فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

فصل اول مقدمه ۶

فصل‌دوم‌کلیات ۸

۲-۱- ساختمان غده پستان ۸

۲-۲- ورم‌پستان ۸

۲-۲-۱- تقسیم‌بندی‌ورم‌پستان ۹

۲-۲-۱-۱- ورم پستان بالینی ۹

۲-۲-۱-۲- ورم پستان تحت بالینی ۹

۲-۲-۲- معاینه فیزیکی پستان ۱۰

۲-۲-۳- روش های موجود در تشخیص ورم پستان ۱۰

۲-۲-۳-۱- روش کولز(Coles) ۱۱

۲-۲-۳-۲- روش براملی (Bramley) ۱۲

۲-۲-۳-۳- روش چائوهان(Chauhan) ۱۲

۲-۲-۴- عوامل ایجاد کننده ورم پستان ۱۲

-۲-۴-۲- پاتوژن های غیر اصلی ۱۲

۲-۲-۴-۳- پاتوژن های غیر معمول ۱۳

۲-۲-۵- درمان ورم پستان ۱۳

۲-۲-۵-۱- درمان در دوره شیرواری ۱۴

۲-۲-۵-۲- درمان در دروه خشکی ۱۵

۲-۳- استافیلوکوکوس ۱۵

۲-۳-۱- خصوصیات مرفولوژی و بیوشیمیایی ۱۵

۲-۳-۱-۱- شکل و خصوصیات ظاهری ۱۶

۲-۳-۱-۲- خصوصیات کشت و واکنش های بیوشیمیایی ۱۶

۲-۳-۱-۳- مقاومت باکتری نسبت به عوامل مختلف: ۱۷

۲-۱-۳-۴- تشخیص آزمایشگاهی استافیلوکوکوس ها: ۱۷

۲-۳-۱-۵- محیط های کشت تشخیصی و جداسازی استافیلوکوکوس ها ۱۸

۲-۳-۱-۶- تست های تشخیصی استافیلوکوکوس بیماری زا ۱۹

۲-۳-۲- عوامل مهم بیماری زایی استافیلوکوکوس ها: ۱۹
۲-۳-۲-۱- پادگن های استافیلوکوکوس ها: ۱۹
۲-۴- استرپتوکوکوس ۲۰
۲-۴-۱- طبقه بندی ۲۰
۲-۴- ۲- خصوصیات‌ظاهری‌باکتری ۲۱
۲-۴-۳- ویژگی های کشت و خصوصیات بیوشیمیایی ۲۱
۲-۴-۴- مقاومت باکتری نسبت به عوامل مختلف ۲۲
۲-۴-۵- تشخیص آزمایشگاهی استرپتوکوکوس ها ۲۳
۲-۴-۶- محیط های کشت تشخیصی و جداسازی استرپتوکوکوس ها ۲۳
۲-۴-۷- تست های تشخیصی استرپتوکوکوس ها ۲۳
۲-۴-۸- ساختار آنتی ژنی استرپتوکوکوس ها ۲۴
۲-۴-۹- سموم و آنزیم های استرپتوکوکوس ها ۲۴
۲-۴-۱۰- استرپتوکوکوس آگالاکتیه ۲۵
۲-۴-۱۰-۱- خصوصیات ظاهری و ویژگی ها و نیازهای رشد ۲۵
۲-۴-۱۰-۲- خصوصیات بیوشیمیایی ۲۵
۲-۴-۱۱- استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه ۲۶
۲-۴-۱۱-۱- اکولوژی ۲۶
۲-۴-۱۲- انترکوکوس فکالیس ۲۶
۲-۴-۱۲-۱- عوامل بقا وحدت ۲۶
۲-۴-۱۲-۲- اکولوژی ۲۷
۲-۴-۱۲-۳- پاتولوژی ۲۷
۲-۴-۱۳- بومادران *Achillea millefolium* *(برنجاسف، قیصوم)* ۲۷
۲-۴-۱۳-۱- تاریخچه ۲۷
-۴-۱۳-۲- ویژگی‌های گیاه شناسی ۲۸
۲-۴-۱۳-۳- خرده نگاری ۲۸
۲-۴-۱۳-۴- ارزیابی ۲۸
۲-۴-۱۳-۵- محل رویش و زمان جمع آوری ۲۹
۲-۴-۱۳-۶- بخش مورد استفاده ۲۹
۲-۴-۱۳-۷- فرآورده‌ها ۲۹

۲-۴-۱۳-۸- خواص درمانی ۲۹
۲-۴-۱۳-۹- ترکیب با گیاهان دارویی دیگر ۲۹
۲-۴-۱۳-۱۰- طریقه و مقدار مصرف ۳۰
۲-۴-۱۳-۱۱- عوارض جانبی ۳۰
۲-۴-۱۳-۱۲- موارد احتیاط و منع مصرف ۳۰
۲-۴-۱۳-۱۳- تداخلات دارویی ۳۰
۲-۴-۱۳-۱۴- بخش‌های داروئی ۳۱
۲-۴-۱۳-۱۵- ترکیب‌های شیمیائی ۳۱
۲-۴-۱۳-۱۶-خواص درمانی ۳۱
فصل سوم مواد و روش ها ۳۲
۳-۱- مواد و وسایل مورد استفاده ۳۲
۳-۲- روش کار ۳۳
۳-۲-۱- عصاره گیری ۳۳
۳-۲-۱-۲- تهیه اسانس بومادران: ۳۳
۳-۲-۲- تهیه رقت های مورد نیاز از باکتری های مورد آزمایش ۳۳
۳-۲-۳- روش انتشار دیسک (Disk Diffusion Method) ۳۳
۳-۲-۴- روش های مورد استفاده برای ارزیابی اثر ضدباکتریایی روغن فرار بومادران ۳۴
۳-۲-۴-۱- تعیین مقادیر MIC و MBC ۳۴
فصل چهارم نتایج ۳۵
فصل پنجم بحث ۴۰
منابع ۴۴

عنوان جدول‌ها

عنوان صفحه

جدول (۲-۱): تقسیم بندی ورم پستان ۱۰

جدول (۲-۲): خصوصیات برخی گونه های استافیلوکوکوس..... ۱۸

جدول (۲-۳): خصوصیات برخی گونه های استرپتوکوکوس..... ۲۲

جدول (۴-۱): نتایج تعیین حساسیت باکتری *انتروکوکوس فکالیس* توسط روغن فرار بومادران مورد مطالعه به روش دیسک دیفیوژن ۳۶

جدول (۴-۲): نتایج تعیین حساسیت باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* توسط روغن فرار بومادران مورد مطالعه به روش دیسک دیفیوژن..... ۳۶

جدول (۴-۳): نتایج تعیین حساسیت باکتری *استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه* توسط روغن فرار بومادران مورد مطالعه به روش دیسک دیفیوژن..... ۳۷

جدول (۴-۴): نتایج تعیین حساسیت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط روغن فرار بومادران مورد مطالعه به روش دیسک دیفیوژن..... ۳۷

جدول (۴-۵): حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) رقت های مختلف روغن فرار گیا ه بر روی باکتری *انتروکوکوس فکالیس*..... ۳۸

جدول (۴-۶): حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) رقت های مختلف روغن فرار گیا ه بر روی باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*..... ۳۸

جدول (۴-۷): حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) رقت های مختلف روغن فرار گیا ه بر روی باکتری *استرپتوکوکوس دیس آگالاکتیه*..... ۳۹

جدول (۴-۸): حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) رقت های مختلف روغن فرار گیا ه بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۳۹

شکل‌ها

عنوان صفحه

شکل۲-۱: گیاه بومادران ۲۸

فصل اول

مقدمه

اهمیت ورم پستان: اگر چه ورم پستان در تمام گونه‌ها به صورت تک گیر رخ می‌دهد، اهمیت اقتصادی بالای آن در گاو شیری مشخص شده است و ممکن است یکی از پر هزینه ترین بیماری‌های گله‌های شیری باشد[۱۷]. ورم پستان با افزایش دادن هزینه‌های تولید و کاهش دادن توانایی تولید، منجر به زیان اقتصادی برای تولید کننده‌ها می‌شود. حذف پیش از موعد گاوهای سود ده گله به خاطر وجود ورم پستان مزمن نیز یک ضرر مهم به شمار می‌رود[۱۷]. زیان‌های عظیم اقتصادی برای برگشت سرمایه‌ی به کار افتاده یک عامل بالقوه برای به کارگیری یک برنامه‌ی کنترل است. اجزای زیان‌های اقتصادی عبارتند از: زیان در تولید شیر، شیر دور ریخته شده گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و گاوهای تحت درمان، هزینه جایگزینی گاوهای حذف شده و زحمت اضافی برای درمان، ضدعفونی و نظافت. با توجه به تولید متابولیت‌های ثانویه مضر و امکان گسترش مقاومت ضد میکروبی در پی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، در درمان ورم پستان داروهای گیاهی امروزه بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. حدود ۵۰ درصد از داروهای تولیدشده در جهان، منشأء طبیعی دارند که با تغییراتی به عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند. نیمی‌ازداروهای یاد شده از منابع معدنی، حیوانی و باکتریایی به دست می‌آید و نیمی‌دیگر منشأء گیاهی دارد[۴۶].

امروزه ترکیبات زیادی از گیاهان به عنوان نگهدارنده و طعم دهنده در صنایع غذایی، محافظت کننده و شاداب کننده‌ی پوست در صنایع آرایشی و بهداشتی و روغن‌های فرار مختلف درآروما تراپی(Aroma therapy) مورداستفاده‌قرارمی‌گیرند[۱۰۳،۴۶].

گیاهان دارویی به دلیل ماهیت طبیعی و وجود ترکیبات همولوگ دارویی در کنار هم، با بدن سازگاری بهتری دارند و معمولاً فاقد عوارض ناخواسته هستند، لذا به خصوص در موارد مصرف طولانی و در بیماری‌های مزمن، بسیار مناسب می‌باشند[۳۴،۴۶،۷۲].

در بررسی حاضر هدف ما تعیین میزان تأثیر گیاه دارویی بومادران روی باکتری‌های *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، *انتروکوکوس فکالیس*، *استرپتوکوکوس دیس آگالاکتیه* و *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عوامل ورم پستان گاو در منطقه شهرکرد می‌باشد.

فصل دوم

کلیات

۲-۱- ساختمان غده پستان در گاو

هر یک از چهار کارتیه پستان گاو به عنوان یک غده‌ی مستقل عمل می‌کند و بافت‌های تولید کننده شیر مربوط به خود را دارد. بافت اسفنجی که نقش ترشحی دارد از میلیون‌ها ساختار حبابچه مانند (Alveolus) تشکیل شده است که توسط مجرایی به فضای جمع آوری کننده شیر (Cistern) تخلیه می‌شوند. سطح داخلی آلوئول توسط یک لایه از یاخته‌های اپیتلیال ترشحی پوشیده شده است.

پیش سازه‌های تشکیل دهنده شیر از مویرگ‌های مجاور توسط این سلول‌های اپی‌تلیال به آلوئول‌ها جذب می‌شوند و به پروتئین شیر، لاکتوز ، چربی و سایر ترکیبات تبدیل می‌شوند که در فاصله بین دو، دوشش داخل حفره یا آلوئول‌های داخلی آزاد شده و ذخیره می‌شوند. همچنان که شیر داخل آلوئول‌ها جمع می‌شود، فشار وارده بر یاخته‌های اپیتلیال منجر به متسع شدن آن‌ها شده و عمل ساخته شدن شیر و رها کردن آن به داخل فضای بین یاخته‌ها را متوقف می‌نماید. علاوه بر آن مویرگ‌های محیطی بسته می‌شوند و استفاده سلول‌ها از پیش سازه‌های شیر کاهش می‌یابد. قبل از شیردوشی، حدود ۶۰٪ از شیر حاصل از شیردوشی قبلی در آلوئول و مجاری کوچک جمع می‌شود و ۴۰٪ آن در مجرای سیسترن و مجاری بزرگ ذخیره می‌شود. شبکه‌ای از سلول‌های ماهیچه‌ای صاف تحت عنوان میو اپی‌تلیال (Myoepithelial) یا سلول‌های سبدی (Basket cells) هر آلوئول را می‌پوشانند. انقباض این سلول‌ها منجر به خروج شیر از آلوئول‌ها از میان مجاری ترشحی می‌شود [۲۳،۶۲].

۲-۲- ورم پستان

ورم پستان التهاب غده پستان بدون در نظر گرفتن عامل مولد است که به وسیله تغییرات فیزیولوژیک، شیمیایی و عموماً باکتریایی در شیر و همچنین تغییرات پاتولوژیک در بافت غده پستان مشخص می‌شود که

مهم ترین این تغییرات عبارتند از تغییررنگ، حضور لخته در شیر، وجود تعداد زیادی از لوکوسیت‌ها، تورم، درد، ادم، گرما. از آنجایی که شمار زیادی از ورم پستان‌ها با ملامسه دستی یا با مشاهده شیر هنگام دوشش قابل شناسایی نیست، پس می‌توان گفت تعداد زیادی از رخدادهای ورم پستان به صورت تحت بالینی می‌باشد، پس تشخیص ورم پستان به طور عمده وابسته به تست‌های غیر مستقیم نظیر شمار سلول‌های سوماتیک یا SCC (Somatic Cell Consentration) و سنجش غلظت الکترولیت‌های موجود در شیر (سدیم و کلر) می‌باشد. به نظر می‌رسد که کاربردی ترین و متداول ترین روش برای تشخیص ورم پستان به عنوان یک بیماری، افزایش مشخص SCC در شیر غده مبتلا می‌باشد که تقریباً در همه موارد افزایش SCC در شیر در نتیجه‌ی افزایش غلظت نوتروفیل‌ها در پاسخ به آسیب به بافت غده‌ای پستان است و ادامه این روند منجر به تغییرات ظاهری در شیر می‌شود[۹۴،۸۷،۳۰،۲۱،۱۵،۱۲].

۲-۲-۱ تقسم بندی ورم پستان

التهاب پستان تقریبا همیشه عفونی بوده و براساس حضور یا عدم حضور نشانه‌های بالینی به دو گروه تقسیم می‌شود:

الف) ورم پستان بالینی

ب) ورم پستان تحت بالینی[۵۰،۵۲،۵۳].

۲-۲-۱-۱-ورم پستان بالینی

ورم پستان بالینی را بر اساس وضعیت دام مبتلا به ورم پستان، به سه دسته تقسیم می‌کنند.

الف) ورم پستان درجه یک: در این شکل از بیماری، تغییرات قابل مشاهده‌ای در شیر دیده می‌شود (معمولاً لخته‌های کمی‌در پیش دوش دیده می‌شود). به علاوه تعدادی نوتروفیل و عامل پاتوژن در شیر وجود دارد اما در هر حال کارتیه طبیعی احساس می‌شود و گاو فاقد علایم بیماری است. این نوع ورم پستان معمولاً هم توسط استافیلوکوکوس‌ها و هم استرپتوکوکوس‌ها ایجاد می‌شود.

ب) ورم پستان درجه دو (حاد یا مزمن): تغییراتی در کارتیه و شیر دیده می‌شود اما گاو از نظر بالینی بیمار نیست، اگر کارتیه متورم، گرم، دردناک و گاهی اوقات شیر تغییر رنگ دهد، ورم پستان درجه دو حاد نامیده می‌شود. اگر کارتیه سفت و توده‌ای و بدون درد گردد ورم پستان درجه دو مزمن است . فرم حاد معمولاً به وسیله *استرپتوکوکوس‌ها*، *استافیلوکوکوس‌ها* یا کلی فرم‌ها و فرم مزمن بیش تر اوقات به وسیله *استافیلوکوکوس‌ها* ایجاد می‌گردد.

ج)ورم پستان درجه سه: کارتیه مشابه درجه دو حاد است و گاو مریض می‌باشد. موارد شدت یافته توسط *اشریشیا کلی (E.coli)* و *استافیلوکوکوس‌ها* ایجاد می‌گردد[۲۳،۶۰].

۲-۲-۱-۲-ورم پستان تحت بالینی

این دسته از ورم پستان‌ها، هیچگونه تغییرات قابل مشاهده‌ای در شکل ظاهری شیر یا پستان ایجاد نمی‌کند و کارتیه در مشاهده و ملامسه قوام طبیعی دارد و حیوان نیز سالم است. ولی افت تولید، وجود باکتری‌های مختلف و تغییرات متفاوت در ترکیب شیر از نشانه‌های کاملاً مشهود ا ست[۶۵].

اغلب موارد ورم پستان‌های تحت بالینی به وسیله ارگانیسم‌های واگیر دار نظیر *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *استافیلوکوکوس اورئوس* یا به وسیله میکرو ارگانیسم‌های محیطی از جمله گونه‌های مختلف استرپتوکوکوس غیر از آگالاکتیه مانند *استرپتوکوکوس یوبریس (Streptococcus uberis)* یا *استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه* (*Streptococcus dysgalactiae*) ایجاد می‌شود[۶۰]. در جدول شماره ۲-۱ به صورت خلاصه به انواع ورم پستان اشاره شده است.

جدول شماره ۲-۱:تقسیم بندی ورم پستان [۶۰،۶۵]

ورم پستان		تغییر وضعیت دام	تغییر وضعیت پستان	تغییر وضعیت شیر	افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک	تعداد پاتوژن‌ها
طبیعی		-	-	-	-	-
فرم تحت بالینی		-	-	-	+	+
فرم بالینی	درجه۱	-	-	+	+	+
	درجه۲	-	+	+	+	+
	درجه۳	+	+	+	+	+

طبیعی-،+غیر طبیعی

۲-۲-۲ معاینه فیزیکی پستان

غیر عادی بودن اندازه و قوام هر یک از کارتیه‌ها ممکن است مشاهده و یا در هنگام ملامسه، حس شود. ملامسه پستان زمانی حداکثر ارزش را دارد که بلافاصله بعد از شیردوشی کامل که پستان خالی از شیر است انجام شود. البته مشاهده پستان در حالت پر یا خالی بودن هر دو مفید است. پستان را باید از عقب مورد توجه قرار داد، ابتدا دو کارتیه عقب را مشاهده کرده با هم مقایسه می‌کنیم. سپس آن‌ها را بلند کرده و لمس می‌کنیم. همچنین سر پستانک‌ها و عقده‌های لنفاوی فوق پستانی باید لمس شوند. ملامسه و بازرسی پستان در جهت شناسائی وجود فیبروز، تورم التهابی و آتروفی بافت پستانی باید دنبال شود. بافت فیبروزه در اثر ازدیاد بافت همبند ایجاد شده و لذا قسمت مبتلا سخت‌تر از قسمت مقابل می‌گردد و در ملامسه سطح آن دارای گره‌های بیشتری است. تورم التهابی حاد همواره به صورت یکنواخت دیده می‌شود و با گرما، درد و غیر طبیعی بودن ترشح همراه است. اگر پستان در معاینه فیزیکی سفت، متورم و گرم باشد نشانه ورم پستان حاد بوده و اگر تغییر شکل یافته یا آتروفی و چروکیده باشد، بیانگر آسیب طولانی مدت می‌باشد[۶۶،۷۱،۹۰].

۲-۲-۳-روش‌های موجود در تشخیص ورم پستان

اغلب اوقات ورم پستان به صورت تحت بالنی بروز می‌کند، در این حالت ظاهر شیر و پستان سالم است و برای تشخیص آن از تست‌های مختلفی می‌توان استفاده کرد.

روش‌هایی که به منظور تشخیص و شناسایی اورام پستان به کار می‌روند، در منابع گوناگون به صورت زیر دسته بندی شده اند:

۲-۲-۳-۱-روش کولز(Coles)

کولز تست‌های آزمایشگاهی تشخیص ورم پستان را به چند دسته تقسیم می‌کند.

الف-روش‌های شیمیایی (Chemical methods)

ب-روش‌های میکروسکوپی (Microscopic methods)

ج-کشت دادن (Culture)

روش‌های شیمیایی به عنوان تست‌های غیر مستقیم مطرح هستند و شامل: تعیین pH، تست برموتیمول آبی (Bromothymol Blue)، تست برموکروزول ارغوانی (B.Purple)، تست کلراید (Chloride test)، تست وایت ساید (White side test) و تست ورم پستان کالیفرنیا می‌باشد. روش‌های میکروسکوپی شامل شمارش مستقیم لوکوسیت‌ها می‌باشد. روش کشت دادن به صورت کشت نمونه شیر روی محیط‌های مختلفی می‌باشد. اساس آزمایش کالیفرنیایی یا به اختصار CMT، بر پایه شمارش لوکوسیت‌ها است. به این ترتیب که در موقع ورم پستان، تعداد این سلول‌ها افزایش می‌یابد. این تغییر در شیر به علت وجود اگزوداهای التهابی در آلوئول‌های پستان و مخلوط شدن با شیر و در نتیجه قلیایی شدن شیر رخ می‌دهد. این آزمایش روش ساده‌ای است که برای مشخص کردن ورم پستان تحت بالینی بر اساس تخمین تعداد سلول‌های شیر استفاده می‌شود. آزمایش CMT تعداد سلول‌ها را مشخص نمی‌کند و تنها بالا بودن یا پایین بودن تعداد سلول‌های شیر را نشان می‌دهد. برای انجام آزمایش، شیر اولیه هر کارتیه را دور ریخته و ۳-۲ میلی لیتر شیر به درون فنجانک مخصوص ریخته و سپس به مقدار هم حجم آن، معرف CMT اضافه می‌شود و در ادامه معرف و شیر را با حرکت چرخشی در سطح افق مخلوط می‌نمایند. حداکثر تا ۲۰ ثانیه باید نتیجه را قرائت کرد و بر مبنای وضعیت ژل تشکیل شده درجه بندی صورت می‌گیرد.

ماده معرف به کار رفته در محلول CMT یک دترژنت آنیونی به نام آلکیل آریل سولفونات ۳٪ است که سلول‌های موجود در شیر را لیز کرده و با DNA موجود در هسته سلول‌های سوماتیک ترکیب شده و به دنبال واکنش انجام شده رسوب یا ژلی تولید می‌گردد که براساس وضعیت ژل تشکیل شده نتیجه آزمایش CMT به روش زیر تفسیر می‌گردد:

اگر رسوب ناچیزی تشکیل شود و سریعاً محو شود حالت خنثی یا Trace ایجاد شده است که در اثر وجود حدود ۴۰۰۰۰۰ سلول به وجود می‌آید.

اگر حالت ژل تشکیل شود، حالت ۱+ ایجاد شده است که در اثر وجود ۱۰۰۰۰۰۰-۵۰۰۰۰۰۰ سلول به وجود می‌آید.

اگر ژل غلیظ تشکیل شود، حالت ۲+ ایجاد شده است که در اثر وجود ۲۰۰۰۰۰۰-۱۰۰۰۰۰۰ سلول به وجود می‌آید.

اگر ژل چسبناک و نخی شکل باشد، حالت ۳+ ایجاد شده است که در اثر وجود ۴۰۰۰،۰۰۰-۲۰۰۰۰۰۰ سلول به وجود می‌آید. با توجه به موارد ذکر شده نتایج به صورت منفی (N)، جزیی (T)، ۱+، ۲+ و۳+ درجه بندی می‌گردد[۱۳،۱۶،۳۲،۴۷،۷۱].

۲-۲-۳-۲-روش براملی (Bramley)

براملی استفاده از ردیاب‌های ورم پستان را که در طول لوله‌های شیردوشی قرار می‌گیرند و نیز استفاده از تجهیزات شیردوشی مجهز به سنسور را در جهت تشخیص ورم پستان‌های بالینی توصیه می‌کند و روش‌های تشخیص فرم تحت بالینی را به صورت زیر می‌داند.

الف: تست‌های باکتریولوژیک

ب: تست‌های سایتولوژیک

ج: تست‌های بیوشیمیایی

تست‌های باکتریولوژیک همان روش کشت دادن نمونه‌ها است، تست‌های سایتولوژیک، تست‌های اندازه‌گیری کننده‌ی تعداد سلول‌های درون شیر است که شامل: شمارش میکروسکوپی یا استفاده از ابزار الکترونیک، روش CMT و WMT است. تست‌های بیوشیمیایی نیز عبارتند از: هدایت الکتریکی، اندازه گیری غلظت لاکتوز، تست کاتالاز، تست N– استیل $D-\beta$ گلوکز آمینیداز، اندازه گیری آنتی تریپسین و آلبومن سرم گاوی می‌باشد[۱۶].

۲-۲-۳-۳-روش چائوهان (Chauhan)

چائوهان آزمایشات قابل انجام روی شیر را به صورت زیر بیان می‌کند:

الف-تست‌های فیزیکی شامل بررسی رنگ، بو، pH، قوام ، وزن مخصوص، استریپ کاپ (Strip cup)

ب-تست‌های شیمیایی شامل برموتیمول آبی، تست کلراید، WMT، CMT وهاتیس (Hotis)

ج-تست‌های سیتولوژیک که شمارش میکروسکوپی سلول‌های شیر است.

د-تست‌های باکتریولوژیک که شامل آزمایش مستقیم میکروسکوپی و آزمایش کشت نمونه است[۱۶،۴۲].

۲-۲-۴-عوامل ایجاد کننده ورم پستان

عوامل بسیاری در ایجاد ورم پستان نقش دارند، در منابع علمی مختلف، حدود۲۰۰ عامل مؤثر در ایجاد ورم پستان ذکر شده است. براساس مطالعات اپیدمیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک این عوامل در سه دسته قرار می‌گیرند[۳۲، ۸۷].

الف) پاتوژن‌های اصلی

ب) پاتوژن‌های غیر اصلی

ج) پاتوژن‌های غیر معمول

۲-۲-۴-۱-پاتوژن‌های اصلی

عواملی هستند که منجر به ایجاد ورم پستان بالینی می‌گردند و خود به دو دسته تقسیم می‌شوند:

الف) پاتوژن‌های واگیر دار

مخزن اصلی این عوامل کارتیه‌های آلوده می‌باشند و عفونت‌های حاصل از این باکتری‌ها در حین شیردوشی و از طریق وسایل شیردوشی، دست‌های فرد شیردوش، گوساله‌های شیرخوار و حوله‌هایی که به صورت مشترک برای خشک کردن سرپستانک به کار می‌روند از کارتیه‌های آلوده به کارتیه‌های سالم و از گاوی به گاو دیگر

انتقال می‌یابند. از جمله عوامل پاتوژن این گروه می‌توان *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *مایکوپلاسما بوویس* (*M.bovis*) را نام برد.

ب) پاتوژن‌های محیطی

منشأ عوامل محیطی، محیط اطراف دام از قبیل بستر، کود، خاک، آب آلوده و مگس‌ها می‌باشند. این عوامل بیشتر در فواصل بین دو شیردوشی از محیط دام وارد سرپستانک و غدد پستانی شده و ایجاد عفونت می‌کنند، از جمله پاتوژن‌های این گروه می‌توان: گونه‌های استرپتوکوکوس مانند *استرپتوکوکوس یوبریس* و *استرپتوکوکوس دیس‌گالاکتیه* که بیشترین شیوع را دارند و *استرپتوکوکوس اکوئینوس* (*S.equinus*) که شیوع کمتری دارد، کلی‌فرم‌های محیطی شامل *اشریشیا کلی*، کلبسیلا، گونه‌های سیتروباکتر (Cirobacter)، گونه‌های انتروباکتر (Enterobacter)، گونه‌های سودوموناس (Psudomonas) و سایر اجرام گرم منفی مانند پروتئوس را نام برد[۹۵،۲۰،۲۳،۸۷].

۲-۲-۴-۲-پاتوژن‌های غیر اصلی

این پاتوژن‌ها جز فلور طبیعی سرپستانک‌ها و غدد پستانک هستند و معمولاً تنها در نوک سرپستانک مجرای پستان قرار می‌گیرند و به علت آسیب زایی پایین شان از اهمیت کمتری در ایجاد اورام پستان برخوردارند و بنابراین مشکل است که بتوان آن‌ها را عامل ایجاد ورم پستان بالینی دانست.

در شرایط خاصی این باکتری‌ها ممکن است سبب افزایش تعداد سلول‌ها و بروز عفونت تحت بالینی در پستان شوند . این عوامل شامل گونه‌های استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی و اغلب غیر همولایتیک مانند *استافیلوکوکوس زایلوسوس* (*S.xylosus*)، *استافیلوکوکوس اینترمدیکوس* (*S.intermedicus*)، *استافیلوکوکوس‌هایکوس*(*S.hyicus*) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (*S.epidermis*) *می‌باشند*[۲۰،۲۳،۸۷،۹۵].

۲-۲-۴-۳-پاتوژن‌های غیر معمول

گروه دیگری از عواملی ایجاد کننده ورم پستان می‌باشند که قرار دادن آن‌ها در گروه‌های قلبی مشکل است. اگر چه احتمال بروز ورم پستان در اثر عفونت این تعداد وسیع وجود دارد، ولی بیشتر ورم پستان‌ها به علت چند عامل متداول ذکر شده رخ می‌دهد. ورم پستان‌های ایجاد شده در اثر این عوامل، معمولا تک گیر هستند و تنها یک یا تعداد کمی از گاوهای یک گله را درگیر می‌کنند. برخی پاتوژن‌های این گروه عبارتند از: *آرکانوباکتریوم پایوژنز* (*Archanobacterium pyogenes*)، گونه‌های نوکاردیا (Nocardia)، گونه‌های پاستورلا (Pasteurella)، *استرپتوکوکوس فیکالیس* (*S.faecalis*)، *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* (*S.zooepidemicus*)، سالمونلا (Salmonella) و قارچ‌ها و مخمرها[۸۷].

۲-۲-۵-درمان ورم پستان

انتخاب استراتژی درمان مناسب، به بالینی یا تحت بالینی بودن ورم پستان، تاریخچه آن و وضعیت سلامت گله، بستگی دارد. یکی از جنبه‌های مهم درمان، شناسایی دام‌هایی است که نیازمند درمان‌اند. اطلاعات مفید عبارتند از: شناسایی گاو بیمار، شناسایی کارتیه عفونی، تاریخ وقوع ورم پستان‌ها، مرحله شیرواری، تعداد

زایش‌های قبلی، شناسایی پاتوژن، اطلاعات مربوط به درمان‌های انجام شده از جمله نوع داروی مصرفی، دز و روش تجویز، دوره درمان و میزان پاسخ به درمان و میزان تولید شیر.
درمان ورم پستان در دو مرحله زمانی انجام می‌شود:
الف)درمان در دوره شیرواری
ب)درمان در دوره خشکی

۲-۲-۵-۱-درمان در دوره شیرواری

در تعیین این‌که کدامیک از موارد ورمی، در دوره شیرواری باید درمان شوند چند عامل باید مدنظر قرار گیرند. این عوامل عبارتند از:
الف) نوع پاتوژن: تفاوت‌های مشخصی در میزان توفیق درمان عوامل اصلی باکتریایی ورم پستان، در طول دوره شیرواری وجود دارد. احتمال موفقیت درمان در طول شیرواری برای پاتوژن‌هایی نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* ضعیف است، از طرفی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* پاسخ خوبی به درمان در طول شیرواری می‌دهد و تمامی‌گاوهای عفونی مبتلا به آن باید درمان شوند. درمان پذیری ورم‌های ناشی از ارگانیسم‌های محیطی منطقی، ولی متفاوت است.
ب) نوع و شدت پاسخ التهابی: توجه به شدت واکنش‌های التهابی در تعیین مواردی که نیاز به درمان در طول دوره شیرواری دارند مهم است. گرمی، درد و آماس کارتیه، علایم بالینی هستند که نشان دهنده لزوم درمان آنتی‌بیوتیکی می‌باشند.
پ) طول مدت عفونت: طول دوره عفونت، در رابطه با ارگانیسم‌های واگیر دار خصوصاً *استافیلوکوکوس اورئوس*، یک عامل تعیین کننده در مورد موفقیت درمان در زمان شیر واری است.
ت) مرحله شیرواری: این عامل نقش مهمی در تعیین صرفه اقتصادی درمان در طول شیرواری دارد. درمان موارد ورمی‌در اواخر دوره‌ی شیرواری، حتی با شانس بهبودی بالا ممکن است مقرون به صرفه نباشد.
ث) سن و مرحله آبستنی گاو: احتمال بهبودی در گاوهای جوان بیشتر است.
انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب برای درمان معمولاً براساس کشت شیر و نتایج حاصل از آزمایش آنتی بیوگرام و توجه به عواملی نظیر در دسترس بودن دارو، علایم بالینی گاو، نتایج حاصل از کشت شیر و آزمایش آنتی بیوگرام در ورم پستان‌های قبلی گله، نتایج حاصل از درمان‌های قبلی گله، هزینه درمان و مدت زمان منع مصرف شیر و گوشت صورت می‌گیرد.
عوامل ایجاد ورم پستان سه قسمت را مورد تهاجم قرار می‌دهد:
الف) شیر و بافت پوششی مجاری و آلوئول‌ها
ب) پارانشیم غدد پستانی
ج) سایر دستگاه‌های بدن
به طور کلی عفونت‌هایی که به شیر و مجاری محدود می‌شوند به راحتی با تجویز آنتی‌بیوتیک داخل پستانی درمان می‌شوند. در مقابل عواملی که توانایی ایجاد عفونت‌های سیستمیک را دارند با تجویز آنتی‌بیوتیک عمومی، بهتر درمان می‌شوند و عواملی که پارانشیم را درگیر می‌کنند به سختی به درمان جواب می‌دهند چرا

که رسیدن و باقی ماندن غلظت مناسب دارو به این موقعیت آناتومی به دنبال تجویز عمومی یا داخل پستانی مشکل است.

۲-۲-۵-۲-درمان در دوره خشکی

درمان در دوره خشکی، استفاده از آنتی‌بیوتیک داخل پستانی بلافاصله پس از آخرین دوشش است، که یک جزء مهم و مؤثر در برنامه کنترل ورم پستانی می‌باشد. اغلب از ترکیباتی برای درمان دوره خشکی استفاده می‌شود که بتواند عفونت‌های ناشی *از استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* را در دوره خشکی برطرف و از بروز عفونت‌های جدید توسط همین پاتوژن‌ها و استرپتوکوکوس‌های محیطی در اوایل دوره خشکی جلوگیری کنند.

انجام درمان در دوره خشکی باعث شیوع پاتوژن‌های واگیردار می‌شود و شمار سلول‌های سوماتیک شیر تانک را کاهش می‌دهد. مؤثرترین زمان برای درمان اورام تحت بالینی دوره خشکی است.

درمان در دوره خشکی در مقایسه با درمان در دوره شیرواری دارای مزایای زیر است:

الف) میزان بهبودی در این روش بهتر از درمان در دوره شیرواری است.

ب) دز بالاتری از آنتی‌بیوتیک را می‌توان استفاده کرد.

پ) زمان ماندگاری آنتی‌بیوتیک در پستان طولانی تر است.

ت) احتمال وقوع عفونت‌های جدید در طول دوره خشکی کاهش می‌یابد.

ث) آسیب‌های بافتی ناشی از ورم پستان تا قبل از زایش بازسازی می‌شود.

ج) احتمال وقوع ورم پستان‌های بالینی در زمان گوساله زایی کاهش می‌یابد.

چ) میزان باقی مانده‌های آنتی‌بیوتیک موجود در شیر کاهش می‌یابد.

انتخاب یک درمان مناسب در دوره خشکی با توجه به این نکته صورت می‌گیرد که احتمال وقوع عفونت‌های ناشی از پاتوژن‌های گرم منفی در این زمان به خاطر غلظت بالای لاکتوفرین در ترشحات دوره خشکی کم است. بنابراین از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر علیه گونه‌های *استرپتوکوکوس، استافیلوکوکوس اورئوس*‌های تولید کننده بتالاکتاماز و *اکتینومایسس پیوژنز (A.pyogenes)* استفاده می‌شود[۸۷،۷۰،۲۳،۱۲،۱۰].

۲-۳-استافیلوکوکوس

۲-۳-۱-خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمیایی

جنس استافیلوکوکوس در خانواده میکروکوکاسه (Micrococcaceae) قرار دارد. در این خانواده به جز جنس استافیلوکوکوس ۳ جنس دیگر نیز وجود دارد که شامل میکروکوکوس(Micrococcus)، پلانوکوکوس (Planococcus) و استوماتوکوکوس (Stomaotcoccus) هستند که فقط جنس استافیلوکوکوس در انسان و حیوانات ایجاد بیماری می‌کند. استافیلوکوکوس اولین بار در سال ۱۸۷۸ توسط Koch در چرک مشاهده شد و در سال ۱۸۸۰ توسط پاستور در محیط مایع کشت گردید و Rosenbach در سال ۱۸۸۴ کشت خالص باکتری را تهیه نمود. استافیلوکوکوس‌ها باکتری‌های کروی، گرم مثبت به قطر ۰/۵ تا ۱/۵ میکرون هستند. اندازه سلول از یک سویه به سویه‌ای دیگر ممکن است متغیّر باشد و تا اندازه‌ای به سن و نوع محیط کشت بستگی دارد. نام استافیلوکوکوس از واژه‌ی یونانی استافیلو به معنی خوشه انگور گرفته شده است، چون این باکتری‌ها

در چرک و محیط‌های جامد به صورت دسته جمعی کنار یکدیگر قرار گرفته و توده‌ای شبیه به خوشه انگور به وجود می‌آورند، البته در محیط‌های مایع اغلب به صورت کوکسی‌های مجزا، دوتایی و یا زنجیره‌های کوتاه رشد می‌کنند.

این باکتری‌ها بی هوازی اختیاری، غیر متحرک ، فاقدهاگ، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی هستند.

دو ترکیب اصلی دیواره سلولی آن‌ها پپتیدوگلیکان و تیکوئیک اسیدهای وابسته است. تاکنون ۲۸ گونه استافیلوکوکوس و ۷ تحت گونه شناخته شده اند که بیشتر آن‌ها بی آزار و گنده روی هستند. فقط ۴ گونه این باکتری یعنی *استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس، استافیلوکوکوس اینترمدیوس و استافیلوکوکوس هاییکوس* ممکن است در حیوانات ایجاد بیماری کنند.

این باکتری‌ها براساس توانایی تولید آنزیم کوآگولاز به دو دسته کوآگولاز مثبت و منفی تقسیم می‌شوند . گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اینترمدیوس* مولد کوآگولاز هستند و سایز گونه‌های آن قادر به تولید کوآگولاز نمی‌باشند و تحت عنوان استافیلوکوکوس‌ها کوآگولاز منفی Coagulase Negative Staphylococcus (CNS) نامیده می‌شوند.

استافیلوکوکوس‌ها در سرتاسر جهان در پستانداران وجود دارند، در سطح خارجی بیشتر گونه‌های پستانداران و پرندگان هستند، هم‌چنین آن‌ها در حفره بینی (انسان)، پوست و غشاءهای موکوسی کلونیزه هستند، همچنین هوا و گرد و خاک موجود در محل زندگی حیوانات حاوی تعداد زیادی استافیلوکوکوس است[۷۴،۵۴،۴۱،۱۱،۷،۳].

۲-۳-۱-۱-شکل و خصوصیات ظاهری

استافیلوکوکوس‌ها در کشت‌های تازه به طور یکنواخت کروی و گرم و مثبت هستند و به خوبی با رنگ‌های آنیلینی رنگ می‌گیرند. معمولاً در شرایط آزمایشگاه واجد کپسول نمی‌باشند (اما در بدن دارای کپسول هستند)، کپسول پلی ساکاریدی از عمل اپسونیزاسیون (Opsonisation) یا بیگانه‌خواری توسط لوکوسیت‌های چند هسته‌ای ممانعت می‌کند. اگر چه تنها ۴ درصد سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس واجدکپسول هستند ولی تقریباً همه سویه‌ها با آنتی سرم‌های ضدپادگن کپسول واکنش نشان می‌دهند.

۲-۳-۱-۲-خصوصیات کشت و واکنش‌های بیوشیمیایی

تقریباً تمامی‌استافیلوکوکوس‌ها به آسانی در محیط‌های غیراختصاصی و ساده رشد می‌کنند و در محیط‌های جامد کلنی‌های نارنجی یا سفید ایجاد می‌کنند. رنگدانه‌های نارنجی در محیط‌های حاوی مواد نشاسته‌ای بهتر نمایان است. در محیط‌های مایع، کشت فراوان صورت می‌گیرد و محیط به طور یکنواخت کدر می‌شود و رسوب چسبناکی در ته لوله ایجاد می‌شود. در سطح آگار نیز به سهولت رشد می‌کنند و کلنی‌های گرد غیر شفاف مرطوب و براقی به وجود می‌آورد.

تعدادی سویه‌های استافیلوکوکوس هنگامی‌که تازه از مواد مرضی جدا شده اند ژلاتین را ذوب می‌کنند، ولی در اثر ماندن در آزمایشگاه و تجدید کشت پیاپی این حالت را از دست می‌دهند. این باکتری گلوکز، لاکتوز ساکاروز و مانیتول را اغلب بدون تولید گاز تخمیر می‌کنند ولی به طور کلی اختلاف زیادی از نظر تخمیر قندها و همچنین همولیز گلبول قرمز بین سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس وجود دارد. استافیلوکوکوس‌ها

نیترات را احیا کرده و کاتالاز مثبت هستند، تولید اوره آز می‌کنند ولی همه آن‌ها اندول منفی هستند، آن‌ها آنزیم‌های پروتئولیتیک (Proteolytic) متعددی تولید می‌کنند[۳،۱۸،۴۳].

۲-۳-۱-۳-مقاومت باکتری نسبت به عوامل مختلف

استافیلوکوکوس‌ها در مقایسه با سایر باکتری‌های فاقدهاگ مقاوم تر هستند. در محیط آگار پوشیده با پارافین که در یخ نگه داری می‌شود برای ماه‌ها زنده می‌مانند. در محیط‌های حاوی غلظت نمک یا سوکروز رشد می‌کنند به طوری که غلظت ۷/۵ درصد نمک را تحمل می‌کنند. نسبت به خشکی مقاوم اند و در چرک خشک شده ماه‌ها زنده می‌مانند. ضدعفونی کننده‌های معمولی را بهتر از باکتری‌های دیگر تحمل می‌کنند. مقاومت خاصی در مقابل حرارت ندارند، به طوری که اغلب در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت از بین می‌روند، در حضور فنل یک درصد در ۳۵ دقیقه و در حضور فنل ۲ درصد در ۱۵ دقیقه از بین می‌روند. در حضور ۰/۵ درصد کلرید جیوه در یک ساعت و در حضور ۱۰ درصد فرم آلدهید در ۱۰ دقیقه از بین می‌روند. تغییرات pH را در دامنه‌ی ۹/۵-۴ تحمل می‌کنند[۵۴،۶، ۷۴].

۲-۱-۳-۴-تشخیص آزمایشگاهی استافیلوکوکوس‌ها

نمونه‌های مناسب شامل اگزودا (Exsudate)، چرک آبسه‌ها، شیرهای ورم پستانی، ترشحات زخم، خلط، خون، مایع مغزی نخاعی و بافت‌های تحت تأثیر قرار گرفته از بیماری، است که به شرح زیر مورد آزمایش قرار می‌گیرند:

الف) آزمایش میکروسکوپی مستقیم: در گسترشی که از نمونه‌های مورد نظر تهیه و به روش گرم رنگ آمیزی شده باشد، کوکوسی‌هایی به صورت تک تک، دوتایی و غالباً خوشه‌هایی نامنظم مشاهده می‌شد. در آزمایش میکروسکوپی مستقیم تفاوتی میان انواع بیماریزا از غیر بیماریزا موجود نیست.

ب) کشت: غالبا استافیلوکوکوس‌ها روی اکثر محیط‌های آزمایشگاهی در شرایط هوازی یا میکروآئروفیل (Microaerophilic) رشد می‌کنند. حرارت مناسب رشد آن ۳۷ درجه سانتی‌گراد است و پس از ۲۴-۱۸ ساعت کلونی آن ظاهر می‌شود، ولی ظهور رنگدانه نیاز به نگهداری بیشتر محیط کشت باکتری، در حرارت اتاق دارد.

از جمله محیط‌های کشت: از آگار خون‌دار، مانیتول سالت آگار (Manitol salt agar)، نوترینت آگار Nutriant agar، فنیل اتیل الکل آگار (Phenyl Ethyl Alcohol Agar) و کلمبیا کلیستین نالیدیکسیک اسید آگار (ColumbialcolistinNalidixic Agar) (CAN) می‌توان نام برد.

کلونی استافیلوکوکوس به قطر ۴-۲ میلی متر، برجسته، صاف، مدور وبه رنگ سفید، زرد و نارنجی است و هر چند وجود یا عدم رنگدانه از نظر بیماری زایی استافیلوکوکوس چندان با ارزش نمی‌باشد، ولی تا حدودی می‌توان گفت که استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت دارای رنگدانه نیز می‌باشند[۱۷،۱۹،۷۴].

در جدول شماره ۲-۲ به خصوصیات برخی گونه‌های استافیلوکوکوس اشاره شد است.

جدول شماره(۲-۲): خصوصیات برخی گونه‌های استافیلوکوکوس[۴۱,۵۴,۸۴]

نام گونه	تولید کوآگولاز	ایجاد همولیز	تولید اوره‌آز	تخمیر مانیتول	تخمیر مالتوز	هیدرولیز آسکولین	تولید DNase
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	+	+	−	+
استافیلوکوکوس اینترمدیوس	+	+	+	D	+	−	+
استافیلوکوکوس اپیدرمیس	−	(d)	+	−	+	−	D
استافیلوکوکوس گالیناروم	−	(d)	+	+	+	+	−
استافیلوکوکوس کاپری	−	(d)	+	D	+	−	−

+ : ۹۰ درصد یا بیشتر سویه‌ها مثبت

- : ۹۰ درصد یا بیشتر سویه‌ها منفی

d : ۱۱ تا ۸۹ درصد سویه‌ها مثبت

(d): واکنش باتاخیر

۲-۳-۱-۵- محیط‌های کشت تشخیصی و جداسازی استافیلوکوکوس‌ها

الف) به عنوان محیط پایه برای کشت استافیلوکوکوس می‌توان از محیط‌های تریپتیکیز سوی آگار (Tripticase soy agar)، کلمبیا آگار (Columbia agar) و بلاد آگار (Blood agar) استفاده کرد.

ب) محیط‌های کشت مایع مناسب برای پرورش استافیلوکوکوس عباتند از محیط آبگوشت قلب یا هارت انفوزیون براث Heart Infusion Broth، تریپتیکاز سوی براث (Trioticase soy broth) و تریپتون سوی براث (Tripton soy broth).

ج) اگر آزمایش میکروسکوپی مستقیم استافیلوکوکوس همراه با باکتری‌های دیگری دیده شد، برای جدا کردن آن‌ها از یکدیگر می‌توان از محیط‌های کشت جامدی مانند مانیتول سالت آگار و چامپن آگار (Champan agar) استفاده کرد. وجود مقدار نسبتاً زیاد کلرور سدیم در دو محیط کشت نامبرده فوق (۵۵ گرم در لیتر در محیط چامپن و ۷۵ گرم در لیتر در محیط مانیتول سالت آگار) از رشد سایر باکترهای پاتوژن جلوگیری می‌کند، به علاوه در محیط مانیتول سالت آگار وجود قند مانیتول و معرف قرمز فنل (Phenol Red) باعث می‌شود که اگر باکتری استافیلوکوکوس طلایی *(استافیلوکوکوس اورئوس)* باشد، کلنی‌هایی به رنگ زرد با هاله‌ی زردرنگ به وجود آید، در صورتی که سایر استافیلوکوکوس‌ها معمولاً تولید کلنی‌های کوچک‌تر و قرمز با منطقه بنفش رنگ می‌کنند.

د) محیط کشت انتخابی برای تشخیص انواع استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت از استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی و سایر میکروارگانیسم‌ها به کار می‌رود . از این محیط‌ها می‌توان به تلوریت – گلیسین اشاره

کرد. در این محیط، استافیلو کوکوس کوآگولاز مثبت، پس از ۲۴ ساعت تلوریت را به طریق داخل سلولی احیا نموده و کلنی‌های سیاه رنگی تولید می‌کند، در صورتی که استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی یا سایر میکروارگانیسم‌ها پس از ۲۴ ساعت یا رشد قابل ملاحظه‌ای نداشته ویا کلونی خاکستری رنگ به وجود می‌آورند[۱۹].

۲-۳-۱-۶-تست‌های تشخیصی استافیلوکوکوس بیماری زا

- آزمایش کوآگولاز (Coagulase): دقیق ترین آزمایشی است که برای بازشناسی استافیلوکوکوس بیماریزا از غیر بیماریزا به طور معمول به کار می‌رود. *استافیلوکوکوس اورئوس* بیماریزا کوآگولاز مثبت است.
- آزمایش کاتالاز (Catalase)
- تست دی ان آز (DNase)
- تخمیر قند مانیتول
- تست فسفاتاز (Phosphatase)
- آزمایش بررسی رنگدانه

شایان ذکر است که تمام آزمایشات بالا در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت هستند[۱۹].

۲-۳-۲-عوامل مهم بیماری زایی استافیلوکوکوس‌ها

۲-۳-۲-۱-پادگن‌های استافیلوکوکوس‌ها

تا کنون چندین پادگن شناخته شده که مسئول واکنش‌های ایمونولوژی با آنتی سرم‌های ضداستافیلوکوکوس‌ها می‌باشد.

مهم ترین ترکیبات پادگنی استافیلوکوکوس‌ها: لایه پپتیدوگلیکان، پروتئین A، اسید تیکوئیک، عامل جمع کنندگی و کپسول می‌باشد. نحوه‌ی فعالیت هر یک از این ترکیبات به اختصار در زیر آورده شده است:

- کپسول: کپسول *استافیلوکوکوس اورئوس* حاوی پادگن‌های متعددی است که ضد فاگوسیتوز می‌باشند و واجد آنزیمی از نوع کوآگولاز هستند که بر فیبرینوژن اثر کرده و موجب انعقاد پلاسما و تجمع باکتری در پلاسما می‌شوند.
- لایه پپتیدوگلیکان: این لایه باعث تحریک تولید مواد تب‌زای داخلی، تثبیت فشار اسمزی، جذب لوکوسیت‌ها، ممانعت از فاگوسیتوز و جذب شیمیایی می‌شود.
- پروتئینA: پلی پپتید باریک کوچکی است با وزن مولکولی سیزده هزار دالتون که به قسمت Fc ایمونوگلوبولین‌های IgG1, IgG2 و IgG4 ، متصل شده و باعث ممانعت از فاگوسیتوز و جذب لوکوسیت‌ها می‌شود.
- تیکوئیک اسید: باعث تنظیم غلظت کاتیونی غشاء سلولی می‌شود. گیرنده‌ی باکتریوفاژها می‌باشد ومحل اتصالی برای چسبیدن به گیرنده‌های سطوح مخاطی بدن است.
- غشاء سیتوپلاسمی: به‌عنوان سد اسمزی عمل می‌کند، باعث تنظیم حمل مواد به داخل و خارج سلول شده و محل عمل آنزیم‌های بیوسنتزی و تنفسی است[۱۹].

۲-۴-استرپتوکوکوس

استرپتوکوکوس‌ها باکتری‌های کروی هستند به ابعاد ۰/۵ تا ۱ میکرون و دارای واکنش گرم مثبت که بعضی از انواع آن‌ها به سادگی رنگ خود را از دست می‌دهند. در نمونه‌های آزمایشگاهی به صورت زنجیره‌های کوتاه، بلند یا دوتایی هستند، طول زنجیرهای آن‌ها متفاوت بوده و مربوط به ترکیبات مواد تشکیل دهنده محیط کشت، نوع استرپتوکوکوس و طریقه برداشت و تهیه اسمیر دارد، ولی هرگز به صورت خوشه‌ای دیده نمی‌شوند. این باکتری‌ها بدون اسپور و اغلب بی حرکت هستند. در کشت‌های جوان بعضی از آن‌ها کپسول دیده می‌شود که از جنس پلی‌ساکارید یا اسید هیالورونیک است. این باکتری هوازی و بی‌هوازی اختیاری است، محیط‌های غنی‌تر را ترجیح می‌دهد و در سطح محیط کشت ظاهر شبنمی دارد. گونه‌های مختلف از نظر توانایی تولید اسید با استفاده از کربوهیدرات‌ها متفاوت اند.

این باکتری‌ها به طور گسترده‌ای در طبیعت پراکنده شده‌اند ولی اغلب روی سطح پوست، غشاءهای مخاطی و داخل روده انسان و حیوانات و همچنین داخل شیر وجود دارند. آن‌ها معمولاً به صورت ساپروفیت در محیط و به دور از حیوانات یافت نمی‌شوند[۹۶، ۴۰، ۶۱].

۲-۴-۱-طبقه بندی

استرپتوکوکوس‌ها گروهی از باکتری‌های ناهمگون و متفاوت هستند که هیچ سیستم واحدی برای طبقه بندی آن‌ها کافی نیست، در طول سال‌ها طبقه بندی استرپتوکوکوس‌ها به گروه‌های اصلی بر پایه یکسری از مشاهدات قرار داشت. روشی که توسط Andrewes و Horder در سال ۱۹۰۶ پیشنهاد شد و در سال ۱۹۰۸ توسط Winslow کامل شد اولین روشی بود که در آن ترکیبی از بیماری زایی و توانایی تخمیر به عنوان اساس تمایز استفاده شده بود که تنها شامل یک گونه بیماری زا یعنی *استرپتوکوکوس پیوژنز* می‌شد و پنج تای دیگر ساپروفیت بودند.

Smith و Brown در سال ۱۹۱۵ از بیماران مبتلا به التهاب لوزه استرپتوکوکوس‌های بیماری زایی را جداکردند و براساس نوع همولیز تولید شده در دو گروه قرار دادند. یک گروه الفا همولایتیک بودند که باعث تخریب ناقص گلبول‌های قرمز و تشکیل رنگدانه سبز در اطراف پرگنه باکتری روی محیط خون‌دار می‌شوند و گروه بعدی بتا همولایتیک بودند که ناحیه‌ای شفاف از همولیز کامل اطراف پرگنه باکتری ایجاد می‌کند.

در سال ۱۹۱۶ Holman طبقه بندی پیشنهاد کرد که در آن استرپتوکوکوس‌ها را براساس نوع همولیز به دو گروه تقسیم کرده و سپس استرپتوکوکوس‌های هر گروه را براساس توانایی تخمیر قند دسته بندی کرد.

چهارمین روش را Brown در سال ۱۹۱۹ ثبت کرد. وی یک بررسی به منظور مطالعه استرپتوکوکوس‌های همولایتیک را توصیف کرد که براساس نوع فعالیت همولایتیک شان روی محیط خون‌دار قابل شناسایی بودند، تیپ $\alpha, \acute{\beta}, \alpha$ یک تیپ حد واسط αوβ و تیپ گاما که همولیز تولید نمی‌کند.

در سال ۱۹۲۸ Rebeca Lancefield گزارش کرد که استرپتوکوکوس‌های همولایتیک را می‌توان براساس فعالیت آنها در واکنش با آنتی‌بادی‌های با استفاده از یک جزء کربوهیدراتی به نام جزء C که فعالیت آنتی ژنی دارد، طبقه بندی کرد. این کربوهیدرات در دیواره سلولی بسیاری از استرپتوکوکوس‌ها موجود بوده واساس گروه بندی سرولوژیک به گروه لانسفیلد A-H و K-U در واکنش‌های رسوبی است. اختصاصی بودن سرولوژیک کربوهیدرات مختص گروه، مبتنی بر حضور یک قند آمینی است.