بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده دامپزشکی

بررسی فعالیت بیگانه‌خواری نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها بر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در گاوان مبتلا به ورم پستان در شرایط آزمایشگاهی

ناهیده افضل آهنگران

دانشکده دامپزشکی

گروه میکروبیولوژی

۱۳۹۱

اساتید راهنما :

دکتر نوروز دلیرژ

دکتر ملاحت احمدی

فهرست

عنوان **صفحه**

فصل اول

مقدمه ۱

فصل دوم

کلیات ۲

۲-۱ تورم پستان ۲

۲-۱-۱ شاخص‌های تشخیص تورم پستان ۳

۲-۱-۲ شمارش سلول‌های سوماتیک شیر ٤

۲-۱-۳ تشخیص ورم پستان ٥

۲-۲ *استافیلوکوکوس* ٦

۲-۲-۱ اجزای ساختمانی دیواره باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۷

۲-۲-۲ پروتئین‌های سطحی دیواره سلولی ۸

۲-۲-۳ فرآورده‌های خارج سلولی ۹

۲-۲-٤ بیماری‌زایی ۱۱

۲-۲-٥ ایجاد بیماری ۱۲

۲-۲-٦ روش‌های تشخیص ۱۳

۲-۳ ایمنی‌زایی ۱۳

۲-۳-۱ تعریف سیستم ایمنی ۱٤

۲-۳-۲ تقسیم‌بندی سیستم ایمنی ۱٤

۲-۳-۳ سیستم ایمنی ذاتی ۱٥

۲-۳-۳-۱ اجزای تشکیل دهنده سیستم ایمنی ذاتی ۱٥

۲-۳-۳-۲ سلول‌های دخیل در سیستم ایمنی ذاتی ۱٦

۲-۳-۳-۳ ارتباط بین سیستم ایمنی ذاتی و سیستم ایمنی اکتسابی ۱٦

۲-٤ التهاب ۱۸

۲-٥ نوتروفیل‌ها ۱۹

۲-۵-۱ گرانولوپوئز و کنتیک تولید نوتروفیل‌ها ۲۲
۲-۵-۲ اعمال نوتروفیل‌ها ۲۳
۲-۵-۳ پذیرنده‌های سطحی ۲۶
۲-۵-۳-۱ پذیرنده‌های اپسونین‌ها ۲۶
۲-۵-۳-۲ پذیرنده‌های واسطه اتصال سلول ۲۶
۲-۵-٤ فرجام نوتروفیل‌ها ۲۷
۲-٦ منوسیت‌ها ۲۷
۲-٦-۱ فعال شدن ۳۲
۲-٦-۲ پذیرنده‌ها ۳۲
۲-۷ آپوپتوز و نکروز ۳۳
۲-۷-۱ مسیرهای آپوپتوز ۳٤
۲-۷-۲ آپوپتوز نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها ۳٦
۲-۸ فلوسایتومتری ۳٦

فصل سوم

۳- مواد و روش کار

۳-۱ مواد و لوازم مورد نیاز ۳۸
۳-۱-۱ تهیه نمونه شیر از گاوان مبتلا به بیماری ورم پستان و گاوان سالم ۳۹
۳-۲ تهیه خون وFITC و جداسازی نوتروفیل‌ها ٤۰
۳-۲-۱ تهیه نمونه خون ٤۱
۳-۲-۲ جداسازی نوتروفیل‌ها ٤۱
۳-۲-۳ روش تهیه رنگ FITC استوک ٤۲
۳-۳ رنگ آمیزی و اپسونیزه کردن باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ٤۲
۳-۳-۱ کشت و رنگ آمیزی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC29213 با رنگ فلورسانس FITC ٤۳
۳-۳-۲ تعیین تیتر اپتیمم آنتی بادی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در سرم ٤۳
۳-۳-۳ اپسونیزه کردن باکتری رنگ شده با سرم تعیین تیتر شده ٤٤
٤-۳ بررسی میزان بیگانه‌خواری باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط نوتروفیل‌ها به‌روش فلوسایتومتری

۳-۵ تهیه عوامل مترشحه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ٤٤
۳-۵-۱ سنجش میزان پروتئین به روش برادفورد ٤٥
۳-٦ سنجش میزان زنده‌مانی نوتروفیل‌ها ٤٦
۳-٦-۱ رنگ‌آمیزی با AnnexinV/PI ٤٧
۳-۷ بررسی میزان انفجار تنفسی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط نوتروفیل‌ها به روش نیترو بلو تترازولیوم(NBT) ٤٧
۳-۷-۱ روش آزمایش ٤٨
۳-۸ بررسی میزان بیگانه‌خواری و زنده‌مانی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط منوسیت‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس ٤٩
۳-۸-۱ جداسازی منوسیت‌ها ٤٩
۳-۸-۲ بررسی تاثیر عوامل مترشحه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC29213) بر روی میزان بیگانه‌خواری منوسیت‌ها به روش میکروسکوپ فلورسانس ٥٠
۳-۸-۳ سنجش میزان زنده‌مانی منوسیت‌ها..... ٥٠
۳-۸-٤ بررسی میزان انفجار تنفسی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC29213) توسط منوسیت‌ها به روش NBT ٥١
۳-۹ آنالیز آماری ٥٢
فصل چهارم
نتایج ٥٣
فصل پنجم/ بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادات
بحث و نتیجه‌گیری ٦٠
پیشنهادات ٦٤
خلاصه انگلیسی ٦٥
فصل ششم
منابع ٦٦

خلاصه فارسی پایان‌نامه دکتری تخصصی، به شماره ۹۱-ک-۱ ، دانشگاه ارومیه، سال ۱۳۹۲-۱۳۹۱

نگارنده: ناهیده افضل آهنگران

عنوان پایان‌نامه:

بررسی فعالیت بیگانه‌خواری نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها بر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در گاوان مبتلا به ورم پستان در شرایط آزمایشگاهی

هدف از انجام این مطالعه بررسی فعالیت بیگانه‌خواری نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها و همچنین اثر عوامل مترشحه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC29213 بر زنده‌مانی نوتروفیل‌ها و منوسیت‌های به دست آمده از گاوان شیری اطراف ارومیه می‌باشد.

در این مطالعه ۵ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۱۶۰ نمونه شیر حاصل از تورم پستان بالینی و تحت بالینی جدا شد. جدایه‌ها بر اساس خواص کشت بیوشیمیایی و آزمایش های کاتالاز و کوآگولاز و نیز تکثیر ژن ***nuc*** و ***coa*** تائید شدند.

برای جداسازی نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها، نمونه‌های خون هپارینه از ۵ گاو سالم و ۵ گاو مبتلا اخذ گردید. جداسازی نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها با استفاده از مگلومین کامپاند ۷۶٪ و هیستوپک به ترتیب انجام شد.

بعد از تهیه عوامل مترشحه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC29213 غلظت آن با استفاده از کیت بیورد 400 µg/ml اندازه‌گیری شد. اثر غلظت‌های مختلف عوامل مترشحه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC29213 بر زنده‌مانی و قابلیت بیگانه‌خواری نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها به روش‌های فلوسایتومتری و ایمونوفلورسانس به ترتیب ارزیابی شد. همچنین، میزان انفجار تنفسی سلول‌های منوسیت و نوتروفیل به دنبال مجاورسازی عوامل مترشحه و باکتری به روش NBT سنجیده شد.

در گروه گاوان سالم عوامل مترشحه *استافیلوکوکوس اورئوس* تاثیر خاصی بر روی میزان بیگانه‌خواری و قابلیت انفجار تنفسی منوسیت‌ها نداشته است. در گروه گاوان بیمار میزان بیگانه خواری منوسیت‌ها به شدت کاهش یافته است، با این وجود تغییر خاصی در قابلیت انفجار تنفسی سلول‌های مذکور ایجاد نشده است.

در حالی‌که در گاوان سالم حضور هم زمان باکتری و عوامل مترشحه منجر به افزایش قابلیت انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها شده است، معهذا قابلیت بیگانه‌خواری در حضور عوامل مترشحه کاهش می‌یابد. البته از آنجایی که انهدام عوامل بیماری‌زا وابسته به بیگانه‌خواری آن‌ها می‌باشد، بنابر این در مجموع می‌توان بیان کرد که حضور عوامل مترشحه مانع پاک‌سازی موثر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شود. در گاوان مبتلا هم زمان هر دو قابلیت بیگانه‌خواری و انفجار تنفسی کاهش می‌یابد که نشان-دهنده نقص بیشتر در پاک‌سازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد.

ترشحات *استافیلوکوکوس اورئوس* باعث القا آپوپتوز و تا حدودی نکروز، هم در نوتروفیل‌ها و هم در مونوسیت‌های گاوان سالم و بیمار می‌شود، ولی این سلول‌ها در گاوان بیمار نسبت به مرگ سلولی حساس‌تر از گاوان سالم هستند. از طرفی در گاوان سالم نوتروفیل‌ها و در گاوان بیمار منوسیت‌ها نسبت به مرگ سلولی حساس‌ترند. وقتی گاوان به بیماری ورم پستان *استافیلوکوکوس اروئوس* مبتلا می‌شوند، عوامل مترشحه از این باکتری تأثیر بیشتری روی منوسیت‌ها نسبت به نوتروفیل‌ها دارند. آنچه مسلم است، تعیین دقیق محتویات ترشحات باکتری و نیز مکانیسم عمل آن‌ها به روشن شدن مطلب کمک خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اروئوس*، عوامل مترشحه باکتری، نوتروفیل، منوسیت

فصل اول :

مقدمه

Introduction

مقدمه :

تورم پستان التهاب غده پستان می‌باشد که به وسیله طیف وسیعی از اجرام بیماری‌زا ایجاد می شود. یکی از مهم‌ترین اجرام ایجاد کننده ورم پستان بالینی و تحت بالینی در گاو *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. تورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* هر ساله ضررهای اقتصادی فراوانی در جهان ایجاد می‌نماید که این ضررهای اقتصادی علاوه بر کاهش تولید شیر، کاهش کیفیت شیر،افزایش هزینه ها و بیرون ریختن شیر به دلیل محتوای آنتی بیوتیکی، حتی ممکن است موجب حذف دام مبتلا شود، مضاف بر این‌که ورم پستان غالبا حیوانات با بیشترین استعداد شیردهی را هدف قرار می‌دهد که این نکته سبب افزایش خسارات ناشی از تورم پستان می‌شود. دفاع در غده پستانی بوسیله چندین فاکتور هومورال و سلولی انجام می‌گیرد. طی مطالعات گوناگونی نشان داده شده که نوتروفیل‌ها اولین سلول‌های مهاجر از خون به جایگاه عفونت (غده پستانی) هستند، این سلول‌ها گرانولوسیت‌های چند هسته‌ای می‌باشند که به مقادیر زیادی در خون وجود دارند و اولین سلول‌هایی هستند که برای ایجاد پاسخ ایمنی از خون به محل التهاب مهاجرت می‌نمایند و وجود آن‌ها برای دفاع ذاتی در مقابل باکتری ها ضروری است و بیگانه‌خواری ابزار اصلی آن‌ها در دفاع علیه باکتری‌ها می‌باشد. این سلول‌ها پاتوژن‌های مهاجم را از طریق فاگوسیتوز و کشتن خارج سلولی از راه متابولیت‌های اکسیژن و نیتروژن فعال از بین می‌برند. منوسیت‌ها نیز از طریق فاگوسیتوز و همچنین عرضه آنتی ژن می‌توانند در مقابله با پاتوژن‌های عفونی چون *استافیلوکوکوس اورئوس* ایفای نقش نمایند. از این‌رو با توجه به خسارات اقتصادی ناشی از بیماری ورم پستان و همچنین میزان شیوع آن در کشور ایران لازم است مطالعات بیشتری به ویژه در رابطه با عملکرد نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها در ورم پستان گاوی از جهت ارزیابی سلول های ایمنی ذاتی به عنوان نخستین خط دفاعی میزبان بر علیه عفونت‌های باکتریایی صورت گیرد. با توجه به اهمیت نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها در ایمنی بر علیه بیماری‌های عفونی از جمله ورم پستان *استافیلوکوکی* در این مطالعه تاثیر *استافیلوکوکوس اورئوس* و عوامل مترشحه از آن بر میزان بیگانه‌خواری و زنده‌مانی (Viability) نوتروفیل‌ها و منوسیت‌های جدا شده از دام‌های مبتلا به بیماری ورم پستان در مقایسه با دام‌های سالم مورد بررسی قرار گرفت.

فصل دوم :

کلیات

Review of Literature

کلیات

۲-۱ تورم پستان

به التهاب بافت پارانشیم غده پستانی گاو در نتیجه ورود میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از طریق مجاری سر پستانک تورم پستان گفته می‌شود که با تغییرات پاتولوژیک در غدد پستانی و تغییرات فیزیکی و شیمیایی در شیر همراه است. تغییرات رنگ شیر، حضور لخته در شیر، افزایش سلول‌های سوماتیک و لکوسیت‌ها و تغییرات ملموس بافت پارانشیم غده پستانی از تغییرات پاتولوژیک ورم پستان محسوب می‌شوند. ورم پستان گاو توسط عوامل مختلفی ایجاد می‌شود و تورم پستان از نظر عوامل ایجاد کننده آن به دو نوع تقسیم می-شوند: ۱- تورم پستانی محیطی[۱] ۲- تورم پستان واگیردار[۲]

عوامل ایجاد کننده ورم پستان محیطی معمولاً در محیط زیست گاو حضور داشته و از محیط به سر پستانک‌ها منتقل می‌شود (Radostis *et al*; 2007). از پاتوژن‌های محیطی می‌توان گونه‌های *استرپتوکوکوس* محیطی (*یوبریس*، *دیس آگالاکتیه*، *اکوئینوس*) و اشریشیا کلی را نام برد (Wilson *et al*; 2004). در مورد این نوع تورم پستان، محیط تمیز باعث کاهش موارد وقوع بیماری می‌گردد. یکی از ویژگی‌های تورم پستان محیطی این است که به ندرت باعث افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک شیر به بیش‌از ٤٠٠٠٠٠ سلول در یک میلی لیتر می‌شود. بنابر این در صورتی که تعداد سلول‌های سوماتیک در شیر حدود ٤٠٠٠٠٠- ٣٠٠٠٠٠ سلول در یک میلی لیتر باشد ، این احتمال وجود دارد که تورم پستان از نوع محیطی باشد (Rodostis, 2007).

از عوامل اصلی ایجاد کننده ورم پستان واگیردار می‌توان به *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *مایکوپلاسما بویس* اشاره نمود. مکانیسم بیماری‌زایی اغلب ارگانیسم‌های پاتوژن در پستان، از یک مدل پیروی می‌کنند. این مدل به سه مرحله تقسیم می‌شود که شامل مراحل تهاجم[۳]، ابتلا[٤]، و التهاب[٥] است. مرحله تهاجم، مرحله عبور عامل پاتوژن از کانال پستان و اقامت در غده پستان است. در مرحلهٔ ابتلا پاتوژن به سرعت تکثیر می‌یابد و به بافت پستان حمله می‌کند. در این مرحله برخی از باکتری‌ها، سم نیز

[1] - Enviromental mastitis
[2] - Contagious mastitis
[3] - Invasion
[4] - Infection
[5] - Inflammation

تولید می‌کنند و در مرحله التهاب که مرحله نهایی است، علایم بالینی ورم پستان دیده می‌شود. از بین عوامل اصلی ایجاد کننده ورم پستان، *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان مهم‌ترین پاتوژن ورم پستان گاوی شناسایی شده است. منبع عمده این اجرام عموما بافت پستان گاو می‌باشد. روش‌های معمول انتقال این نوع ورم پستان، انتقال از گاوی به گاو دیگر از طریق حوله‌های آلوده مورد استفاده در شستشو و خشک کردن پستان و استفادهٔ مکرر از این حوله‌ها، باقی ماندن شیر در فنجان‌های دستگاه شیر دوشی و استفاده از وسایل نامناسب شیر دوشی می‌باشد. بر خلاف تورم پستان محیطی، در تورم پستان واگیردار تعداد سلول‌های سوماتیک می‌توانند به چندین میلیون در هر میلی لیتر شیر نیز برسد (Radostis, 2007). از لحاظ شدت، تورم پستان به انواع بالینی (دارای علائم بالینی قابل رویت) و تحت بالینی (فاقد علایم بالینی قابل رویت) تقسیم می‌شود. برای تشخیص تورم پستان از شمارش سلول‌های سوماتیک می‌توان استفاده کرد. تشخیص زود هنگام تورم پستان از طریق شمارش سلول‌های سوماتیک منجر به درمان مناسب و بهبودی سریع می‌گردد (Radostis, 2007). در صنعت گاوهای شیری اگر تعداد سلول‌های سوماتیک کمتر از ۲۰۰۰۰۰ سلول در یک میلی لیتر باشد بیان کننده سلامت حیوان از نظر تورم پستان بوده و گاوهایی که تعداد سلول‌های سوماتیک در شیر آن‌ها بیش از ۲۰۰۰۰۰ سلول در یک میلی لیتر باشد به عنوان مبتلایان به تورم پستان تلقی می‌گردند.

۲-۱-۱ شاخص‌های تشخیص تورم پستان

تشخیص تورم پستان و ارزیابی کیفیت شیر در سه سطح بررسی می‌شود:

الف) در هر راس گاو

ب) غربالگری شیر موجود در تانک شیر

ج) مخزن ذخیره شیر مربوط به کل گله

در دوشش دستی قبل از دوشش شیر، ظاهر شیر باید بررسی شود (قبل از شروع دوشش اصلی، با دوشش مقدار بسیار جزئی شیر و بررسی آن به وسیله کارگر دامداری)، در صورت وجود هرگونه حالت فیزیکی غیر طبیعی در شیر، نباید آن را با دیگر شیرها مخلوط نمود. در دوشش اتوماتیک این بررسی امکان پذیر نبوده، لذا وجود نوعی سیستم شیردوشی اتوماتیک با قابلیت کافی و کاربردی در تشخیص موارد تورم پستان احساس می‌شود.

از آن جایی که تورم پستان بر روی کیفیت شیر و میزان تولید گله تاثیر می‌گذارد و نیز امکان انتقال آن از گاوی به گاو دیگر وجود دارد لذا تشخیص به موقع و انجام روش‌های درمانی به ویژه در موارد تحت بالینی

بیماری به منظور کنترل پیشرفت و انتشار بیماری حایز اهمیت است. برای این منظور می‌توان از آزمایش‌های باکتری‌شناسی استفاده نمود، ولی از این آزمایش‌ها نمی‌توان برای تشخیص تورم پستان به صورت معمول استفاده نمود. از این‌رو اندازه‌گیری شاخص‌های التهابی به عنوان آزمایش غربال‌گری برای تشخیص کارتیه-های مبتلا به عفونت و انتخاب گاوهایی که نیاز به آزمایش‌های باکتریولوژی بعدی دارند، لازم میباشد (Hirvonen *et al*; 1999). تورم پستان ترکیب شیر را تغییر می‌دهد و دامنه این تغییرات به پاسخ التهابی و به درجه بیماری‌زایی عامل ایجاد کننده تورم پستان و میزان درگیری بافت پستان بستگی دارد. از مهمترین تغییرات ایجاد شده در بافت پستان مبتلا به نشت آهن، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها از خون به شیر به دلیل افزایش نفوذپذیری عروق خونی بافت پستان، تهاجم سلول‌های بیگانه‌خوار به شیر، کاهش قدرت تولیدی بافت پستان و کاهش یک سری از ترکیبات شیر اشاره نمود. همچنین امکان افزایش یک سری ازعوامل مرتبط با واکنش-های التهابی مثل پروتئین های فاز حاد[6] در کارتیه مبتلا وجود دارد. توصیه فدراسیون بین المللی شیر(IDF)[7] برای تشخیص تورم پستان بر پایه شمارش سلول‌های سوماتیک و وضعیت باکتری‌شناسی کارتیه استوار است (Hogeveen *et al*; 2001).

۲-۱-۲ شمارش سلول‌های سوماتیک شیر

روش‌های خودکار گوناگونی جهت شمارش سلول‌های سوماتیک در شیر وجود دارد. سلول‌های سوماتیک در یک گاو سالم شامل ماکروفاژها (۸۸-٦٦٪)، نوتروفیل‌ها، سلول‌های اپی‌تلیال و سلول‌های تک هسته‌ای می‌باشند. در کارتیه سالم تنها ۱۱-۱٪ از سلول‌های سوماتیک را نوتروفیل‌ها تشکیل می‌دهند در حالی که در موارد التهاب داخل پستانی این رقم به ۹۰٪ و یا بیشتر از آن می‌رسد، از این رو در صد نوتروفیل‌های سلول‌های سوماتیک به عنوان شاخص تورم پستان در نظر گرفته می‌شود (Hamann *et al*; 1998). همراه با شمارش تام سلول‌های سوماتیک، تشخیص تفریقی سلول‌ها نیز باید انجام شود، زیرا شمارش تفریقی این سلول‌ها اطلاعات بیشتری را در مورد وضعیت سلامت کارتیه مشخص می‌نماید، البته این روش به طور وسیع انجام نمی‌گیرد. از سال ۱۹٦۰ شمارش سلول‌های سوماتیک در شیر به طور وسیع به عنوان شاخص تورم پستان (عفونت داخل پستانی) مورد استفاده قرار گرفته است. در مطالعات اخیر حد آستانه سلول‌های سوماتیک در التهاب داخل پستانی ۲۰۰ هزار سلول در هر میلی لیتر شیر گزارش شده است (Ruegg & Rememami, 2002). البته شمارش سلول‌های سوماتیک در شیر همیشه باید با نتایج

[6] - Acute phase protein
[7] - International Dairy Federation

آزمایش‌های باکتری‌شناسی مقایسه شود و این آزمایش ها به تنهایی قابل اعتماد نیستند. استفاده از مقادیر به دست آمده از مطالعات مختلف برای تعداد سلول‌های سوماتیک هرگاو در حالت سلامت، ارزیابی وضعیت سلامت پستان گاو را مطمئن‌تر می‌کند (Djabri *et al*; 2002). عوامل گوناگون مانند دوره شیرواری و عوامل فیزیولوژیک بر روی تعداد سلول‌های سوماتیک تاثیر دارند، به طوریکه بلا فاصله پس از زایش تعداد سلول-های سوماتیک در شیر بالاست، اما ۵-٤ روز پس از زایش به سرعت به حد طبیعی بر می‌گردد و همچنین با نزدیک شدن به انتهای دوره شیرواری تعداد سلول‌های سوماتیک مجدداً به طور جزئی افزایش می‌یابد، اما در مبتلایان به تورم پستان در میزان بالا ثابت باقی می‌ماند، بنابراین می‌توان از شمارش سلول‌های سوماتیک در شیر مدت کوتاهی پس از زایش جهت تشخیص موارد جدید عفونت داخل پستانی استفاده نمود (Barkema *et al*; 1999). همچنین در مطالعات اخیر مشخص شده که عوامل فیزیولوژیک نیز بر روی تعداد سلول های سوماتیک گاو های سالم اثر کمی دارند. تناوب شیر دوشی نیز تعداد سلول های سوماتیک را تحت تاثیر قرار می‌دهد. اگر دفعات دوشش از دو بار در روز به سه بار در روز افزایش یابد تعداد سلول‌های سوماتیک تانک شیر کاهش بارزی را نشان می‌دهد و نیز در صد گاو های دارای تعداد سلول‌های سوماتیک بالا، کاهش می-یابد. ولی اگر فاصله بین دوشش‌ها خیلی کوتاه (٤ ساعت یا کمتر) و یا خیلی طولانی گردد تعداد سلول‌های سوماتیک مخزن شیر افزایش می‌یابد. در این موارد افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک در مخزن شیر به دلیل افزایش موارد التهاب داخل پستانی و افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک شیر هر گاو می‌باشد (Sargeant *et al*; 2001).

۲-۱-۳ تشخیص ورم پستان

تشخیص ورم پستان بالینی، عمدتاً بر اساس یافته‌های بالینی توصیف شده و روش‌های آزمایشگاهی جهت تشخیص و کشت عامل پاتوژن می‌باشد. از آن جایی که کشت نمونه‌های شیر تمام کارتیه‌های گله کاری سخت و پر هزینه است، استفاده از روش‌های غیر مستقیم در تشخیص ورم پستان تحت بالینی حایز اهمیت است. تست‌های غیر مستقیم برای تشخیص ورم پستان تحت بالینی شامل شمارش سلول‌های سوماتیک با استفاده از دستگاه‌های اتوماتیک، آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی[۸]، تغییر در هدایت الکتریکی[۹] و آنزیم‌های سلولی در شیر (مانند NAGase) می‌باشند. از میان تست‌های یاد شده CMT و هدایت الکتریکی

[8] -California matitis test

[9] - Electerical Conductivity

در سطح مزرعه به خوبی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در تشخیص ورم پستان بالینی ممکن است تست‌های بیوشیمی سرم و یا هماتولوژی توصیه شود.

آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی (CMT)

با استفاده از آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی که بر اساس محتوای داکسی ریبونوکلئیک (DNA) سلول‌های سوماتیک موجود در شیر عمل می‌کند، می‌توان تعداد سلول‌های سوماتیک را تخمین زد. معرف مورد استفاده در این آزمایش حاوی یک ماده شوینده و برموکروزل بنفش می‌باشد که به عنوان شاخص pH استفاده میشود (Sandholm *et al*; 1995). آزمایش کالیفرنیایی ورم پستان به عنوان یک وسیله تشخیصی در شناسایی گاوهایی است که در دوران خشکی، نیاز به درمان دارند و می‌تواند تورم پستان را در ۸۰-۷۵٪ از گاوهایی که احتیاج به درمان دارند مشخص نماید. اخیراً در مطالعه‌ای، آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی و شمارش سلول‌های سوماتیک شیر جهت تشخیص تورم پستان گاوهای تازه‌زا با هم مقایسه شده‌اند. در این تحقیق مشخص شده است که آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی در بر نامه‌های مدیریتی گله در تشخیص گاوهایی که در مراحل ابتدایی ابتلا به التهاب داخل پستانی حاصل از پاتوژن اصلی هستند، مناسب می‌باشد. معمولاً سه روز پس از زایش آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی بیشترین ویژگی و حساسیت را در تشخیص التهاب داخل پستانی دارد (نتایج آزمایش کالیفرنیایی ورم پستان از صفر تا چهار مثبت در نظر گرفته می شود و در مواردی که نتیجه آزمایش صفر باشد، تعداد سلول‌های سوماتیک کمتر از ۲۰۰ هزار در هر میلی لیتر شیر خواهد بود). آزمایش کالیفرنیایی ورم پستان کاربرد وسیعی داشته و تنها آزمایش تشخیصی است که احتمال آلوده بودن کارتیه‌ها و در نتیجه نیازمندی به انجام آزمایش‌های باکتری‌شناسی بعدی را مشخص می نماید.

۲-۲ *استافیلوکوکوس*

استافیلوکوک ها باکتری‌های گرم مثبت کوکسی شکل می‌باشند که به صورت دوتایی، زنجیرهای کوتاه و خوشه‌ای وجود دارند. این باکتری‌ها بی‌هوازی اختیاری، غیر متحرک، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و تخمیر کننده می‌باشند. گونه‌های زیادی در جنس *استافیلوکوکوس* وجود دارند. گونه‌هایی که در دامپزشکی بیشترین اهمیت را دارند شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*[10]، *استافیلوکوکوس اینترمدیوس*[11]، ، *استافیلوکوکوس هاییکوس*[12] و *استافیلوکوکوس شلیفری* تحت گونه *کوآگولانس*[13] می‌باشند (Carter *et al; 2004*).

[10] - *Staphylococcus aureus*
[11] - *Staphylococcus intermedius*
[12] - *Staphylococcus hyicus*

استافیلوکوکوس اورئوس به صورت کومنسال در پوست و غشاهای مخاطی به ویژه بخش های فوقانی دستگاه تنفس و دستگاه گوارش وجود دارد. *استافیلوکوکوس اورئوس* یک باکتری بیماری‌زا می‌باشد که در انسان و در حیوانات موجب بیماری‌های عفونی گوناگون می گردد. این باکتری در گاو معمول ترین عامل تورم پستان واگیردار می‌باشد (Zecconi *et al;* 2003). تورم پستان *استافیلوکوکی* در گاو می تواند به فرم فوق حاد و تحت حاد باشد اما اغلب به فرم مزمن و تحت بالینی اتفاق می‌افتد. در گاو تورم پستان قانقاریایی فوق حاد ناشی از این جرم اغلب بعد از زایمان دیده می شود (Carter *et al; 2004*). باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به منظور ایجاد تورم پستان باید از راه مجرای سر پستانک وارد غده پستان شده و بر مکانیسم های دفاع موضعی هومورال و سلولی غلبه نماید (Piccinin *et al.*; 1999; Barri *et al*; 2003). این عمل توسط یک سری عوامل حدت صورت می گیرد که در دیواره سلولی قرار داشته و یا به صورت پروتئین های خارج سلولی ترشح می شوند. عوامل حدت شامل کپسول (Sau *et al*; 1997)، پپتیدو گلیکان، اسید های تیکوئیک، آگلوتینوژن ها، پروتئین A، فاکتور جمع کننده (کوآگولاز متصل)[14] (Ni Eidhin *et al*; 1998)، استافیلوکوآگولاز[15]، استافیلوکیناز[16] و هیالورونیداز/ فاکتور پخش کننده[17] (Coulter *et al*; 1998)، همولیزین ها، لکوسیدین ها (Gravet *et al.*; 1998)، توکسین های اکسفولیاتیو[18]، انتروتوکسین ها و توکسین ۱- سندرم شوک توکسیک[19] (Dinges *et al.*; 2000) و غیره می باشند.

۲-۲-۱ اجزای ساختمانی دیواره باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

۱- کپسول /کپسول پلی ساکاریدی در بعضی از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود دارد و خاصیت ضد بیگانه خواری دارد. بر اساس کپسول پلی ساکاریدی یازده نوع سروتیپ برای *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شده است که معمول‌ترین آن ها در بین جدایه های بالینی انواع ۵ و ۸ می‌باشند. اجزای اصلی کپسول شامل N – استیل آمینورونیک اسید[20] و N – استیل فوکوز امین[21] می باشند. ژن های موثر در تولید و

---

[13] - *Staphylococcus schleiferi subsp. Coogulans*
[14] - Clumping factor (bound coagulase)
[15]- Staphylocoagulase
[16] - Staphylokinase
[17] - Spreading factor
[18] - Exfoliative toxins
[19] - Toxic-shock sandrome toxin
[20] -N- acetyl aminoric acid
[21] - N- acetylfucosamine

سنتز کپسول در یک اپرون منفرد بر روی کروموزوم قرار دارند. سویه های فاقد کپسول تا حد زیادی نسبت به بیگانه خواری حساس می باشند. چنین سویه ها یی از قابلیت کمتری در ایجاد تورم پستان در گاو بر خوردارند (Songer & Post, 2005).

۲-۲-۲ پروتئین های سطحی دیواره سلولی

پروتئین A نوعی پروتئین سطحی پلی مورف می باشد که درسطح اغلب سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود دارد و به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل حدت در اکثر سویه های حاد *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد(Dalla Pozza *et al*; 1999). پروتئین A خاصیت ضد بیگانه خواری داشته و می تواند به صورت منحصر به فرد به ناحیه Fc ایمونوگلوبولین G متصل شود. پوشیده شدن سلول باکتریایی به وسیله آنتی بادی در انحراف پاسخ دفاعی بدن و در نتیجه حفاظت موثر است. سویه های جهش یافته فاقد پروتئین A در شرایط داخل بدن از حدت کم تری بر خواردار می باشند (Songer & Post, 2005). *استافیلوکوک ها* همچنین مولکول هایی تحت عنوان MSCRAMMs[۲۲] تولید می نمایند که در بر گیرنده یک سری عوامل چسبندگی شامل پروتئین متصل شونده به کلاژن، پروتئین متصل شونده به فیبرونکتین، پروتئین متصل شونده به فیبرینوژن، پروتئین متصل شونده به الاستین، فاکتور جمع کننده و عامل چسبندگی به ماتریکس[۲۳] می باشند(Songer & Post, 2005). پپتیدوگلیکان نوعی پلیمر پلی ساکاریدی است که به همراه اسید تیکوئیک موجب استحکام دیواره سلولی باکتری می گردد. پپتیدوگلیکان در بدن میزبان موجب تولید اینترلوکین-۱ (IL-1) توسط سلول‌های بیگانه‌خوار می‌شود. IL-1 موجود در داخل جریان خون نهایتاً به هیپوتالاموس می رسد. IL-1 در هیپوتالاموس نورون ها را در جهت تولید پروستاگلاندین ها تحریک نموده که این امر موجب افزایش درجه حرارت بدن و تب می گردد. بعلاوه IL-1 به ایجاد پاسخ التهابی موضعی کمک نموده و در ایجاد پاسخ ایمنی اختصاصی نقش دارد. اسیدهای تیکوئیک به پپتیدوگلیکان متصل می شوند و از نظر آنتی‌ژن اختصاصیت گونه‌ای دارند. دیواره سلولی همه سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حاوی نوعی پلی ساکارید A اختصاصی گونه[۲۴] می‌باشد. بخش آنتی‌ژنی این پلی ساکارید، واحد N- استیل گلوکز آمینیل ربیتول[۲۵] می‌باشد.

[22] - Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
[23] - Matrix adhesion factor

[24] - Species-specific polysaccharide
[25] - N- acetyl glucosaminyl ribitol unit

رنگدانه‌های کاروتنوئید موجب ایجاد رنگ نارنجی و یا زرد در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می-گردند.

۲-۲-۳ فرآورده های خارج سلولی

کاتالاز: این آنزیم توسط *استافیلوکوک ها* تولید می شود، اما توسط استرپتوکوک ها تولید نمی‌گردد. کاتالاز پر اکسید هیدروژن را به اکسیژن و آب تبدیل می نماید.

کوآگولاز: نوعی اگزوآنزیم می باشد که در حدت نقش دارد و از طریق فعال کردن پروترومبین موجب تبدیل فیبرینوژن به فیبرین و در نتیجه لخته شدن پلاسما می گردد (Sutra & Poutrel, 1994). *استافیلوکوکوس اورئوس* دو نوع کوآگولاز تولید می کند که شامل کوآگولاز آزاد و کوآگولاز متصل (فاکتور جمع کننده) می باشند. کوآگولاز آزاد در محیط کشت آزاد شده و در آزمایش لوله‌ای مشخص می شود. کوآگولاز متصل، به سلول وابسته بوده و توسط روش لام آزمایش می شود. لخته شدن پلاسما توسط هر دو نوع کوآگولاز صورت می‌گیرد. گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اینترمدیوس* و *استافیلوکوکوس هاییکوس* کوآگولاز تولید می‌کنند. کوآگولاز از طریق پوشاندن سطح *استافیلوکوک‌ها* با فیبرین و از این رو در حفاظت آن ها در برابر بیگانه‌خواری و از بین رفتن در داخل سلول‌های بیگانه‌خوار در عفونت نقش دارد (Carter *et al; 2004*). همچنین این آنزیم از طریق تشکیل لخته در محل عفونت، از نفوذ سلول‌های بیگانه‌خوار ممانعت نموده و از این طریق باکتری را در برابر بیگانه‌خواری محافظت می‌نماید (Songer & Post, 2005). از این رو کوآگولاز به عنوان یکی از عوامل حدت *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته می‌شود.

استافیلوکیناز/فیبرینولیزین: این اگزوآنزیم با تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین موجب تجزیه لخته‌های فیبرین می شود (Carter *et al; 2004*).

هیالورونیداز: این آنزیم فاکتور پخش کننده نیز نامیده می‌شود و در حدت نقش دارد. این آنزیم اسید هیالورونیک ماده زمینه‌ای بافت های همبند را تخریب نموده و از این طریق موجب تسهیل انتشار جرم در بافت ها می‌گردد (Carter *et al; 2004*).

همولیزین‌ها: *استافیلوکوکوس اورئوس* همولیزین‌های متعددی تولید می‌نماید که از نظر آنتی‌ژنی با هم تفاوت دارند که شامل همولیزین‌های α، β، γ و δ می‌باشند. حساسیت گلبول‌های قرمز گونه‌های مختلف حیوانات نسبت به این توکسین‌ها متفاوت است. توکسین‌های α وβ همولیزین‌های قوی می‌باشند. توکسین α بر روی گلبول‌های قرمز خرگوش بیشترین تاثیر را داشته و در ایجاد منطقه همولیز روشن داخلی نقش دارد.

این توکسین موجب اسپاسم عضلات صاف شده و نکروز دهنده پوست و کشنده است. توکسین β اسفنگومیلیناز C می‌باشد و در ایجاد همولیز خارجی نقش دارد. این توکسین بر روی گلبول‌های قرمز گوسفند بیشترین تاثیر را دارد. توکسین γ طیف همولیز کنندگی محدودی داشته و توسط آگار و کلسترول ممانعت می‌گردد، این توکسین تقریباً توسط تمام سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید می‌شود. توکسین δ طیف همولیز کنندگی وسیعی دارد و توسط فسفولیپیدها مهار می‌گردد. نحوه عملکرد توکسین‌های γ و δ و نقش آن‌ها در بیماری‌زایی به خوبی روشن نیست (Carter *et al; 2004*).

نوکلئاز مقاوم به حرارت : این آنزیم موجب شکسته شدن اسید داکسی ریبونوکلئیک (DNA) و اسید ریبونوکلئیک (RNA) می گردد. این آنزیم توسط اکثر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اینترمدیوس*، *استافیلوکوکوس هاییکوس* و *استافیلوکوکوس شلیفری* تحت گونه *کوآگولانس* تولید می‌گردد (Carter *et al; 2004*).

لیپاز: این آنزیم اسیدهای چرب محافظت کننده پوست را تجزیه مینماید. سویه های لیپاز مثبت موجب آبسه های جلدی و زیر جلدی می گردند (Carter *et al; 2004*).

لکوسیدین: لکوسیدین ها متعلق به خانواده ای از توکسین ها می باشند که دارای قابلیت ایجاد منفذ[۲۶] بوده و لذا در از بین رفتن گرانولوسیت ها و ماکروفاژها نقش دارند (Miles *et al.*; 2001). این توکسین‌ها در حدت باکتری و در نتیجه بروز تورم پستان در گاو موثرند (Younis *et al.*; 2005). لکوسیدین‌ها همچنین در پیشرفت بیماری تورم پستان نقش مهمی دارند (Loeffler *et al.*; 1988). توکسین PVL[۲۷] توسط ۳-۲٪ از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* سنتز می شود . این توکسین از طریق فعال سازی نوتروفیل ها و ماکروفاژ ها موجب القاء واسطه های التهابی می شود (Siqueira *et al*; 1997).

توکسین‌های اکسفولیاتیو A و B (اکسفولیاتین): این توکسین ها موجب شکسته شدن اتصالات محکم[۲۸] در لایه گرانولوزوم اپیدرم شده و موجب ورقه ورقه شدن پوست[۲۹] می‌گردند (Carter *et al; 2004*).

انتروتوکسین‌ها : حداقل هشت نوع انتروتوکسین (SEA-SEB-SEC-SED-SEE-SEG-SHE-SEI) شناسایی شده است. این توکسین ها دارای خاصیت تهوع آوری قوی هستند (Bergdoll *et al*; 1983; Bohach *et al*; 1997). انتروتوکسین‌ها پروتئین‌های خارج سلولی مقاوم به حرارت (۳۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه

[26] - Pore forming toxins

[27] - PantonValintine Leukocydine

[28] - Desmosomes

[29] - Scale skin Syndrome

سانتی‌گراد) متشکل از زنجیره های پلی پپتیدی منفرد با وزن مولکولی حدودا ۲۰ کیلودالتون می باشند. تقریبا ۵۰ در صد از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس یک یا بیشتر از یک نوع انتروتوکسین تولید می نمایند. سایر گونه های استافیلوکوکوس نیز گاهی انتروتوکسین تولید می کنند. از میان این سموم شش نوع (SEA-SEB-SEC- SED-SEE- SHE) به عنوان ابر آنتی ژن[۳۰] شناسایی شده‌اند (Martin *et al*; 2000). این توکسین ها بخاطر داشتن خواص بیولوژیکی مهمی چون تب زایی ، آنتی ژنیسیته بالا و کشندگی قوی (در خرگوش تا ۱۰۰۰۰۰ برابر) به عنوان ابر آنتی ژن‌های تب‌زا[۳۱](PTSAgs) گروه بندی می شوند(Bergdoll *et al*; 1983; Bohach *et al*; 1997). اثر کشندگی این ابر آنتی ژن‌ها به علت فعال کردن سلول های T و ماکروفاژ ها و آزاد شدن مقادیر زیادی مونوکاین و لنفوکاین از این سلول ها و ایجاد حساسیت به آندوتوکسین می باشد. این ابر آنتی ژن ها مولکول های پلی پپتیدی غیر گلیکوزیله نسبتا پایدار به مواد شیمیایی غیر فعال می باشند. مطالعات اخیر نشان داده اند که انتروتوکسین های استافیلوکوکی (SETs) در گاو به عنوان عوامل حدت عمل می نمایند (Chang *et al*; 2005).

توکسین –۱ سندرم شوک توکسیک : این توکسین قبلا به نام اگزوتوکسین تب زای C نامیده می‌شد، موجب سندرم شوک توکسیک در انسان می گردد، این بیماری کشنده حاد با علایمی مثل تب بالا، شوک، قرمزی پراکنده پوست ، پوسته پوسته شدن پوست ۲–۱ هفته پس از شروع بیماری (قبل از این زمان کشنده نیست) در گیری سیستم های مختلف مشخص می گردد. از خواص بیولوژیکی مهم این توکسین قدرت بی نظیر آن در عبور از سطوح مخاطی است (Bohach *et al*; 1998; Hamad *et al*; 1997; Melish *et al*; 1998) و تنها ابر آنتی ژن شناخته شده ای است که قادر به فعال سازی دیواره سلولی باکتری ایجاد کننده آرتریت می باشد (Schwab *et al* ; 1993).

۲–۲–٤ بیماری‌زایی

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بر روی سطح خود پروتئین‌هایی را بیان می‌نماید که به پروتئین‌های لامینین[۳۲] و فیبرونکتین[۳۳] میزبان اتصال می یابند. فیبرونکتین در لخته‌های خون و نیز بر روی سطوح اندوتلیال و اپی‌تلیال وجود دارد (Carter *et al; 2004*). عفونت‌ها با منشاء داخلی معمول بوده، اما عفونت-

[30] - Super antigen
[31] - Pyrogenic toxin superantigen
[32] - Laminin
[33] - Fibronectin