In: *Equine Reproduction*. McKinnon, A.O., Voss, J.L. (eds.). (1<sup>st</sup> ed.) Philadelphia, USA. Lea & Febiger. p. 845-54.
7. Cuenca-Estrella, M., Gomez-Lopez, A., Melgado, E., Buitrago, M.J., Monzo'n, A., Rodriguez-Tudela, J., Unidad, L. (2003) *Scopulariopsis brevicaulis*, a fungal pathogen resistant to broad-spectrum antifungal agents. *Antimicrobial agents and Chemotherapy.* 47: 2339-2341.
8. Giles, R.C., Donahue, J.M., Hong, B., Tuttle, P.A., Petrites-Murphy, M.B., Poonacha, K.B. (1993) Causes of abortion, stillbirth, and perinatal death in horses: 3527 cases (1986 -1991). *J Am Vet Med Ass.* 203: 1170 -5.
9. Hong, C.B., Donahue, J.M., Giles, J.R.C., Petrites-Murphy, M.B., Poonacha, K.B., Roberts, A.W. (1993) Etiology and pathology of equine placentitis. *J Vet Diagn Invest.* 5: 56-63.
10. de Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Figueras, M.J. (2000) *Atlas of Clinical Fungi*. (2<sup>nd</sup> ed.) Utrecht, Centraal Bureau Voor Schimmel Cultures. Utrecht, Netherlands.
11. Fidel, J.R., Cutright, J., Steele, C. (2000) Effects

عفونت اندام‌های مختلف جدا شده است و در مقابل ضد قارچ‌هایی با طیف وسیع مقاومت نشان می‌دهد، می‌تواند یکی از عوامل دخیل در بیماری‌های تولید مثل در اسب مطرح گردد. ترشح مایکوتوکسین‌ها از قارچ‌های جدا شده همانند *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *فلاوس* نیز می‌توانند به صورت مستقیم یا غیر مستقیم موجب اختلال در دستگاه تولید مثل گردند. اکثر قارچ‌های رشته‌ای جدا شده در این مطالعه می‌توانند به عنوان فلور قارچی مقیم قسمت خارجی دستگاه تولید مادیان محسوب شوند. آن‌ها می‌توانند در بروز بیماری‌های دستگاه تناسلی اسب اهمیت داشته باشند. نیاز است که مطالعه بیشتری در این مورد انجام پذیرد.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری دکتر باقر حسین پور، دکتر عقیل شریف زاده، و مهندس اسد بالان که در تجزیه و تحلیل آماری، عملیات آزمایشگاهی و مزرعه‌ای همکاری نمودند نهایت تشکر را داریم.

of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infect Immunol.* 68: 651-7.

12. Ismail, S., Chavoshi, M., Hussaini, J., Malekshaabani, Sh. (2014) Uterine Mycotic Flora in Healthy Buffaloes and Buffaloes with Reproductive Disorders. *Life Science Journal.* 11: 400-402.
13. Khosravi, A.R., Nikaein, D., Sharifzadeh, A., Gharagozlou, F. (2014) Ocular fungal flora from healthy horses in Iran. *Science Direct J Medical Mycology.* 24: 29-33.
14. Kontoyiannis, D.P., Lewis, R.E., May, G.S., Osherov, N., Rinaldi, M.G. (2002) *Aspergillus nidulans* is frequently resistant to amphotericin B. *Mycoses.* 45: 406-7.
15. Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E. (1992) Infections due to miscellaneous molds. *Medical mycology.* p. 733-767.
16. Laing, J.A., Bringley Morgan, W.J., Wagner, W.C. (1988) *Fertility and Infertility in Veterinary Practice*. (4<sup>th</sup> ed.) Bailliere Tindall. London, UK.
17. Lyke, K.E., Miller, N.S., Towne, L., Merz, W.G. (2001) A case of cutaneous ulcerative alternariosis: rare association with diabetes mellitus and unusual failure of itraconazole treatment. *Clin Infect Dis.* 32: 1178-1187.
18. Nema, H.V., Ahuja, O.P., Bal, A., Mohapatra, L.N. (1966) Mycotic flora of the conjunctiva.



- Am J Ophthalmol. 62: 968- 970.
19. O'Bryan, T.A. (2005) Pseudallescheriasis in the 21<sup>st</sup> century. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 3: 765-73.
  20. Ogawa, H., Fujimura, M., Amaike, S., Matsumoto, Y., Kitagawa, M., Matsuda, T. (1997) Eosinophilic pneumonia caused by *Alternaria alternata*. *Allergy.* 52: 1005-1008.
  21. Pastor, F.J., Guarro, J. (2008) *Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. *Clin Microbiol Infect Aug.* 14: 734-46.
  22. Pugh, D.G., Martin, M.T., Shull, J.W., Bowen, J.M. (1986) Endometrial candidiasis in five mares. *J Equine Vet Sci.* 6: 40-43.
  23. Raper, K.B., Fennell, D.I. (1965) *The Genus Aspergillus*, Williams and Wilkins, Baltimore. (1<sup>st</sup> ed.) New York, USA.
  24. Rota, A., Calicchio, E., Nardonib, S., Fratinib, F., Ebanib, V.V., Sgorbinia, M., Panzania, D., Camilloa, F., Manciantib, F. (2011) Presence and distribution of fungi and bacteria in the reproductive tract of healthy stallions. *Theriogenology.* 76: 464-470.
  25. Rozanski, P., Slaska, B., Rozanska, D. (2013) The current status of prevalence of yeast-like fungi in the environment of horses bred in Poland. *Ann Anim Sci.* 2: 365-374.
  26. Sobel, J.D., Faro, S., Force, R., Foxman, B., Ledger, W.J., Nviriesy, P.R. (1998) Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol.* 178: 203-11.
  27. Sobel, J.D., Chaim, M.D. (1996) Update on treatment of vulvovaginal candidiasis. *Rev Iberoam Micol.* 13: 44-6.
  28. Soeria-Atmadja, D., Onell, A., Borga, A. (2010) IgE sensitization to fungi mirrors fungal phylogenetic systematics. *J Allergy Clin Immunol.* 125: 1379-86.
  29. Shokri, Sh., Khosravi, A.R., Sharifzadeh, A., Tootian, Z. (2010) Isolation and identification of yeast flora from genital tract in healthy female camels. *Vet Microbiol.* 144: 183-186.
  30. Shugar, M.A., Montgomery, W.W., Hyslop, N.E. (1981) *Alternaria* sinusitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 90: 251-254.
  31. Summerbell, R.C., Kane, J., Krajden, S. (1989) Onychomycosis, tinea pedis and tinea manuum caused by non-dermatophytic filamentous fungi. *Mycoses.* 32: 609-619.
  32. Swerczek, T.W., Dennis, S.M. (2007) Fungal abortion. In: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology.* (2<sup>nd</sup> ed.). Youngquist, R.S., Threrfall, W.R. (eds.). Saunders Elsevier. Philadelphia, USA. p. 188-9.
  33. Talebkhan Garoussi, M., Khosravi, A.R., Havareshti, P. (2007) Mycoflora of cervicovaginal fluids in dairy cows with or without reproductive disorders. *Mycopathologia.* 164: 97-100.
  34. Sutton, D.A., Sanche, S.E., Revankar, S.G., Fothergill, A.W., Rinaldi, M.G. (1999) In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. *J Clin Microbiol.* 37: 2343-5.
  35. Tosti, A., Piraccini, B.M., Stinchi, C., Lorenzi, S. (1996) Onychomycosis due to *Scopulariopsis brevicaulis*: clinical features and response to systemic antifungals. *Br J Dermatol.* 135: 799-802.
  36. Traboulsi, R.S., Kattar, M.M., Dbouni, O., Araj, G.F., Kanj, S.S. (2007) Fatal brain infection caused by *Aspergillus glaucus* in an immunocompetent patient identified by sequencing of the ribosomal 18S-28S internal transcribed spacer. *26: 747-50.*
  37. Verma, S., Katoch, R.C., Jand, S.K., Sharm, B.M., Nigam, P. (1999) Mycobiotic flora of female genitalia of buffaloes and cows with reproductive disorders. *Vet Res Commun.* 23: 337-41.
  38. Walsh, T.J., Groll, A.H. (2001) Overview: non-fumigatus species of *Aspergillus*: perspectives on emerging pathogens in immunocompromised hosts. *Curr OpinInvestig Drugs.* 2: 1366-7.
  39. Walsh, T.J., Petraitis, V., Petraitiene, R. (2003) Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *J Infect Dis.* 188: 305-19.
  40. Williamson, P., Munyua, S., Martin, R., Penhale, W.J. (1987) Dynamics of the acute uterine



- response to infection, endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare. *J Reprod Fertil.* 35: 317-25.
41. Yu, H.(1965) Studies on fungi of the normal skin. *Hifuka kiyo. Acta dermatologica.* 60: 126-174.
42. Zafracas, A.M. (1975) Candida infection of the genital tract in thoroughbred mare. *J Reprod Fertil Suppl.* 23: 349 -51.



## Isolation and identification of molds flora in external genital tract of healthy mares

Azarvandi, A.<sup>1,3</sup>, Talebkhan Garoussi, M.<sup>2\*</sup>, Khosravi, A.<sup>3</sup>, Hosseini, A.<sup>2</sup>, Gharagozloo, F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Agriculture Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Ministry of Agriculture Jihad, Iran

<sup>2</sup>Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Mycology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

(Received 8 October 2016, Accepted 14 January 2016)

### Abstract:

**BACKGROUND:** Microorganisms are responsible for development of many diseases, which directly or indirectly affect reproductive performance in mares, like various animal species. Fungi are present at mucous membranes of reproductive tract as mycoflora in warm blooded animals. **OBJECTIVES:** The aim of this study was isolation and identification of molds of external reproductive tract in mares. **METHODS:** Samples were collected from genital tract of 151 mares in different ages from horse breeding farms and clubs suburb of Tehran from April to December, 2014. Age, pregnancy, insemination and mating were recorded. Samples were taken by sterile cotton swabs from 3 different sites, (1) vestibule, (2) clitoral fossa and (3) vagina and transferred under cold condition to the laboratory of Mycology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran. Samples were inoculated in Sabouraud glucose agar supplemented with antibiotic (chloramphenicol; 0.005) and kept at 30°C for 10-15 days before being considered negative. Fungal identification relied on morphologic and physiologic features. SPSS Version 20 was used for statistical analysis of the data. **RESULTS:** Totally, 666 filamentous fungi colonies were isolated. Maximum colony (CFUs) were 20 and 37 colonies for each site and horse, respectively. In total, 81.5 percent of mares and 48.3 percent of different sites were positive. The most predominant isolates were *Aspergillus* spp 362(54.35%), *Scopulariopsis* 93(13.96%), *Cladosporium* 35(5.25%), *Penicillium* 31(4.65%), *Alternaria* 26(3.90%), *Fusarium* 20(3.03%). *Aspergillus* took high occurrence with 362 and *A. fumigatus* with 156 colonies followed by *Scopulariopsis* 93, *Cladosporium* 35 and *Pencillium* 31. *A. fumigatus* had significant difference among other fungi  $p < 0.05$ . Among sites, 39.51% for filamentous fungi and 8.17% for both filamentous fungi and yeasts were positive. **CONCLUSIONS:** Isolated filamentous fungi could be resident flora of external reproductive tract of mares. These saprophytic pathogen fungi in predisposing conditions could be causative agents of endometritis and infertility in mares.

**Keyword:** moldflora, aspergillus, reproductive, horse

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Frequency of positive cases based on age groups, mating, pregnancy, and fertility of sampled mares.

**Table 2.** Frequency of filamentous fungi colonies in 3 portions of external of reproductive tract.

**Table 3.** Frequency of molds isolated from different sites of external of genital tract of mares.

\*Corresponding author's email: garoussi@ut.ac.ir, Tel: 021-66929532, Fax: 021-66933222

J. Vet. Res. 72, 1, 2017

