



شماره پایان نامه: ۲۲۷

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری حرفه‌ای رشته دامپزشکی

بررسی پلی مورفیسم ژن کد کننده 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:

عباس پناهنده

مهر ماه ۱۳۸۹

اللَّهُمَّ صَلِّ وَسَلِّمْ وَبَارِكْ عَلَى سَيِّدِنَا مُحَمَّدٍ



پایان نامه دکتری حرفه‌ای رشته دامپزشکی

بررسی پلی مورفیسم ژن کد کننده 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:

عباس پناهنده

مهر ماه ۱۳۸۹



دانشگاه شاهرود

گروه علوم پایه

پایان نامه آقای عباس پناهنده جهت اخذ درجه دکتری رشته دامپزشکی با عنوان: بررسی پلی مورفیسم ژن کد کننده 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 احمد رضا محمدنیا با مرتبه علمی دانشیار امضاء

۴. استاد داور داخلی گروه دکتر امین صادق بیغم با مرتبه علمی استادیار امضاء

۵. استاد داور خارجی گروه دکتر محمد رضا محزونیه 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 شهرکرد است.

با سپاس فراوان از اساتید ارجمندم جناب آقای دکتر همایون رضا شهبازکیا و دکتر ناصر شمس اسفند آبادی که در تمامی مراحل انجام این پایان نامه در کنار من بودند و بدون یاری ایشان، انجام این کار میسر نبود.

با تشکر از استاد گرامی جناب آقای دکتر احمد رضا محمدنیا، که من را در پشت سر گذاردن مشکلات یاری فرمودند.

با قدردانی از اساتید گرانقدرم آقای دکتر امین صادق بیغم و آقای دکتر محمد رضا محزونیه که داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند.

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

با قدردانی و سپاس از :

پدر خوبم و مادر مهربانم

همراهان همیشگی ام که مرا درس بردباری و استواری دادند.

برادران عزیزم و خواهران گلم،

امیدوارم همیشه در مراحل زندگی خود سلامت و پیروز باشید.

چکیده

اینترلوکین ۸ به عنوان یکی از اعضای کموکاین های خانواده CXC ELR+ نقش مهمی در القای مهاجرت نوترفیل ها و همچنین سایر عملکرد های مربوط به آن نظیر تقویت فاگوسیتوز، واکنش تولید گونه های اکسیژن و همچنین تنظیم حیات سلولی دارا می باشد. در این مطالعه برای بررسی پلی مورفیسم ژن کد کننده اینتر لوکین ۸ 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 به دست آمد. DNA از خون با استفاده از روش salting out استخراج شد و با استفاده از پرایمر های طراحی شده، ژن کد کننده اینترلوکین ۸ از طریق PCR تکثیر شد. محصول PCR پس از تأیید توسط الکتروفورز تعیین توالی شد. نتایج بیانگر وجود یک جهش A به G در ناحیه ۲۶۴۷ از ژن اینترلوکین ۸ و در ناحیه اگزون ۴ می باشد. نتایج حاصل از بررسی آماری نشان دادند که میانگین بروز ورم پستان بالینی در هر دوره شیرواری در گاو هایی که ژنوتیپ AA را داشتند به طور معنی داری ($p=0.01$) کمتر از گاو هایی بوده است که دارای ژنوتیپ GG از ژن مور نظر بوده اند. ناحیه ۲۶۴۷ از ژن اینترلوکین ۸ در دایمیرزاسیون اینتر لوکین ۸ نقش دارد. مشخص شده است که این اینترلوکین در فرم دایمر خود با قدرت بیشتری رسپتورها را تحریک می کند و سیگنال درون سلولی قوی تر و پاسخ بیشتری نسبت به فرم مونومر ایجاد می کند. اثر قابل توجه و معنی دار جهش مذکور بر بروز ورم پستان بالینی قابلیت استفاده از ژن کد کننده اینترلوکین ۸ را به منظور اصلاح نژاد مولکولی در جهت ایجاد مقاومت ذاتی به ورم پستان بالینی در گاو شیری را به اثبات می رساند و باز کننده راهی به منظور کاهش زیان های اقتصادی حاصل از این بیماری خواهد بود.

کلمات کلیدی: ورم پستان، اینترلوکین ۸، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۵	فصل اوّل: مقدمه
۷	فصل دوّم: کلیات
۳۱	۲-۷-۲- نامگذاری کموکاین ها
۳۴	۲-۷-۳- اینترلوکین ۸
۷	۲-۱- ورم پستان
۸	۲-۱-۱- اهمیت اقتصادی ورم پستان
۹	۲-۱-۲- طبقه بندی انواع ورم پستان
۱۰	۲-۱-۳- پاتوژن های عامل ورم پستان
۱۰	۲-۱-۳-۱- ارگانیسم های واگیردار
۱۰	۲-۱-۳-۲- ارگانیسم های محیطی
۱۰	۲-۱-۳-۳- ارگانیسم های فرصت طلب
۱۱	۲-۱-۳-۴- ارگانیسم های دیگر
۱۱	۲-۲- اتیولوژی ورم پستان های معاصر
۱۲	۲-۳- ساختار پستان
۱۳	۲-۴- تهاجم، عفونت و پاسخ ایمنی غده پستانی
۱۶	۲-۵- فاکتورهای مؤثر در ایمنی غدد و حساسیت ورم پستان
۱۶	۲-۵-۱- حساسیت به ورم پستان
۱۶	۲-۵-۲- مکانیسم های دفاع پستان
۱۷	۲-۵-۲-۱- دفاع های آناتومیکی
۱۷	۲-۵-۲-۲- دفاع سلولی
۲۰	۲-۵-۲-۳- دفاع محلول
۲۷	۲-۶- تشخیص ورم پستان
۲۸	۲-۷- کموکاین ها
۳۰	۲-۷-۱- ساختار کموکاین
۳۸	فصل سوّم: مواد و روش کار
۳۸	۳-۱- انتخاب دام، نمونه گیری خون و شیر
۳۸	۳-۲- روش استخراج DNA از خون
۳۹	۳-۳- آنالیز

۳۹	۳-۴- انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)
۴۰	۳-۵- الکتروفورز و بررسی وجود محصول
۴۲	۳-۶- توالی یابی
۴۲	۳-۷- آنالیز آماری
۴۳	فصل چهارم: نتایج
۵۰	فصل پنجم: بحث
۵۳	منابع:

فهرست شکل ها

صفحه	عنوان
۱۲	شکل ۱-۲: نمای شماتیک غده پستانی گاو و جزئیات ساختار هر کیسه آلوئول
۲۵	شکل ۲-۲: خلاصه مهمترین مکانیسم هایی که توسط $TNF-\alpha$ ، $IL-1\beta$ و $IL-6$ در طی پاسخ ایمنی به عفونت میکروبی غده پستانی القاء می شود.
۲۶	شکل ۳-۲: اثر سایتوکاین ها بر فاکتورهای ایمنی سلولی و محلول
۳۱	شکل ۴-۲: شکل مونومر و دایمر اینترلوکین ۸
۳۲	شکل ۵-۲: ساختار کموکاین ها
۳۵	شکل ۶-۲: دیاگرام نواری مولکول اینترلوکین ۸ انسانی
۴۸	نمودار ۱-۴: یک ناحیه جهش هموزیگوت A به G
۴۸	نمودار ۲-۴: یک ناحیه جهش هتروزیگوت A به G
۴۹	نمودار ۳-۴: ژنوتیپ های مختلف اینترلوکین ۸ و میانگین بروز ورم پستان بالینی به ازای هر دوره شیرواری

فهرست جدول ها

صفحه	عنوان
۱۵	جدول ۱-۲- خصوصیات پاتوژن های رایج عامل ورم پستان از نظر تهاجم و عفونت
۲۳	جدول ۲-۲- سایتوکاین های در ارتباط با پاسخ ایمنی در غده پستانی عفونی با <i>Staphylococcus aureus</i> و یا <i>Escherichia coli</i>
۲۷	جدول ۳-۲- پاسخ ایمنی غده پستانی گاو به باکتری های متفاوت
۳۲	جدول ۴-۲- نامگذاری سیستماتیک کموکاین های شناخته شده، نام های رایج آنها در انسان و موش و نوع آنها
۴۰	جدول ۱-۳- حجم ها و غلظت های مورد استفاده برای انجام PCR برای یک نمونه
۴۰	جدول ۲-۳- سیکل ها و دماهای اعمال شده در آزمایش
۴۸	جدول ۱-۴- فراوانی آلل های شناسایی شده در ژن اینترلوکین ۸ در جمعیت مورد مطالعه
۴۸	جدول ۲-۴- فراوانی ژنوتیپ های شناسایی شده در ژن اینترلوکین ۸ در جمعیت مورد مطالعه
۴۹	جدول ۳-۴- میانگین و انحراف معیار تعداد بروز ورم پستان و تعداد بروز ورم پستان بالینی به ازای هر دوره شیرواری
۵۱	جدول ۱-۵- فراوانی ژنوتیپ های شناسایی شده در ژن اینترلوکین
۵۱	جدول ۲-۵- فراوانی ژنوتیپ های شناسایی شده در ژن اینترلوکین

فصل اول

مقدمه

نیاز روز افزون به ارتقاء کیفیت و کمیت محصولات غذایی با منشاء دامی از یک سو و توجه به اهمیت شیر و فرآورده های آن در تغذیه جوامع بشری از سوی دیگر باعث گسترش دامپروری صنعتی و مراکز اصلاح نژاد در کشور های توسعه یافته و در حال توسعه شده است که در آینده نیز ادامه پیدا خواهد کرد. در ۵۰ سال گذشته روند به نژادی حیوانات عمدتاً به صورت انتخاب دام های والد بر اساس شاخص های فنوتیپی و به کارگیری تلقیح مصنوعی بوده است. در سال های اخیر با پیشرفت تکنیک های مختلف آنالیز ژنتیکی و توسعه علمی مانند ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، امکان انجام دستکاری های ژنتیکی در حیوانات، شناسایی نشانگر های ژنتیکی (Genetic markers) و لوکوس های ژنی کنترل کننده صفات مختلف مانند: مقدار تولید، کیفیت تولید، استعداد ابتلا به بیماری های خاص و ... شدیداً مورد توجه قرار گرفته است. پلی مورفیسم ژن های کد کننده واسطه های ایمنی مانند: اینترلوکین ۸ در حال حاضر مورد مطالعه قرار گرفته و ارتباط آن با بروز ورم پستان بالینی به اثبات رسیده است. با شناسایی مهمترین این لوکوس ها، پیش بینی پتانسیل تولید یک دام و تعیین استعداد ابتلای آن به بیماری های مهم، دور از ذهن نخواهد بود.

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

- ایمنی ذاتی (مادرزادی)
- ایمنی اختصاصی

ورم پستان به عنوان التهاب غده پستانی تعریف شده است. معمولاً به طور اولیه ورم پستان در پاسخ به عفونت باکتریایی داخل پستان رخ می دهد اما همچنین به دنبال عفونت با مایکوپلاسما های داخل پستانی و قارچ هم رخ می دهد. آسیب های مکانیکی، آسیب های دمایی و شیمیایی غده پستانی را مستعد به عفونت داخل پستانی می کنند.

اهمیت اقتصادی ورم پستان در سالهای اخیر مورد بررسی قرار گرفته و ثبت شده است. در تمام این موارد ورم پستان از لحاظ اقتصادی مهم ترین بیماری صنعت شیر، به ویژه در کشور های توسعه یافته بوده است [۹۱].

ورم پستان شایع ترین بیماری عفونی پر هزینه در صنعت گاو شیری می باشد. ورم پستان تحت بالینی شایع ترین فرم ورم پستان در گله های صنعتی می باشد و بیش از ۲۵ تا ۵۰٪ گاو های گله مبتلا در گیر آن هستند [۹۴ و ۱۳۹]. برآورد هزینه ورم پستان تحت بالینی مشکل است اما اغلب متخصصین قبول دارند که به طور متوسط هزینه های ورم پستان تحت بالینی بیشتر از ورم پستان بالینی است. برآورد هزینه شامل کاهش محصول به خاطر کاهش تولید، دور ریختن شیر و هزینه های پیشگیری و درمان می باشد [۳۹].

از سال ۱۹۸۰ تشخیص و 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 مولکول های 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 آزمایش های بیولوژی (protein quantification with bioassays) و الیزا شد. علاوه بر این سیتوکین های نو ترکیب برای کشف نقش تعدیل کنندگی ایمنی (immunomodulatory) و استفاده درمانی آنها در کنترل بیماری تولید شدند. 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 [۶۹ و ۱۲۹].

هنگامی که اولین رویارویی با آنتی ژن رخ می دهد، ماکروفاژ ها اولین سلولهایی هستند که عامل بیگانه را فاگوسیت کرده و بر اساس پروسه التهابی یک سری کموکاین برای جذب کردن دیگر سلول های ایمنی به محل التهاب آزاد می کنند. کموکاین ها خانواده ای از پروتئین های کوچک (۸-۱۰ kDa) هستند که دارای یک نقش مشترک در تنظیم مهاجرت گلبول های سفید به بافت های نرمال و ملتهب می باشند. اینترلوکین ۸ یکی از این کموکاین ها می باشد که به عنوان فاکتور جاذب شیمیایی نوتروفیل شناخته می شود. اینترلوکین ۸ توسط مونوسیت ها، سلول های T، نوتروفیل و سلول های NK، سلول های اندوتلیال، فیبروبلاست و اپیتلیال تولید می شود [۷۷].

هدف اصلی این مطالعه شناسایی جهش های ژنتیکی و انواع ژنوتیپ های ژن اینترلوکین ۸ در گاو های هولشتاین ایران بوده است. میزان بیان ژن اینترلوکین ۸ در سلول های اپیتلیال پستان گاو های شیروار در اثر مواجهه با عوامل عفونی افزایش می یابد که نشان دهنده نقش این کموکاین در مقابله با عوامل عفونی مهاجم به پستان است. اینترلوکین ۸ باعث جذب و فعال سازی نوتروفیل ها به محل هجوم باکتری ها می شود و به این ترتیب در مراحل اولیه ایجاد پاسخ ایمنی علیه عوامل مهاجم نقش قابل توجهی دارد. بنابراین هر نوع تغییر ژنتیکی در ژن کد کننده اینترلوکین ۸ که میزان بیان، ساختمان و عملکرد آن را تحت تاثیر قرار دهد، می تواند در میزان استعداد به ورم پستان اثر داشته باشد. اثر قابل توجه و معنی دار جهش یافت شده بر بروز ورم پستان بالینی، قابلیت استفاده از ژن اینترلوکین ۸ 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.

فصل دوم

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 [۱۳]. ورم پستان پاسخ التهابی غده پستانی و یک بیماری کمپلکس می باشد که فاکتور های 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 [۹۲].

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 به صورت عمده عواملی که سبب واکنش التهابی می شوند میکروارگانیزم هایی هستند که توانسته اند به کانال تیت و بافت پستانی وارد شوند [۹۲].

ورم پستان پرهزینه ترین بیماری صنعت شیر است [۹۱]. برآورد هزینه شامل کاهش محصول به خاطر کاهش تولید و دور ریختن شیر و هزینه های پیشگیری و درمان می گردد [۳۹].

نشانه های کلینیکی این بیماری التهاب و آماس تیت ها و پستان 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 [۳۹].

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*، *Mycoplasma bovis* و *Corynebacterium 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 [۱۷] و [۹۷].

به طور معمول علت بروز بالای عفونت پستان میکروارگانیزم های محیطی می باشند. نتیجه استراتژی های درمانی که برای کنترل عفونت های پستانی به کار می رود به تناسب نسبت باکتری های جدا شده بستگی دارد. 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 موجب کاهش چشمگیری در تعداد عفونت های *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus agalactiae* در پنجاه سال گذشته شده است [۱۸ و ۱۹].

با این حال یک افزایش در پاتوژن های محیطی مثل *Escherichia coli*، *Enterobacteriaceae* و استافیلوکوکوسی های کوآگولاز منفی ثبت شده است [۱۹ و ۱۰۰].

۲-۱-۱- اهمیت اقتصادی ورم پستان

اهمیت اقتصادی ورم پستان در سالهای اخیر مورد بررسی قرار گرفته و ثبت شده است. در تمام این موارد ورم پستان از لحاظ اقتصادی مهم ترین بیماری صنعت شیر، به ویژه در کشور های توسعه یافته بوده است [۹۱]. دامداران اغلب تنها زمانی متوجه خسارت متحمل شده می شوند که دچار یک خسارت آشکار به دلیل موارد کلینیکی ورم پستان گردند. در حالی که ممکن است ورم پستان تحت کلینیکی وجود داشته باشد و بدون آنکه دامدار متوجه آن شود منجر به کاهش تولید و کیفیت شیر شود.

در سال ۱۹۹۳ گله هایی به مدت ۱۲ ماه مونیتور شدند و یک محدوده خسارت از ۱۶۱ دلار تا ۳۴۴ دلار به ازای هر گاو شیری در سال دیده شد. از این رو میانگین خسارت سالیانه حدود ۲ میلیارد دلار برآورد شد [۷۵]. Schroeder در سال ۱۹۹۷ خسارت مشابهی را به واسطه این بیماری ارائه داد (۱۸۵ دلار به ازای هر گاو و خسارت سالیانه به میزان ۱/۸ میلیارد دلار) [۱۷].

دلایل خسارات مستقیم و غیر مستقیم عفونت ورم پستان که توسط Petrovski و همکارانش در سال ۲۰۰۶ مورد بازنگری قرار گرفتند، بصورت خلاصه عبارتند از: خسارات مستقیم شامل هزینه های درمانی (هزینه های دامپزشک و دارو)، شیری که به دلیل کیفیت پایین یا به دلیل مصرف دارو دور ریخته می شود، هزینه هایی کارگری جهت مراقبت از دام بیمار، تلفات و حذف دام مبتلا.

عفونت مجدد خسارات متحمل شده را افزایش می دهد. خسارات غیر مستقیم که باید مورد توجه دامداران قرار گیرد اغلب ناچیز پنداشته می شود و اگر دامداران متوجه کاهش تدریجی شیر در موارد ورم پستان های تحت کلینیکی نشوند متحمل خسارات جدی می گردند. در پاسخ ایمنی گاو به تهاجم میکروارگانیزم ها، انرژی به سمت پاسخ ایمنی پستان هدایت می شود و کمتر به سمت تولید شیر می رود؛ از سوی دیگر درد و رنج گاو منجر به از دست دادن اشتها و کاهش غذای دریافتی می گردد از این رو انرژی کمتری برای تولید شیر دریافت می شود [۹۱].

همچنین کیفیت و ترکیب شیر هم به دلیل عفونت ورم پستان تحت تأثیر قرار خواهد گرفت. مشتریان شیر اطلاعات خوبی در این زمینه دارند و متقاضی محصولات شیر با استانداردهای بسیار بالا هستند. از سوی دیگر برخی ارگان‌های دولتی برای کسب اطمینان کافی از بدون خطر بودن مواد غذایی برای سلامت مصرف کنندگان با توجه به مسئله باقی مانده دارویی و حضور میکروارگانیسم‌های عفونی، متقاضی سطح خاصی از کیفیت اند [۳۹].

بیان شده است که اگر شمارش تعداد کل باکتری‌ها در شیر افزایش یابد، تعداد میکروارگانیسم‌هایی که توسط پاستوریزاسیون در شیر کشته نمی‌شوند هم افزایش می‌یابد. مونیتورینگ سلول‌های سوماتیک (نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های اپیتلیال) در شیر نسبتی از شمارش تعداد کل باکتری‌ها در شیر (Total bacterial count) می‌دهد. برای مثال شیر پاستوریزه‌ای که از شیر اولیه (خام) ای با ۲۵۰۰۰۰ سلول‌های سوماتیک در هر میلی‌لیتر، زمان مجاز نگهداری در قفسه بیشتری نسبت به شیر خام با تعداد سلول‌های سوماتیک بیش از ۵۰۰۰۰۰ سلول‌های سوماتیک در هر میلی‌لیتر دارد [۹۲].

اگر شیر فروخته شده کیفیت پایینی داشته باشد یا باقی مانده دارویی داشته باشد و یا تعداد سلول‌های سوماتیک بیشتری در هر میلی‌لیتر شیر از میزانی که قبلاً توسط دولت مقرر شده داشته باشد، دامدار جریمه می‌شود [۹۱].

۲-۱-۲- طبقه بندی انواع ورم پستان

میزان عفونت بسته به تکثیر و تزايد میکروارگانیسم‌ها در بافت پستانی، نوع ورم پستانی را مشخص می‌کند. ورم پستان کلینیکی وقتی اتفاق می‌افتد که نشانه قابل مشاهده‌ای در پستان گاو یا تیت وجود داشته باشد. موارد کلینیکی می‌تواند تحت حاد باشد وقتی که علائم خیلی خفیف باشند و ممکن است تنها با تورم ناچیز پستان و حضور لخته‌هایی در شیر همراه باشد. در موارد حاد و فوق حاد آغاز علائمی مثل التهاب شدید تیت‌ها، تب، از دست دادن اشتها، دهیدراسیون و حتی مرگ بصورت ناگهانی است.

اگر ورم پستان درمان نشود عاقبت می‌تواند 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 می‌کند را تحمل می‌کند و ممکن است یک تغییر دائمی در بافت پستان با تشکیل بافت اسکار و تغییر در شکل و اندازه بافت غده‌ای اتفاق افتد [۳۹ و ۹۲].

ورم پستان تحت کلینیکی مقدم بر ورم پستان کلینیکی است و تشخیص آن بسیار مشکل‌تر است به دلیل اینکه نشانه‌ای از عفونت قابل مشاهده نیست. اغلب گله‌های شیری گاو‌هایی با ورم پستان تحت کلینیکی دارند. تنها راه تشخیص حضور میکروارگانیسم‌های عفونی که کانال تیت و بافت پستان را مورد تهاجم قرار داده اند مونیتور کردن پاسخ‌های التهابی گاو‌ها، به عنوان مثال تعیین میزان سلول‌های سوماتیک در شیر است [۳۹ و ۹۲]. ورم پستان تحت کلینیکی بسیار نگران‌کننده‌تر از ورم پستان کلینیکی است و تشخیص زود هنگام آن بدون مونیتورینگ منظم ممکن نیست. گاو‌های با ورم پستان تحت کلینیکی آماده دریافت مداوم پاتوژن‌هایی هستند که ممکن است منجر به عفونت شدید پستان و انتشار آن به سایر گاو‌ها گردند [۹۲].

۲-۱-۳- پاتوژن های عامل ورم پستان

از نظر اتیولوژی با توجه به منبعی که ارگانسیم ها به آن تعلق دارند، عوامل اتیولوژی مسئول عفونت های ورم پستان را می توان به گروه های متفاوتی از ارگانسیم ها تقسیم کرد. این موارد شامل باکتری های واگیردار، باکتری های محیطی، باکتری های فرصت طلب و دیگر ارگانسیم هایی که خیلی کمتر باعث ورم پستان می گردند، می شود [۹۲].

۲-۱-۳-۱-۲- ارگانسیم های واگیردار

میکروارگانسیم های واگیردار معمولاً بر روی پستان و سطح تیت گاو های مبتلا به عفونی یافت می شوند و معمولاً منبع اصلی عفونت بین کارتیه های پستان های غیر عفونی و عفونی در زمان شیردوشی می باشند. میکروارگانسیم هایی که در این مجموعه قرار می گیرند عبارتند از *Staphylococcus aureus* (استافیلوکوکسی کوآگولاز مثبت)، *Streptococcus agalactiae* و عواملی که معمولاً کمتر منبع عفونت می شوند که عبارتند از: *Corynebacterium bovis* و *Mycoplasma bovis* [۹۲ و ۹۷].

۲-۱-۳-۲- ارگانسیم 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 bovis*، *Enterococcus faecium*، *Enterococcus faecalis* و کولی فرم هایی مثل *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumonia* و *Enterobacter aerogenes* می باشند [۱۷ و ۹۷]. ارگانسیم 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 رعایت اصول بهداشتی به درستی انجام نشود باعث ورم پستان می گردند [۱۱۰].

۲-۱-۳-۳- ارگانسیم های فرصت طلب

ارگانسیم های فرصت طلب شامل استافیلوکوکسی 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 [۹۷]. این استافیلوکوکسی 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 شامل *Staphylococcus epidermidis*، *Staphylococcus saprophyticus* [۳۵ و ۹۷]، *Staphylococcus schromogenes* [۲۹] می باشند.

2-1-3-4- ارگانسیم های دیگر

بسیاری از باکتری های دیگر می توانند باعث ورم پستان شدید شوند که اغلب تکی (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*، *Mannheimia haemolytica*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus* و دیگر باکتری های گرم منفی شامل: *Proteus spp.*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter spp.* باکتری های بی هوازی که از موارد ورم پستان جدا شده اند، اغلب در همراه با دیگر باکتری های بی هوازی اختیاری بوده اند مثل: *Peptostreptococcus indolicus*, *Preootella melaninogenica* و *Fusobacterium necrophorum*.

عفونت های قارچی، مخمری، جلبکی، لپتوزپیرا ها و برخی از ویروس ها هم می توانند باعث ورم پستان در گاو شوند ولی دارای اهمیت بسیار کمی می باشند [۹۸].

این ارگانسیم ها کمتر رایج اند و اگر شرایط محیطی به گونه ای تغییر کند که ظهور این ارگانسیم ها افزایش یابد روی می دهند. شرایطی که تحت عنوان ورم پستان تابستانه شناخته می شود اغلب در کشور های اروپایی و در ماه های تابستان، وقتی که رطوبت و شرایط بارانی غالب باشد اتفاق می افتد. مطرح شده است که منبع عفونت معمولاً با افزایش در معرض قرار گرفتن گاو ها با حشراتی در مرتع که گونه های عفونی *Arcanobacterium pyogenes* و *Peptostreptococcus indolicus* را منتقل می کنند اتفاق می افتد و در گاو های غیر شیروار بسیار معمول تر است [۹۷ و ۱۲۰].

2-2- اتیولوژی ورم پستان های معاصر

به طور معمول، ارگانسیم های واگیر دار مسئول بروز بالای موارد ورم پستان کلینیکی و تحت کلینیکی هستند. Bradley در سال ۲۰۰۲ تغییرات عوامل پاتوژن را در مکان های مختلفی از کره جنوبی از سال ۱۹۶۷ مورد بررسی قرار داد، طبق گزارش وی *Staphylococcus aureus* عامل بیشترین ورم پستان کلینیکی در گله های شیری بود. ۳ دهه بعد در سال ۱۹۹۸، بعد از پیاده سازی استراتژی های کنترل بعد از دهه ۶۰، میزان بروز ورم پستان های کلینیکی که عامل آنها پاتوژن های واگیردار بود به صورت چشمگیری کاهش یافت و حدود ۱۰ درصد موارد به حساب می آمد در حالی که *Escherichia coli* و *Enterobacteriaceae* به ترتیب عامل ۳۴/۷ و ۴۰/۹ همه موارد بود [۱۸].

از این رو استراتژی های مناسب کنترل ورم پستان یک نقش کلیدی را در کاهش تعداد موارد ورم پستان های واگیردار ایفا می کند. گرچه به نظر می رسد که نقش پاتوژن های واگیردار کاهش یافته است، ولی در مقابل پاتوژن های محیطی و فرصت طلب نقش بزرگتری در ایجاد عفونت های ماندگار یافته اند [۱۹].

تشخیص صحیح و تفکیک عامل اتیولوژیک عامل التهاب در بافت پستان برای تعیین استراتژی درمانی ضروری است؛ همچنین دانستن تاریخچه ورم پستان در یک گله در یک دوره زمانی و دانستن دوره های زمانی متفاوتی که گاو ممکن است در خطر ایجاد عفونت بالایی به سر برد مهم است. برای مثال گاو ها به طور ویژه ای در طی دوره پیش از زایمان حساس هستند (درست قبل و بعد از زایش) و در dring-off که تغییرات