



شماره پایان نامه: ۲۲۸

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری حرفه‌ای رشته دامپزشکی

بررسی پلی مورفیسم ژن کد کننده رسپتور اینترلوکین ۸ و ارتباط
آن با استعداد به ورم پستان در گاو هولشتاین

استادان راهنما:

دکتر همایون رضا شهبازکیا، دکتر ناصر شمس اسفند آبادی

استاد مشاور:

دکتر احمد رضا محمد نیا

پژوهشگر:

عقیل علیدوستی

مهر ماه ۱۳۸۹

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



پایان نامه دکتری حرفه‌ای رشته‌ی دامپزشکی

بررسی پلی مورفیسم ژن کد کننده رسپتور اینترلوکین ۸ و ارتباط
آن با استعداد به ورم پستان در گاو هولشتاین

استادان راهنما:

دکتر همایون رضا شهبازکیا، دکتر ناصر شمس اسفند آبادی

استاد مشاور:

دکتر احمد رضا محمد نیا

پژوهشگر:

عقیل علیدوستی

مهر ماه ۱۳۸۹



پایان نامه آقای عقیل علیدوستی جهت اخذ درجه دکتری رشته دامپزشکی با عنوان: بررسی پلی مورفیسم ژن کد کننده رسپتور اینترلوکین ۸ و ارتباط آن با استعداد به ورم پستان در گاو هولشتاین در تاریخ ۱۳۸۹/۷/۲۵ با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با رتبه / نمره.....مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. استاد راهنمای پایان نامه دکتر همایون رضا شهباز کیا با مرتبه علمی استادیار امضاء

۲. استاد راهنمای پایان نامه دکتر ناصر شمس اسفند آبادی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

۳. استاد مشاور پایان نامه دکتر محمد رضا محمدنیا با مرتبه علمی دانشیار امضاء

۴. استاد داور داخلی گروه دکتر محمد شادخواست با مرتبه علمی استادیار امضاء

۵. استاد داور خارجی گروه دکتر ابوالفضل شیرازی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

مسئولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ مسئولیتی را در این زمینه تقبل نمی نماید.

دکتر حسین نورانی
رئیس دانشکده دامپزشکی

دکتر سعید حبیبیان دهکردی
معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی
دانشکده دامپزشکی

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات ابتکارات
و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه شهر کرد است.

با تشکر از اساتید گرانقدر آقایان دکتر شهباز کیا و دکتر شمس که به عنوان اساتید راهنما، من را در انجام این پایان نامه یاری نمودند و بدون راهنمایی های ایشان انجام این پایان نامه ممکن نبود.

با تشکر از استاد گرانقدر آقای دکتر محمدنیا که اگر زحمات و مشاوره های مستمر ایشان نبود این پایان نامه به انجام نمی رسید.

با تشکر از اساتید گرانقدر آقایان دکتر شیرازی و دکتر شادخواست که زحمت داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند و در طول این پایان نامه از نظرات و پیشنهادات ایشان بهره مند شدم.

از تمامی استادان عزیز و کارکنان محترم دانشکده دامپزشکی که در طول دوره تحصیلی ام، از هیچ تلاشی فروگذاری نکرده اند، سپاسگزارم.

از تمامی همکلاسی های عزیز و خوبم که دوران خوشی را با آنها سپری نمودم، نهایت قدردانی را داشته و از خداوند یکتا برایشان سلامت و بهروزی خواستارم.

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی
به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است
به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهمان به شجاعت می گراید
و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند

مجموعه حاضر را تقدیم می کنم به:

پدر خوبم و مادر مهربانم

برادران عزیزم و خواهر گلم

امیدوارم همیشه در مراحل زندگی خود سلامت و پیروز باشید.

چکیده

CXCR2 و CXCR1 اولین رسپتور های کموکاینی بودند که کشف شدند. این رسپتور ها تنها رسپتور های شناخته شده در پستانداران برای کموکاین های ELR^+CXCR شامل اینترلوکین ۸ هستند و برای کنترل فعالیت نوتروفیل توسط کموکاین ها دارای اهمیت هستند. در این مطالعه برای بررسی پلی مورفیسم ژن کد کننده CXCR1 و ارتباط آن با بروز ورم پستان در گاو های هولشتاین ایران از ۳۵۰ رأس گاو شیری با عوامل مدیریتی و تغذیه ای یکسان نمونه خون گرفته شد. همچنین اطلاعات کامل در مورد تعداد شکم زایش و تعداد موارد ابتلا به ورم پستان با انجام مطالعه گذشته نگر و بررسی سوابق بایگانی شده، بدست آمد. DNA از خون با استفاده از روش salting out استخراج شد و با استفاده از پرایمر های طراحی شده، ژن کد کننده رسپتور CXCR1 در یک قطعه ۴۹۰ بازی از طریق PCR تکثیر شد. محصول PCR پس از تأیید توسط الکتروفورز تعیین توالی شد. نتایج بیانگر وجود یک جهش در G به C در ناحیه ۷۷۷ ژن کد کننده CXCR1 بود. نتایج حاصل از بررسی آماری نشان دادند که میانگین بروز ورم پستان بالینی در هر دوره شیرواری در گاو هایی که ژنوتیپ GG از ژن کد کننده CXCR1 را داشته اند به طور معنی داری ($P=0.02$) کمتر از گاو هایی بوده است که دارای ژنوتیپ CC از ژن مورد نظر بوده اند اما بروز ورم پستان بالینی بین گاو هایی که دارای ژنوتیپ GC بودند با گاو هایی که ژنوتیپ GG یا CC را داشتند تفاوت معنی داری نداشت. موتاسیون ناحیه ۷۷۷ از ژن CXCR1 در بخشی از این ژن قرار گرفته است که در کد کردن بخش درون سلولی CXCR1 نقش دارد. این بخش درون سلولی در سیگنال دهی داخل سلول، تغییر شکل سلولی و کموتاکسی دخیل است. بنابراین جهش شناسایی شده در ناحیه ۷۷۷ از ژن CXCR1 احتمالاً از طریق تغییر ترکیب آمینواسیدی و ساختمان پروتئینی بخش درون سلولی این رسپتور در بروز ورم پستان بالینی نقش دارد. اثر قابل توجه و معنی دار جهش مذکور بر بروز ورم پستان بالینی، قابلیت استفاده از ژن کد کننده CXCR1 را به منظور اصلاح نژاد مولکولی در جهت ایجاد مقاومت ذاتی به ورم پستان بالینی در گاو های شیری را به اثبات می رساند و بازکننده راهی به منظور کاهش زیان های اقتصادی حاصل از این بیماری خواهد بود.

کلمات کلیدی: ورم پستان، رسپتور های کموکاینی، CXCR1، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۵	فصل اول: مقدمه
۷	فصل دوم: کلیات
۷	۱-۲- ورم پستان
۸	۱-۱-۲- طبقه بندی انواع ورم پستان
۹	۲-۱-۲- پاتوژن های عامل ورم پستان
۹	۱-۲-۱-۲- ارگانسیم های واگیردار
۹	۲-۲-۱-۲- ارگانسیم های محیطی
۹	۳-۲-۱-۲- ارگانسیم های فرصت طلب
۹	۴-۲-۱-۲- ارگانسیم های دیگر
۱۰	۲-۲- ساختار پستان
۱۱	۳-۲- مکانسیم های دفاع پستان
۱۱	۱-۳-۲- دفاع آناتومیکی
۱۲	۲-۳-۲- دفاع سلولی
۱۳	۳-۳-۲- دفاع محلول
۱۵	۴-۲- تشخیص ورم پستان
۱۶	۵-۲- کموکاین ها
۱۸	۱-۵-۲- اینترلوکین ۸
۱۹	۶-۲- رسپتور های کموکاین ها
۱۹	۱-۶-۲- ساختار رسپتور های کموکاین ها
۲۰	۲-۶-۲- سیستم نامگذاری رسپتور های کموکاینی
۲۲	۳-۶-۲- CXCR1 و CXCR2
۲۴	۱-۳-۶-۲- نقش CXCR1 و CXCR2 در ورم پستان
۲۶	فصل سوم: مواد و روش کار
۲۶	۱-۳- انتخاب دام، نمونه گیری خون و شیر
۲۶	۲-۳- روش استخراج DNA از خون
۲۷	۳-۳- آنالیز ژنتیکی
۲۷	۴-۳- انجام واکنش PCR
۲۸	۵-۳- الکتروفورز و بررسی وجود محصول
۳۰	۶-۳- توالی یابی
۳۰	۷-۳- آنالیز آماری

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۳۱	فصل چهارم: نتایج
۳۴	فصل پنجم: بحث
۳۶	منابع

فهرست شکل ها

صفحه

عنوان

- شکل ۱-۲- نمای شماتیک غده پستانی گاو و جزئیات ساختار هر کیسه آلوئول
- نمودار ۱-۴- یک ناحیه بدون جهش و یک ناحیه با واریانت ژنتیکی هتروزیگوت CG
- نمودار ۲-۴- ژنوتیپ های مختلف رسپتور اینترلوکین ۸ و میانگین بروز ورم پستان بالینی به ازای هر دوره شیرواری

۱۰

۳۱

۳۳

فهرست جدول ها

صفحه

عنوان

۲۱	جدول ۱-۲- نامگذاری سیستماتیک رسپتور های کموکائینی، لیگاند ها و سلول های ایمنی اصلی مربوط به آنها
۲۸	جدول ۱-۳- حجم ها و غلظت های مورد استفاده برای انجام PCR برای یک نمونه
۲۸	جدول ۲-۳- سیکل ها و دماهای اعمال شده در آزمایش
۳۲	جدول ۱-۴- فراوانی آلل های شناسایی شده در ژن رسپتور اینترلوکین ۸ در جمعیت مورد مطالعه
۳۲	جدول ۲-۴- فراوانی ژنوتیپ های شناسایی شده در ژن رسپتور اینترلوکین ۸ در جمعیت مورد مطالعه
۳۲	جدول ۳-۴- میانگین و انحراف معیار تعداد بروز ورم پستان و تعداد بروز ورم پستان بالینی به ازای هر دوره شیرواری

فصل اوّل

مقدمه

صنعت پرورش گاو شیری همسو با شرایط روز افزون جمعیت بشری و افزایش تقاضای فرآورده های غذایی با منشاء دامی به سوی استفاده از تکنولوژی، پیشرفت انتخاب ژنی و بهبود شرایط مدیریتی جهت افزایش شیرواری دام ها حرکت کرده است. با این حال، این صنعت هنوز با مشکلات فراوانی روبه رو است که در خطّ

مقدم آنها ورم پستان به عنوان یک بیماری پر هزینه قرار می گیرد. وجود عوامل متعددی چون چند چهره بودن، پیچیده بوده بودن مجموعه های مرتبط با پیشگیری و درمان، هزینه های سنگین ناشی از کاهش تولید، درمان و حتی حذف گاو ها از دلایلی است که این بیماری همواره نگرانی اول صنعت پرورش دام شیری بوده است.

پیشرفت های تکنولوژیکی جدید در موضوع ایمونولوژی منجر به مطالعات و تحقیقات جدی تری ایمنی غده پستانی و بیماری زایی آن شده است. تحقیقات در دو دهه اخیر پیشرفت های قابل توجهی در چگونگی عملکرد سیستم ایمنی غده پستانی گاو را آشکار کرده اند [۱۷، ۱۱۴ و ۱۲۳].

از سال ۱۹۸۰ تشخیص و بررسی چگونگی عملکرد وظایف اختصاصی جمعیت لوکوسیت های غده پستانی گاو کانون توجه قرار گرفت. تفاوت در تحت جمعیت های لوکوسیتی با جریان سیتومتری (flow cytometry) و به کار گیری آنتی بادی های مونوکلونال توسعه یافته در تشخیص مولوکولهای سطحی اختصاصی، به سهولت تشخیص داده می شود. از سال ۱۹۹۰ این تحقیقات به سوی مطالعه سیتوکین های گاو و نقش بالقوه آن ها در پاتوفیزیولوژی ورم پستان و کنترل آن توسعه یافتند.

قابلیت استفاده از ژن سیتوکین و توالی پروتئینی منجر به توسعه چندین استراتژی تشخیص از قبیل آزمایش های مونوکلونال آنتی بادی، واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)، تعیین پروتئین با سنجش های بیولوژی (protein quantification with bioassays) و الایزا شد. علاوه بر این سیتوکین های نو ترکیب برای کشف نقش تنظیم کنندگی ایمنی و استفاده درمانی آنها در کنترل بیماری تولید شدند. هر چقدر میزان سیتوکین های بیشتری شناخته می شدند منجر به کاوش های تازه تری در واکنش های ایمنی و کنترل بیماری ها می

گردید و هر چقدر که تلاش جهت کشف رمز واکنش های غده پستانی به مقاومت در برابر بیماری یا موارد مشکوک انجام شود پیشرفت های بزرگتری در زمینه انتخاب ژنتیکی می تواند حاصل شود [۶۲ و ۱۱۶]. کاملاً روشن است که ایمونوبیولوژی غده پستانی خیلی سریع یک زمینه گسترده در علم دامپزشکی خواهد شد. درک بهتر از چگونگی تغییر مکانیسم های دفاعی غده پستانی در طول یک دوره بحرانی از یک سیکل شیرواری می تواند باعث بهبود پیشرفت و تلاش مداوم برای کاهش شیوع ورم پستان در گاو شیری شود. تفاوت در پاسخ های التهابی و ایمنی در پاسخ دادن به پاتوژن های مختلف، تا حدودی وابسته به تفاوت های موجود در توالی DNA در ژن های مرتبط با ایمنی است [۱۰۶ و ۱۰].

مطالعات متعددی ارتباط آماری و کارکردی بین بیماری های التهابی مثل ورم پستان و پلی مورفیسم ها را در ژن های مرتبط با ایمنی اثبات کرده اند [۵۸، ۱۰۵ و ۱۳۲]. در بین گاو ها از نظر حساسیت به ورم پستان تفاوت های ژنتیکی وجود دارد. با توجه به اهمیت اینترلوکین ۸ در پاسخ های ایمنی، این اینترلوکین و رسپتور های مربوط به آن می توانند در انتخاب گاو هایی با مقاوت ژنی بالاتر نسبت به این بیماری دارای نقش تعیین کننده ای باشند.

نقش برجسته اینترلوکین ۸ در واکنش های التهابی و ایمنی ذاتی قبلاً به اثبات رسیده است و در مطالعات مختلف به نقش این اینترلوکین و رسپتورهای آن در بازدارنگی و درمان ورم پستان های کلینیکی و تحت کلینیکی پرداخته شده است.

CXCR1 و CXCR2 تنها رسپتور های شناخته شده اینترلوکین ۸ می باشند که در پاسخ های ایمنی نقش های متفاوتی ایفا می کنند و همبستگی متفاوتی در باند شدن با اینترلوکین ۸ دارا می باشند [۲، ۵۵ و ۱۲۹]. همچنین در برخی مطالعات به بررسی پلی مورفیسم های مربوط به ژن های کد کننده این دو رسپتور و ارتباط آن با ورم پستان کلینیک و تحت کلینیکی پرداخته شده است [۱۳۲].

با توجه به نقش برجسته اینترلوکین ۸ و رسپتور های آن در ایمنی ذاتی و واکنش های التهابی در مطالعه حاضر سعی شده است تا پس از تعریف ورم پستان و بیان اهمیت آن، طبقه بندی انواع ورم پستان و پاتوژن های مؤثر در آن به بیان ساختار پستان و فاکتور های مؤثر در ایمنی غده پستانی پرداخته شود و در ادامه به بررسی کموکاین ها و رسپتورهای آنها و به ویژه رسپتورهای مربوط به اینترلوکین ۸ پرداخته شده است و در نهایت پلی مورفیسم ژن کد کننده CXCR1 و ارتباط آن با استعداد ابتلای گاو های هولشتاین به ورم پستان مورد بررسی و بحث قرار گرفته است.

امید است که به کمک مطالعه حاضر و مطالعات مشابه دریچه جدیدی در علم دامپزشکی برای کمک به گزینش گاو هایی با مقاومت بالاتر نسبت به ورم پستان به عنوان پرهزینه ترین بیماری صنعت شیر و ساخت داروهای مؤثرتر در درمان این بیماری باز شود.

فصل دوّم

کلیات

۲-۱- ورم پستان

واژه Mastitis از لغت یونانی -masto که به غده پستانی بر می گردد و -itis که معنی التهاب می دهد مشتق شده است [۱۲]. ورم پستان پاسخ التهابی غده پستانی و یک بیماری پیچیده است که فاکتورهای زیادی در ایجاد آن دخالت دارند. این بیماری به طور عمده به وسیله میکروارگانیزم هایی که به کانال تیت و غده پستانی وارد می شوند، اتفاق می افتد [۸۵].

علاوه بر این می توان بصورت تکنیکی از واژه ورم پستان برای توصیف آسیب پستان که می تواند منجر به التهاب شود استفاده کرد ولی عوامل عمده ای که سبب واکنش التهابی می شوند میکروارگانیزم هایی هستند که توانسته اند به کانال تیت و بافت پستانی وارد شوند [۸۵].

ورم پستان پرهزینه ترین بیماری صنعت شیر است [۸۴]. برآورد هزینه شامل کاهش محصول به خاطر کاهش تولید و دور ریختن شیر و هزینه های پیشگیری و درمان می گردد [۳۳].

نشانه های کلینیکی این بیماری التهاب و آماس تیت ها و پستان ها می باشد و در موارد شدید ممکن است آماس شدید همراه با تب و کاهش اشتها مشاهده شود. ورم پستان تحت کلینیکی مقدم بر ورم پستان کلینیکی است و نشانه قابل مشاهده ای ندارد و تنها با مونیتورینگ منظم و تست های آزمایشگاهی تشخیص داده می شود [۳۳].

عوامل اتیولوژی اصلی که باعث عفونت ورم پستان می شوند بر اساس منبعی که ارگانیزم به آن تعلق دارد به ۲ گروه تقسیم می شوند. ارگانیزم های واگیردار بر روی پستان و سطح تیت وجود دارند و منبع اصلی عفونت بین کارتیه ها می باشند. این عوامل شامل *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus agalactiae*، *Corynebacterium bovis* و *Mycoplasma bovis* می باشند.

پاتوژن های محیطی در محیط مجاور گاو وجود دارند و شامل *Streptococcus dysgalactiae*، *Streptococcus uberis*، *Streptococcus bovis*، *Enterococcus faecium*، *Enterococcus faecalis* و کولی فرم هایی مثل *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumonia* و *Enterobacter aerogenes* می باشند [۱۳] و [۸۹].

به طور معمول علت بروز بالای ورم پستان ها میکروارگانیزم های محیطی می باشند. نتیجه استراتژی های درمانی که برای کنترل عفونت های پستانی به کار می رود به شیفت نسبت باکتری های جدا شده بستگی داشته است. بهبود مدیریت فارم، ضد عفونی کردن تیت قبل و بعد از شیردوشی، درمان فوری ورم پستان های کلینیکی، جمع آوری کردن گاو هایی که بصورت مزمن عفونی شده اند و درمان آنتی بیوتیکی در دوره خشکی گاو ها موجب کاهش چشمگیری در تعداد عفونت های *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus agalactiae* در پنجاه سال گذشته شده است [۱۴ و ۱۵].

با این حال یک افزایش در پاتوژن های محیطی مثل *Escherichia coli*، *Enterobacteriaceae* و استافیلوکوکوسی های کوآگولاز منفی ثبت شده است [۱۵ و ۹۲].

۲-۱-۱- طبقه بندی انواع ورم پستان

میزان عفونت بسته به تکثیر و تزايد میکرو ارگانیزم ها در بافت پستانی، نوع ورم پستانی که در پستان گاو اتفاق افتاده را مشخص می کند. ورم پستان کلینیکی وقتی اتفاق می افتد که نشانه قابل مشاهده ای در پستان گاو یا تیت وجود داشته باشد.

مورد کلینیکی می تواند به شکل تحت حاد باشد وقتی که علائم خیلی خفیف باشند و ممکن است تنها با تورم ناچیز پستان و حضور لخته هایی در شیر همراه باشد.

در موارد حاد و فوق حاد آغاز علائمی مثل التهاب شدید تیت ها، تب، از دست دادن اشتها، دهیدارسیون و حتی مرگ بصورت ناگهانی است.

اگر ورم پستان درمان نشود عاقبت می تواند منجر به ورم پستان مزمن شود. در موارد ورم پستان مزمن، گاو دائماً ورم پستانی را که بین ورم پستان کلینیکی حاد و تحت حاد نوسان می کند را تحمل می کند و ممکن است یک تغییر دائمی در بافت پستان با حضور اسکار و تغییر در شکل و اندازه بافت غده ای اتفاق افتد [۳۳ و ۸۵].

ورم پستان تحت کلینیکی مقدم بر ورم پستان کلینیکی است و تشخیص آن بسیار مشکل تر است به دلیل اینکه نشانه ای از عفونت قابل مشاهده نیست. اغلب گله های شیری گاو هایی با ورم پستان تحت کلینیکی دارند. تنها راه تشخیص حضور میکروارگانیزم های عفونی که کانال تیت و بافت پستان را مورد تهاجم قرار داده اند مونیاتور کردن پاسخ های التهابی گاو ها، به عنوان مثال تعیین میزان سلول های سوماتیک (لوکوسیت ها و سلول های اپیتلیال جدا شده) در شیر است [۳۳ و ۸۵].

ورم پستان تحت کلینیکی بسیار نگران کننده تر از ورم پستان کلینیکی است و تشخیص زودهنگام آن بدون مونیاتورینگ منظم ممکن نیست. گاو های مبتلا به نوع ورم پستان تحت کلینیکی آماده دریافت مداوم پاتوژن هایی هستند که ممکن است منجر به عفونت شدید پستان و انتشار آنها به سایر گاو ها گردند [۸۵].

۲-۱-۲- پاتوژن های عامل ورم پستان

با توجه به منبعی که ارگانیزم ها به آن تعلق دارند، عوامل اتیولوژی مسئول عفونت های ورم پستان را می توان به گروه های متفاوتی از ارگانیزم ها تقسیم کرد. این موارد شامل باکتری های واگیردار، باکتری های محیطی، باکتری های فرصت طلب و دیگر ارگانیزم هایی که خیلی کمتر باعث ورم پستان می گردند، می شود [۸۵].

۲-۱-۲-۱- ارگانیزم های واگیردار

میکروارگانیزم های واگیردار معمولاً بر روی پستان و سطح تیت گاو های آلوده یافت می شوند و معمولاً منبع اصلی عفونت بین کارتیه های پستان های غیر عفونی و عفونی در زمان شیردوشی می باشند. ارگانیزم هایی که در این مجموعه قرار می گیرند عبارتند از *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus agalactiae* و عواملی که معمولاً کمتر منبع عفونت می شوند که عبارتند از: *Mycoplasma bovis* [۸۵ و ۸۹] و *Corynebacterium bovis*.

۲-۲-۱-۲- ارگانیزم های محیطی

پاتوژن های محیطی در محیط مجاور گاو مثل خاک اره و بستر جایگاه نگهداری گاو، کود گاو ها و خاک یافت می شوند. باکتری هایی که در این دسته قرار می گیرند شامل سایر استرپتوکوک ها به غیر از *Streptococcus agalactiae* مثل *Streptococcus dysgalactiae*، *Streptococcus uberis*، *Streptococcus*، *Enterococcus faecium*، *Enterococcus faecalis* و کولی فرم هایی مثل *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumonia* و *Enterobacter aerogenes* می باشند [۱۳ و ۸۹]. ارگانیزم های محیطی که باعث ورم پستان می شوند اصولاً بصورت فرصت طلب در محیط وجود دارند و اگر سیستم ایمنی میزبان به خطر افتاده باشد یا اصول بهداشتی به درستی رعایت نشود باعث ورم پستان می گردند [۱۰۲].

۲-۲-۱-۳- ارگانیزم های فرصت طلب

ارگانیزم های فرصت طلب شامل استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی است و باعث یک ورم پستان خفیف می شوند. تست کوآگولاز همبستگی بالایی با پاتوژنیسیته دارد و گونه های کوآگولاز منفی بطور عمده غیر پاتوژن هستند [۸۹].

این استافیلوکوکوسی ها همزیست هستند و ممکن است از شیر جدا شوند ولی اندک پاسخ ایمنی با آنها مقابله می کند و موارد عفونی اندک هستند و عبارتند از: *Staphylococcus epidermidis*، *Staphylococcus saprophyticus* [۲۸ و ۸۹]، *Staphylococcus chromogenes* [۲۴] و *Staphylococcus simulans* [۲۸].

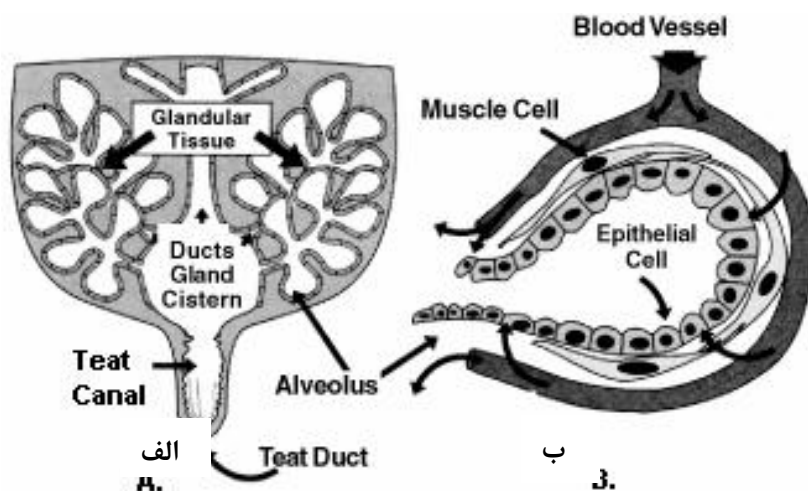
۲-۲-۱-۴- ارگانیزم های دیگر

بسیاری از باکتری های دیگر می توانند باعث ورم پستان شدید شوند که اغلب تک گیر (sporadic) می باشند و تنها در یک یا تعداد کمی از گاو های گله اتفاق می افتد اینها عبارتند از: *Nocardia asteroides*.

•*Pasteurella multocida*، •*Histophilus somni*، •*Nocardia farcinica* و •*Nocardia brasiliensis*،
 •*Bacillus cereus*، •*Campylobacter jejuni*، •*Mannheimia haemolytica*،
 شامل: •*Proteus spp.*، •*Enterococcus faecium*، •*Enterococcus faecalis*، •*Citrobacter spp.*،
 •*Serratia spp.* و •*Pseudomonas aeruginosa*
 باکتری های بی هوازی که از موارد ورم پستان جدا شده اند، اغلب در ارتباط (همراه) با دیگر باکتری های بی
 هوازی اختیاری بوده اند مثل: •*Peptostreptococcus indolicus*، •*Preootella melaninogenica*،
 •*Fusobacterium necrophorum* و •*Clostridium sporogenes*، •*Eubacterium combesii*
 عفونت های قارچی، عفونت های مخمری، لپتوزپیراها و برخی از ویروس ها هم می توانند باعث ورم پستان
 در گاو شوند ولی دارای اهمیت بسیار کمی می باشند [۹۰].
 این ارگانیزم ها کمتر رایج اند و اگر شرایط محیطی به گونه ای تغییر کند که ظهور این ارگانیزم ها افزایش
 یابد روی می دهند.

۲-۲- ساختار پستان

شکل ۱-۲ نمای شماتیک از یک کارتیج پستان را نشان می دهد [۱۳]. هر کارتیج از بافت تولید کننده شیر
 یا آلوئول هایی که به مجرای Lactiferous هدایت می شوند، سینوس پستانی (gland cistern)، کانال تیت و
 در نهایت دهانه یا مجرا تشکیل شده است. آلوئول با سلولهای اپیتلیالی که در طی دوره آبستنی تخصص یافته
 شده اند، قبل و بعد از گوساله زایی پوشیده شده است. این سلولهای تخصص یافته آغوز و ترشحات شیری و
 در نهایت شیر تولید می کنند. بافت همبند و سلول های عضلانی موجب حمایت از غدد آلوئول، انقباض و
 دوشیده شدن شیر از آلوئول در طی شیردوشی می شوند [۳۳ و ۸۵].



شکل ۱-۲: نمای شماتیک غده پستانی گاو (الف) و جزئیات ساختار هر کیسه آلوئول (ب)

۲-۳- مکانیسم های دفاع پستان

غده پستانی توسط مکانیسم های دفاعی متنوعی محافظت می شود که به دو شاخه کلی تقسیم می شوند:

الف) ایمنی ذاتی (مادرزادی)

ب) ایمنی اختصاصی

ایمنی ذاتی به عنوان پاسخ ایمنی غیر اختصاصی شناخته می شود و در طول مراحل اولیه عفونت دفاع غالب از این نوع می باشد. پاسخ های غیر اختصاصی یا در محل عفونت وجود دارند یا بسیار سریع توسط تعداد زیادی محرک در محل عفونت فعال می شوند. به هر حال این نوع ایمنی توسط تکرار عفونت به همان شکل قبلی تقویت نمی شود.

پاسخ ذاتی یا غیر اختصاصی غده پستانی به عنوان یک سد فیزیکی عمل می کند و شامل انتهای تیت، ماکروفاژ، نوتروفیل، سلول کشنده طبیعی (NK) و یک سری فاکتورهای محلول می باشد.

برعکس، ایمنی اکتسابی یا اختصاصی پایانه های اختصاصی پاتوژن ها را تشخیص می دهد و حذف انتخابی را فعال می کند. تشخیص فاکتورهای پاتوژنیک توسط مولکول های آنتی بادی، ماکروفاژ و چندین جمعیت لنفوسیتی انجام می شود. به دلیل وجود حافظه در لنفوسیت های خاطره پاسخ اختصاصی توسط تکرار برخورد با پاتوژن تقویت می شود. محافظت مطلوب غده پستانی بر علیه عفونت داخل پستانی جدید نیازمند فاکتورهای محافظتی از هر دو نوع ایمنی ذاتی و اکتسابی و عملکرد متقابل این دو نوع ایمنی به یک روش کاملاً هماهنگ می باشد.

جنبه های بسیار گوناگون دفاع پستانی گاو در طول دوره های متفاوت سیکل شیرواری به ویژه حوالی دوره انتقال مورد بررسی قرار گرفته است و ۲ دوره زمانی دو هفته قبل از زایش و تا انتهای اولین سه هفته شیرواری به عنوان دوره هایی که مکانیسم دفاعی میزبان شدیداً دچار تغییر می شود، دارای اهمیت تشخیص داده شده اند [۱۱۳ و ۱۱۴]. در نتیجه گاو شیری در طول دوره پیش از زایش به ورم پستان حساستر می باشد.

۲-۳-۱- دفاع آناتومیکی

ورم پستان زمانی رخ می دهد که باکتری قادر باشد از طریق کانال تیت وارد غده پستانی شود. بنابراین انتهای تیت اولین خط دفاعی در برابر تهاجم پاتوژن ها مطرح می شود.

تیت دارای اسفنگتر عضلانی بوده که دهانه تیت را در فواصل بین دوشش بسته نگه می دارد و مانع نفوذ باکتری می شود [۱۳۳]. همچنین کانال تیت با کراتین که یک ماده واکسی است و از سلولهای اپیتلیال سنگفرشی مطبق ترشح می شود و به عنوان یک ماده آنتی باکتریال عمل می کند، پوشیده شده است.

انباشته شدن کراتین می تواند یک انسداد فیزیکی در برابر مهاجرت باکتری ها به سینوس پستانی ایجاد کرده و در طول دوره غیر شیرواری به طور کامل مجرا را مسدود کند [۷۸].

با نزدیک شدن زایمان تجمع قابل توجهی مایع در غده پستانی گاو رخ می دهد که منجر به افزایش فشار داخل پستانی می شود. غده پستانی در این زمان به ورم پستان حساس می شود و این تجمع به صورت جزئی منجر به گشاد شدن کانال تیت و نشت ترشحات غده پستانی می شود [۷۸ و ۷۹].