JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

سال دوم، شماره دوم، بهار ۱۳۹۰
صفحات ۸۷-۷۴

تعیین ارزش تشـخیصی پروتئـین های فاز حاد مثبـت و منفی شیر به عـنوان بیومارکـرهای جدید در تشخـیص ورم پـستان تـحت بالینی گـاو

سید حامد شیرازی بهشتی ها[1*]، وحید ربانی[2]، شهاب الدین صافی[3]، محمود بلورچی[4]، مهرداد عامری[5]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، کرج، ایران

۲- دانش آموخته دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، کرج، ایران

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، گروه کلینیکال پاتولوژی، تهران، ایران

۴- دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، تهران، ایران

۵- دانشگاه آیووا، دانشکده دامپزشکی، گروه کلینیکال پاتولوژی و شرکت تحقیقاتی دارویی فایزر، گروتون، امریکا

** نویسنده مسئول: hamed.beheshti@kiau.ac.ir*

چکیده

در حال حاضر، شمارش سلول های سوماتیک و کشت باکتریایی شیر به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو در نظر گرفته می شود. اما امروزه مشخص شده که حساسیت و ویژگی این آزمایش ها پایین است بنابراین در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو نیاز به بیومارکرهای جدیدی با حساسیت بالا است. پروتـئین های فاز حاد، پروتئین هایی هستند که که غلظت آنها در پاسـخ به التهاب افزایش (پروتئـین های فاز حاد مثـبت) یا کاهش (پروتئین های فاز حاد منفی) می یابد. هدف از این مطالعه تعیین ارزش تشخیصی پروتئین های فاز حاد مثبت (آمیلوئید A، آلبومین، آلفالاکتالبومین و ایمونوگلوبولین ها) و منفی (بتالاکتوگلوبولین) شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو است. تعداد ۹۰ راس گاو نژاد هلشتاین که از لحاظ بالینی سالم بودند به طور تصادفی از ۵ گاوداری صنعتی استان تهران انتخاب شدند. از این تعداد، ۵۲ راس گاو بر اساس بالاتر بودن تعداد سلول های سوماتیک از cells/mL ۱۳۰×۱۰۰۰ و مثبت شدن نتیجه کشت میکروبی شیر حداقل یک کارتیه آنها در گروه گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی قرا گرفتند. غلظت آمیلوئید A در شیر تام با استفاده از کیت الیزا و غلظت آلبومین، بتالاکتوگلوبولین، آلفالاکتالبومین و ایمونوگلوبولین ها در سرم شیر به روش الکتروفورز استات سلولز و دانسیتومتری تعیین گردید. حسـاسیت، ویژگـی و نقطه برش هر پروتئین با استفاده از آنالیز راک محاسبه شد. میانگین و میانه غلظت آمیلوئید A شیر، آلبومین، آلفالاکتالبومین و ایمونوگلوبولین های سرم شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی به طور بسیار معناداری نسبت به گاوهای سالم بالاتر بود. غلظت آمیلوئید A شیر در نقطه برش ۱/۶ mg/L، بالاترین درستی بالینی و غلظت بتالاکتوگلوبولین سرم شیر در نقطه برش ۲۶۹۷/۵ mg/L، پایین ترین درستی بالینی را در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو دارا بود. درستی بالینی آلبومین و ایمونوگلوبولین های سرم شیر نیز بالا به دست آمد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که حساسیت و ویژگی و درستی بالینی آمیلوئید A شیر و برخی از پروتئین های سرم شیر نظیر آلبومین و ایمونوگلوبولین ها در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو بالا است و امکان دارد این اندازه گیری این بیومارکرها در آینده ای نزدیک جایگزین شمارش سلول های سوماتیک شود یا به عنوان یک آزمایش مکمل در کنار آن به کار رود تا با تشخیص زودهنگام ازخسارت های هنگفتی که این بیماری به صنعت گاو شیری که یکی از ارکان مهم اقتصاد هر کشور است می زند تا حد زیادی کاسته شود.

واژه های کلیدی: پروتئین های فاز حاد، بیومارکر، ورم پستان تحت بالینی، شیر، گاو

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 2(1)74-87, 2011

Determination of the diagnostic value of positive and negative acute phase proteins of the milk as new and reliable biomarkers in bovine subclinical mastitis

Shirazi-Beheshtiha, S.H.[1*] Rabbani, V.[2], Safi, S.[3], Bolourchi, M. [4], Ameri, M.[5]

1.Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

2. Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

3. Department of Clinical Pathology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

5. Department of Clinical Pathology, School of Veterinary Medicine, Iowa State University, USA - Pfizer Worldwide Research and Development, Groton, CT, USA

***Corresponding author:** hamed.beheshti@kiau.ac.ir*

Currently, somatic cell count (SCC) and bacterial culture is considered as the golden and ultimate standard methods for diagnosis of bovine subclinical mastitis. However, SCC has a low diagnostic accuracy. Therefore, for identification of infected animals new biomarkers with high diagnostic accuracy are needed. Acute phase proteins (APPs) are proteins that are increased (positive APPs) or decreased (negative APPs) in response to inflammation. The objective of this study was to determine the diagnostic value of the milk APPs for the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. A total of 90 clinically healthy cows were randomly selected. Of these, 52 cows were considered to have subclinical mastitis based on a SCC higher than 130 × 1000 cells/mL of milk and positive bacterial culture results of milk samples obtained from at least one of the quarters. Milk amyloid A (MAA) concentration was measured using a commercial ELISA kit and albumin, α-lactalbumin, β-lactoglobulin, and immunoglobulin (Ig) were measured in whey samples by using cellulose acetate electrophoresis. Diagnostic sensitivity and specificity and cutoff points for each test were determined via receiver-operating characteristics (ROC) analysis. Significant ($P < 0.001$) increases in the mean and median concentration of MAA, albumin, α-lactalbumin, and Ig were found in the milk samples collected from cows with subclinical mastitis. MAA was the most accurate test with a diagnostic sensitivity of 92.3% and specificity of 92.1% at cutoff point of > 1.6 mg/L. The results of this study showed that determination of MAA and some milk serum proteins such as albumin and immunoglobulins can be used as potential and reliable biomarkers for the diagnosis of bovine subclinical mastitis.

Keywords: Acute phase proteins, Biomarker, Subclinical mastitis, Milk, Bovine

مقدمه

ورم پستان، شایع ترین بیماری و از نظر اقتصادی بزرگترین مشکل و مهمترین بیماری در صنعت پرورش گاو شیری به شمار می آید (۴، ۲۴). در امریکا کاهش تولید ناشی از ورم پستان تحت بالینی، سالیانه در حدود یک ملیارد دلار (۱۱۰ دلار به ازای هر گاو) خسارت به صنعت شیری این کشور وارد می کند و طبق آماری دیگر ۷۰ درصد از موارد کاهش تولید شیر در گله مربوط به ورم پستان تحت بالینی است (۴، ۲۴). در ایران نیز هر چند آمار دقیقی در رتبه بندی و مقایسه خسارات ناشی از بیماری ها تاکنون منتشر نشده ولی به نظر می رسد که ورم پستان تحت بالینی در کنار بیماری های تولید مثل، لنگش و احتمالا برخی بیماری های شایع دیگر نظیر لوکوز و یون از مهمترین و خسارت بارترین بیماری هایی باشد که گله های شیری ما را تهدید می کند. اطلاعات ۹ سال اخیر (۸۷-۱۳۷۹) در بیش از ۳۴ گله صنعتی بزرگ، متوسط و کوچک در ایران نشان می دهد که میزان بروز ورم پستان بین ۲۵-۰/۵ درصد در هر ماه بوده است. افت تولید شیر تنها از ناحیه ورم پستان تحت بالینی در سال ۱۳۸۵ تقریبا ۱۵۰ هزار تن در سطح ملی تخمین زده شده است. (تقریبا ۴۲۰ کیلوگرم در هر دوره شیرواری) که بر پایه بهای خرید هر کیلوگرم شیر در سال ۱۳۸۵ (۲۸۰۰ ریال) تقریبا ۴۲۰ ملیارد ریال تخمین زده شده است (۴).

گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی به آسانی توسط دامپزشک و حتی دامدار تشخیص داده شده و تحت درمان مناسب قرار می گیرند. مشکل در موارد ورم پستان تحت بالینی است که علائم بالینی ندارند و مخفی و درمان نشده باقی می مانند. ورم پستان تحت بالینی در گاوهای شیری حائز اهمیت است به طوری که ۸۰-۷۰ درصد از خسارت های ناشی از تورم پستان مربوط به ورم پستان تحت بالینی است (۱، ۴، ۲۰، ۲۲). ورم پستان تحت بالینی می تواند موجب کاهش ۷۰ درصد در تولید شیر گله شود (۴، ۲۲، ۲۴). از این رو تشخیص به موقع آن به دو دلیل عمده دارای اهمیت اقتصادی است:

- مشکل بودن تشخیص بیماری: زیرا در این نوع ورم پستان وضع ظاهری شیر سالم و عادی به نظر می رسد و در شیر لخته وجود ندارد و در دام هیچ گونه علائم بیماری، تب، کاهش مصرف غذا و تورم و درد پستان به صورت ظاهری دیده نمی شود (۱، ۲۰، ۲۲).
- کاهش کمیت و کیفیت شیر و گسترش بیماری در بین گاوها: ورم پستان تحت بالینی باعث کاهش کمیت و کیفیت شیر می شود و خطر انتقال بیماری به گاوهای سالم نیز وجود دارد که عدم تشخیص به موقع این بیماری منجر به اپیدمی وسیع بیماری در گله و افزایش هزینه درمانی نیز می شود. به طوری که در بسیاری از گله های شیری به ازای هر یک گاو مبتلا به ورم پستان بالینی ۴۰-۱۵ راس گاو مبتلا به ورم پستان تحت بالینی وجود دارد(۱، ۴، ۲۰، ۲۲).

برای تشخیص ورم پستان تحت بالینی از روش های معمول زیر استفاده می شود:

- شمارش تعداد سلول های سوماتیک شیر: امروزه شمارش سلول های سوماتیک شیر به همراه کشت باکتریایی به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته می شوند (۱، ۲۰، ۲۲، ۲۵، ۲۶). اما باید به این نکته توجه کرد که این روش، فاقد ویژگی کافی است زیرا مقادیر بالای آن لزوما بیانگر ورم پستان نمی باشد. به عبارت دیگر تعداد سلول های سوماتیک علاوه بر التهاب پستان تحت تاثیر بسیاری عوامل دیگر نظیر تعداد دوره های شیرواری گاو، مرحله شیرواری، میزان تولید شیر، فصل، سن و نژاد گاو نیز قرار دارد (۱، ۲۳). از سوی دیگر برای اینکه این آزمایش به عنوان یک تست غربالگر در تشخیص کارتیه های آلوده در گله گاوهای شیری استفاده شود حساسیت کافی ندارد زیرا در مراحل ابتدایی التهاب پستان ممکن است هنوز تعداد سلول های سوماتیک افزایش نیافته باشد (۱، ۲۲، ۲۳).
- آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی: خطای این آزمایش بیش

از خطای آزمایش هدایت الکتریکی شیر است و به عنوان یک تست غربالگر در تشخیص کارتیه های آلوده در گله گاوهای شیری حساسیت کافی ندارد (۲۰، ۲۲). درجه بندی آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی در بین افراد آزمایش کننده مختلف متفاوت است یعنی از آنجایی که این روش، چشمی است هر فردی ممکن است برداشت خاص و گاها متفاوتی از نتیجه آزمایش داشته باشد. به علاوه گاهی ممکن است به دلیل تخریب لوکوسیت ها توسط توکسین میکروارگانیسم آلوده کننده، نتیجه آزمایش منفی باشد (۲۰، ۲۲).

- آزمایش های باکتریولوژیک: این آزمایش ها به دلیل پرهزینه و طولانی بودن نمی توانند به صورت روزمره و روتین به کار روند. اندازه گیری شاخص های التهابی به عنوان آزمایش های غربالگر برای تشخیص کارتیه های مبتلا به عفونت و انتخاب گاوهایی که نیاز به آزمایش های باکتریولوژیک بعدی دارند، ضروری است (۲۰، ۲۲).

- اندازه گیری هدایت الکتریکی شیر: دارای همبستگی زیادی با تعداد سلول های سوماتیک است اما از آنجایی که ورم پستان تنها فاکتور موثر بر محتوای یونی شیر نیست و به دلیل اینکه در برخی از دیگر بیماری ها نیز میزان هدایت الکتریکی شیر تغییر می کند، ارزش تشخیصی این آزمایش کاهش می یابد(۱۳، ۲۰، ۲۲). متخصصین فدراسیون ملی گاوهای شیری گزارش کردند که اندازه گیری میزان هدایت الکتریکی شیر در تشخیص ورم پستان بالینی و تحت بالینی چندان قابل اطمینان نمی باشد و مشخص شده ارزش پیش بینی کنندگی این روش ضعیف است (۲۰). از طرفی، دیگر آزمایش های غربالگر شیر نظیر شمارش سلول های پیکری و آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی بسیار مفیدتر از بررسی تغییرات میزان هدایت الکتریکی شیر است (۲۰).

- تعیین میزان فعالیت آنزیم های شیر: برخی از آنزیم های شیر در التهاب پستان افزایش می یابند که مهمترین آنها NAGase است. میزان فعالیت این آنزیم در شیر، همبستگی زیادی با تعداد سلول های سوماتیک شیر دارد و فعالیت آن در ورم پستان های حاصل از عوامل پاتوژن اصلی به طور قابل ملاحظه ای نسبت به ورم پستان های حاصل از عوامل پاتوژن غیر اصلی بیشتر است (۲۰). در موارد ورم پستان تحت بالینی در اوایل دوره شیردهی فعالیت آنزیم NAGase شیر بالا است و به سمت انتهای شیردهی باز هم افزایش جزئی در میزان فعالیت این آنزیم رخ می دهد اما در کارتیه های طبیعی ۱۵ روز پس از زایش میزان فعالیت NAGase بیشتر از حد طبیعی است (۲۰). تعیین میزان فعالیت آنزیم های شیر دارای پتانسیل تشخیصی برای ورم پستان بالینی است ولی در مورد مفید بودن آن در تشخیص ورم پستان تحت بالینی به عنوان یک آزمایش غربالگر مدارک مستند کمی وجود دارد.

- اندازه گیری لاکتوز شیر: بحث هایی در زمینه امکان اندازه گیری لاکتوز همراه با چربی و پروتئین به طور روزمره در سیستم های مدیریتی گله وجود دارد اما آزمایش های بیشتری در زمینه مفید بودن لاکتوز به عنوان یک آزمایش غربالگر باید انجام شود(۲۰).

- اندازه گیری پلاسمین: در سطح زیادی کاربردی نیست و در مورد حساسیت و ویژگی آن اطلاعات زیادی وجود ندارد (۲۰).

اخیرا تلاش های زیادی به منظور پیدا کردن روش های جایگزین مناسب برای شمارش سلول های سوماتیک (استاندارد طلایی تشخیص ورم پستان تحت بالینی) صورت پذیرفته است از این رو اندازه گیری غلظت پروتئین های فاز حاد در بررسی و مدیریت سلامت حیوان مورد توجه فراوان قرار گرفته است. پروتئین های فاز حاد شاخص های سریع و حساسی بوده و می توانند اطلاعات ارزشمندی را در خصوص وسعت آسیب در حال پیشرفت و ارزیابی درمانی بدهد. با استفاده از اطلاعات به دست آمده از بالا بودن غلظت پروتئین های فاز حاد در موارد شیوع عفونت های بالینی و تحت بالینی در حال پیشرفت بسته به شدت و مدت پاسخ مرحله حاد می توان شدت عفونت را پیش بینی کرد

(۱، ۵، ۱۶، ۲۰، ۲۲).

آمیلوئید A، پروتئین فاز حاد مثبت اصلی در گاو است که به طور عمده در کبد تولید می شود (۵). این پروتئین همچنین توسط غده پستان نیز ساخته می شود و بنابراین در شیر گاوهای سالم در غلظت های بسیار پایین حضور دارد (۱، ۱۵، ۱۹). مشخص شده که سنتز داخل پستانی آمیلوئید A شیر در پاسخ به التهاب پستان افزایش می یابد (۱۵). از این رو آمیلوئید A شیر به عنوان یک بیومارکر حساس در تشخیص ورم پستان تحت بالینی (۶، ۱۹) و ارزیابی کیفیت شیر (۱، ۲۹) مطرح شده است. آلبومین سرم جزء پروتئین های فاز حاد منفی است به طوری که در طی واکنش فاز حاد میزان آن کاهش می یابد اما در شیر جزء پروتئین های فاز حاد مثبت است به طوری که مشخص شده غلظت آن به طور معنی داری در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی نسبت به گاوهای سالم افزایش می یابد (۱۱، ۲۱). به علاوه مشخص شده که آلبومین سنتز خارج کبدی نیز دارد به طوری که توسط سلول های اپی تلیال غده پستان نیز ساخته می شود و این سنتز در موارد التهاب غده پستان افزایش می یابد (۲۵). بنابراین اندازه گیری آلبومین شیر ممکن است به عنوان یک ابزار کمکی و یک مارکر ارزشمند در تشخیص ورم پستان تحت بالینی به کار رود. آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین پروتئین های اختصاصی شیر هستند که غلظت آنها در شیر در طی ورم پستان کاهش می یابد بنابراین می توان آنها را به عنوان یک پروتئین فاز حاد منفی در شیر قلمداد کرد (۱۱، ۲۱). در خصوص ارزش تشخیصی این پروتئین ها در ورم پستان تحت بالینی اطلاعاتی در دسترس نیست.

ایمونوگلوبولین ها اجزای اصلی سیستم ایمنی اکتسابی شیر گاو محسوب می شوند. فراوان ترین ایمونوگلوبولین موجود در شیر گاو، IgG1 است. سایر کلاس های ایمونوگلوبولین نظیر IgG2، IgA و IgM نیز با غلظت های پایین در شیر گاو حضور دارند (۲، ۲۷). در ورم پستان به دلیل افزایش نفوذپذیری سد خونی- شیری، ایمونوگلوبولین ها از سرم به داخل شیر نشت می کنند (۱۳).

لازم به ذکر است که در مقایسه بین سنجش پروتئین های فاز حاد در سرم و شیر به دلیل این که می توان تعداد زیادی نمونه شیر با استرس کمتر به دست آورد، شیر بر سرم برتری دارد (۲۲).

اگرچه آمیلوئید A شیر به عنوان یک بیومارکر مفید در تشخیص ورم پستان تحت بالینی معرفی شده است (۸، ۹، ۲۲) اما در خصوص ارزش سایر پروتئین های فاز حاد شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو اطلاعاتی در دسترس نیست. هدف از مطالعه تعیین ارزش تشخیصی پروتئین های فاز حاد مثبت (آمیلوئید A، آلبومین، آلفالاکتالبومین و ایمونوگلوبولین ها) و منفی (بتالاکتوگلوبولین) شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو است.

مواد و روش کار

نحوه انتخاب حیوانات و نمونه گیری شیر: تعداد ۹۰ راس گاو نژاد هلشتاین به طور تصادفی از ۵ گاوداری صنعتی استان تهران انتخاب شدند. گاوهای مورد مطالعه در دوره شیرواری به سر می بردند و سه مرتبه در روز با استفاده از ماشین شیردوشی مورد دوشش قرار می گرفتند. قبل از نمونه گیری، بر روی هر گاو معاینات بالینی کامل از لحاظ ضربان قلب، درجه حرارت بدن، تعداد حرکات تنفسی، چگونگی صداهای تنفسی و سلامت ظاهری پستان و شیر به عمل آمد. گاوهایی به منظور نمونه گیری انتخاب شدند که فاقد هر گونه علائم بالینی دال بر بیماری بوده و در ملامسه پستان و مشاهده شیر هیچ گونه اختلالی را نشان ندهند. به علاوه گاوهایی که در اواخر دوران آبستنی و اوایل دوران شیرواری بودند نیز در این مطالعه وارد نشدند. لازم به ذکر است تمامی گاوهای مورد مطالعه از سیلوی ذرت، کنسانتره و کاه و یونجه تغذیه می شدند.

قبل از دوشش ظهر، از هرگاو پس از ضدعفونی کردن سر

پستانک ها هفت مرتبه با الکل ۷۰ درصد و دور ریختن ۳ دوشش اولیه، ۴ نمونه شیر (از هر کارتیه ۱ نمونه) گرفته شد و تحت آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی (CMT) قرار گرفت. گاوهایی که CMT هر ۴ کارتیه آنها منفی بود در گروه گاوهایی که احتمالا سالم هستند و گاوهایی که CMT یکی از کارتیه های آنها مثبت بود در گروه گاوهایی که احتمالا مبتلا به ورم پستان تحت بالینی هستند، قرار گرفتند. در گاوهایی که CMT شیر هر ۴ کارتیه آنها منفی بود، شیر هر ۴ کارتیه و در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی شیر کارتیه مبتلا تحت شرایط استریل اخذ گردید و به سرعت مورد آنالیز شمارش سلول های سوماتیک و کشت باکتریایی قرار گرفت. گاوهایی که شمارش سلول های سوماتیک شیر هر ۴ کارتیه آنها کمتر از cells/mL ۱۰۰۰×۱۳۰ و کشت باکتریایی آنها منفی بود به عنوان گاوهای سالم و گاوهایی که شمارش سلول های سوماتیک شیر حداقل یک کارتیه آنها بیشتر از cells/mL ۱۰۰۰×۱۳۰ و کشت باکتریایی آن مثبت بود به عنوان گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته شدند. هولداوی و همکاران در سال ۱۹۹۶ و صافی و همکاران در سال ۲۰۰۹، نقطه برشcells/mL ۱۰۰۰×۱۳۰ برای سلول های سوماتیک را به منظور تفکیک گاوهای سالم از گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی پیشنهاد کردند (۱۰) که در مطالعه حاضر نیز نقطه برش مذکور در نظر گرفته شد.

در گاوهای سالم، شیر هر ۴ کارتیه با یکدیگر مخلوط و به عنوان یک نمونه در نظر گرفته شد. هر یک از نمونه های شیر به منظور انجام آنالیزهای بعدی به ۲ قسمت تقسیم شدند. قسمت اول بدون تغییر(شیر تام) به مدت ۲۰ روز در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد فریز شد تا بعدا غلظت آمیلوئید A در آن اندازه گیری شود. قسمت دوم نمونه ها تحت عملیات جداسازی سرم شیر و تغلیظ قرار گرفت. سپس به مدت ۲۰ روز در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد فریز شد تا بعدا غلظت آلبومین، بتالاکتوگلوبولین، آلفالاکتالبومین و ایمونوگلوبولین ها در آن اندازه گیری شود.

آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی، شمارش سلول های سوماتیک (SCC) و کشت شیر: آزمایش CMT در فارم با استفاده از معرف های آماده تجاری انجام شد (Shirazma Co.,Noor, Iran). شمارش سلول های پیکری در همان نمونه های شیر با استفاده از دستگاه Fossomatic 90 analyzer (Foss electric., Hillerod, Denmark) انجام پذیرفت. کشت نمونه های شیر با استفاده از محیط آگار خون دار و مک کانکی آگار و محیط های کشت افتراقی مربوطه بر طبق استانداردهای موسسه ملی ورم پستان انجام گرفت (۱۸).

اندازه گیری غلظت آمیلوئید A شیر: غلظت آمیلوئید A شیر با استفاده از کیت الیزا تعیین گردید.

(Mast ID RANGE Milk Amyloid A Assay.,Tridelta Development Ltd., Wicklow, Ireland.)

نمونه های شیر تام در ابتدا با استفاده از بافر رقیق کننده به نسبت ۱:۵۰ رقیق شدند. نمونه هایی که چگالی نوری آنها بالاتر از محدوده خط استاندارد بود، بیشتر رقیق شده و مجددا مورد آزمایش قرار گرفتند. بر طبق اعلام شرکت سازنده کیت، محدوده تشخیصی (LOD) الیزا برای آمیلوئید A شیر، mg/L 0.1 بود.

جداسازی سرم شیر: شیر تام به مدت ۲۰ دقیقه در g×۱۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد و شیر بدون چربی جدا گردید. سپس pH نمونه با استفاده از اسید کلریدریک ۱ نرمال به ۴/۶ (pH ایزوالکتریک کازئین) رسانده شد. به منظور رسوب کازئین و جداسازی سرم شیر، نمونه به مدت ۲۰ دقیقه در g×۲۰۰۰ و دمای اتاق سانتریفوژ شد. در نهایت پس از رسوب کازئین، سرم شیر جدا و با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر شد (۳، ۱۱).

تغلیظ سرم شیر: نمونه های سرم شیر به روش دیالیز در مقابل پلی اتیلن گلیکول تغلیظ گردید. کیسه دیالیز مورد استفاده دارای نقطه برش ۱۰ کیلودالتن (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) و مدت

زمان دیالیز، ۸ ساعت بود. در انتها جواب نهایی بر فاکتور غلظت هر نمونه تقسیم و به صورت mg/L گزارش شد.

اندازه گیری توتال پروتئین سرم شیر: توتال پروتئین سرم شیر به روش بیوره و بر طبق پروتکل جانسون و همکاران اندازه گیری شد (۱۲).

اندازه گیری غلظت پروتئین های سرم شیر: غلظت آلبومین، بتالاکتوگلوبولین، آلفالاکتالبومین و ایمونوگلوبولین ها به روش الکتروفورز استات سلولز و با اصلاح پروتکل بل و همکاران اندازه گیری شد (۳). سیستم الکتروفورز مورد استفاده Helena بود (Helena Laboratories., Beaumont, Texas, USA). پس از اتمام الکتروفورز، رنگ آمیزی و شفاف سازی کاغذ استات سلولز، باندهای جداشده به منظور تعیین فراکسیون آلبومین، بتالاکتوگلوبولین، آلفالاکتالبومین و ایمونوگلوبولین ها در نمونه، در طول موج ۵۲۵ نانومتر دانسیتومتری گردید. (Helena Laboratories., Beaumont, Texas, USA). در نهایت غلظت پروتئین های سرم شیر با ضرب کردن فراکسیون های مربوطه در غلظت توتال پروتئین محاسبه گردید و به صورت mg/L گزارش شد.

آنالیز آماری: در ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف یک نمونه ای مشخص شد که توزیع داده ها نرمال نیست بنابراین به منظور مقایسه نتایج تعداد سلول های سوماتیک، غلظت آمیلوئید A شیر و پروتئین های سرم شیر بین گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی ازآزمون من ویتنی استفاده شد. آنالیز راک نیز به منظور مقایسه کارایی هر تست با در نظر گرفتن شمارش سلول های سوماتیک و کشت باکتریایی شیر به عنوان استاندارد طلایی انجام پذیرفت. منحنی راک، مقادیر مثبت حقیقی (حساسیت) و مثبت کاذب (ویژگی) را در تمام نقاط برش ممکن نشان داد. سطح زیر منحنی به منظور ارزیابی کارایی هر تست مورد استفاده قرار گرفت به طوری که سطح زیر منحنی بین ۰/۵–۰/۷ بیانگر درستی بالینی پایین، سطح زیر منحنی بین ۰/۷–۰/۹ بیانگر درستی بالینی متوسط و سطح زیر منحنی بالاتر از ۰/۹ نشاندهنده درستی بالینی بالا برای هر تست تشخیصی بود (۷). نقاط برش برای غلظت آمیلوئید A شیر و پروتئین های سرم شیر به منظور حصول حساسیت و ویژگی بالا (تقریبا ۹۰ درصد) برای تشخیص گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و جلوگیری از مصرف بی رویه آنتی بیوتیک در درمان گاوهای سالم انتخاب گردید. سطح زیر منحنی تست های انجام شده دو به دو با مقایسه آماری مقادیر حساسیت و ویژگی هر تست در نقطه برش به دست آمده به وسیله آزمون مک نمار در سطح معناداری Alpha=0.05 مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

از ۹۰ راس گاو هلشتاین انتخاب شده در این مطالعه، ۳۸ راس، سالم و ۵۲ راس، مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بود (بر پایه نتایج شمارش سلول های سوماتیک و کشت باکتریایی شیر). در ۵۲ نمونه شیر مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، استافیلوکوکوس اورئوس از ۱۹ نمونه و استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استرپتوکوکوس یوبریس و کورینه باکتریوم بوویس هر کدام از ۱۱ نمونه جدا شدند.

نتایج مربوط به آمیلوئید A شیر و پروتئین های سرم شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در جدول ۱ آورده شده است. میانگین و میانه غلظت آمیلوئید A شیر، آلبومین، آلفالاکتالبومین و ایمونوگلوبولین های سرم شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی به طور بسیار معناداری نسبت به گاوهای سالم بالاتر بود (P<۰/۰۰۱). اگر چه کاهش معناداری در غلظت بتالاکتوگلوبولین سرم شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در مقایسه با گاوهای سالم مشاهده نشد (P/۱۹۳=۰) ولی میانگین و میانه غلظت این پروتئین در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اندکی نسبت به گاوهای سالم پایین تر بود (جدول ۱). لازم به توضیح است که هیچ یک از نتایج مربوط به آمیلوئید A شیر پایین تر از محدوده تشخیصی (LOD) کیت نبود.

جدول۱- آمار توصیفی برای آمیلوئید A شیر و پروتئین های سرم شیر در گاوهای هلشتاین سالم (n=38) و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی (n=52)

آنالیت	تعداد سلول های سوماتیک (×۱۰۰۰ cells/mL) و کشت میکروبی شیر	میانگین±انحراف معیار	میانه	حداقل- حداکثر	*P-Value
آمیلوئید A شیر (mg/L)	<۱۳۰ –	۰/۶۱±۰/۵	۰/۴۴	۰/۱-۱/۹	<۰/۰۰۱
	>۱۳۰ +	۱۲/۸۳±۱۲/۸	۷/۸۸	۰/۸۴-۵۰/۵	
آلبومین سرم شیر (mg/L)	<۱۳۰ –	۲۴۴/۳۳±۱۶۷	۲۰۸/۶	۷۷/۴-۹۵۲/۵	<۰/۰۰۱
	>۱۳۰ +	۶۸۲±۳۱۰/۹	۶۳۵/۸	۱۸۸/۵-۱۵۶۶/۴	
بتالاکتوگلوبولین سرم شیر (mg/L)	<۱۳۰ –	۲۶۷۹/۳۱±۴۵۷/۲	۲۶۸۶/۶	۱۹۳۳-۳۸۸۸	۰/۱۹۳
	>۱۳۰ +	۲۵۶۶/۱±۲۹۷	۲۶۱۱/۲	۱۸۲۷/۵-۲۹۷۴/۴	
آلفالاکتالبومین سرم شیر (mg/L)	<۱۳۰ –	۱۷۶۷/۲۴±۳۷۸/۷	۱۷۳۶/۵	۱۰۲۰-۲۵۱۲/۵	<۰/۰۰۱
	>۱۳۰ +	۲۲۵۷/۱۸±۴۸	۲۱۸۶/۶	۱۵۴۰-۳۴۱۱	
ایمونوگلوبولین های سرم شیر (mg/L)	<۱۳۰ –	۶۹۰/۸۷±۳۸۲/۳	۵۳۲	۳۰۸/۲-۱۸۱۵	<۰/۰۰۱
	>۱۳۰ +	۱۹۵۳/۰۹±۸۴۹	۱۹۰۴/۲	۴۲۳/۴-۳۶۸۹	

*آزمون من ویتنی بین گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی

حساسیت، ویژگی، درستی بالینی (سطح زیر منحنی) و نقطه برش پروتئین های فاز حاد شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو در جدول ۲ به نمایش در آمده است. غلظت آمیلوئید A شیر در نقطه برش ۱/۶ mg/L، بالاترین درستی بالینی و غلظت بتالاکتوگلوبولین سرم شیر در نقطه برش ۲۶۹۷/۵ mg/L، پایین ترین درستی بالینی را در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو دارا بود. آزمون مک نمار نشان داد که سطح زیر منحنی (درستی بالینی) آمیلوئید A شیر، آلبومین و ایمونوگلوبولین های سرم شیر به طور معناداری از سطح زیر منحنی آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین سرم شیر بزرگ تر بود (P<۰/۰۵) (جدول ۲).

جدول۲- نقاط برش پیشنهادی، حساسیت، ویژگی و درستی بالینی (سطح زیر منحنی) آمیلوئید A شیر و پروتئین های سرم شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو بر پایه نتایج شمارش سلول های سوماتیک و کشت باکتریایی شیر (نقطه برش تعداد سلول های سوماتیک، cells/mL ۱۰۰۰×۱۳۰ در نظر گرفته شد)

آنالیت	نقطه برش	حساسیت (با محدوده اطمینان ۹۵٪)	ویژگی (با محدوده اطمینان ۹۵٪)	درستی بالینی یا سطح زیر منحنی (با محدوده اطمینان ۹۵٪)
آمیلوئید A شیر (mg/L)	>۱/۶	۹۲/۳	۹۲/۱	۰/۹۷۸*a,b
آلبومین سرم شیر (mg/L)	>۳۷۵/۳	۸۸/۵	۸۶/۸	۰/۹۳۱ a,c
بتالاکتوگلوبولین سرم شیر (mg/L)	<۲۶۹۷/۵	۵۰	۶۸/۴	۰/۵۷۷ f
آلفالاکتالبومین سرم شیر (mg/L)	>۱۹۸۵/۴	۶۵/۴	۷۱/۱	۰/۷۸۳ e
ایمونوگلوبولین های سرم شیر(mg/L)	>۸۱۴/۳	۹۲/۳	۷۸/۹	۰/۹۲۹ a,d

* آنالیت هایی که دارای حروف مشابه در بالای خود هستند نسبت به یکدیگر، تفاوت معناداری ندارند (آزمون مک نمار)

بحث و نتیجه گیری

نتایج باکتریولوژیک گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی این مطالعه نشان دهنده باکتری های معمولی است که به طور رایج از شیر کارتیه گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی ایران جدا می شود. ورم پستان واگیردار عمدتا توسط چهار باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، کورینه باکتریوم بوویس و مایکوپلاسما بوویس رخ می دهد و چهره غالب آن عمدتا تحت بالینی است (۴). در مطالعه حاضر شاخص ترین باکتری جدا شده از نمونه های ورم پستان تحت بالینی، استافیلوکوکوس اورئوس بود که مهمترین عامل باکتریایی ورم پستان گاو است. بر طبق گزارش بلورچی و همکاران، شیوع ورم پستان تحت بالینی در یک گله گاو شیری ایران، دارای ۶۸۰ راس گاو نژاد هلشتاین، ۲۳/۷۶% و پاتوژن غالب گله، استافیلوکوکوس اورئوس بود (۴). با توجه به گزارش های متعدد بلورچی و کسروی، هر ۴ پاتوژن مسبب ورم پستان واگیردار در گله های شیری کشور حضور دارند. بر اساس توصیه فدراسیون بین المللی شیر و موسسه ملی ورم پستان، شمارش سلول های سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی بیان شده است اما امروزه مشخص شده که ویژگی این آزمایش در تشخیص کارتیه های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی پایین است زیرا مقادیر بالای آن لزوما بیانگر ورم پستان نمی باشد. به عبارت دیگر تعداد سلول های سوماتیک علاوه بر التهاب پستان تحت تاثیر بسیاری عوامل دیگر نظیر تعداد دوره های شیرواری گاو، مرحله شیرواری، میزان تولید شیر، فصل، سن و نژاد گاو نیز قرار دارد (۱، ۲۳). از سوی دیگر برای اینکه این آزمایش به عنوان یک تست غربالگر در تشخیص کارتیه های آلوده در گله گاوهای شیری استفاده شود حساسیت کافی نیز ندارد زیرا در مراحل ابتدایی التهاب پستان ممکن است هنوز تعداد سلول های سوماتیک افزایش نیافته باشد (۱، ۲۲، ۲۳). پیورالا در سال ۲۰۰۳ عنوان داشت که امروزه روش های رایج تشخیصی نظیر شمارش سلول های سوماتیک و آزمون های میکروبی در تشخیص ورم پستان به خصوص فرم تحت بالینی کارایی کافی ندارند (۲۰). از طرفی آزمایش های باکتریولوژیک به عنوان یک تست روتین در تشخیص ورم پستان تحت بالینی به دلیل پرهزینه و وقت گیر بودن مناسب نیستند. بنابراین در تشخیص ورم پستان تحت بالینی نیاز به بیومارکرهای جدید است.

تست های غیر مستقیم ورم پستان در انتخاب و تشخیص گاوهای مبتلا به عفونت های داخل پستانی مناسب تر هستند. ورم پستان بر ترکیب شیر تاثیرگذار است به طوری که التهاب غده پستان موجب بروز تغییرات متنوعی در ترکیبات شیر می شود. این امر به دلیل تاثیرات موضعی، نشت برخی ترکیبات از خون به داخل شیر و خروج برخی از ترکیبات طبیعی شیر از فضای (لومن) آلوئولی و ورود آنها به فضای اطراف عروقی است (۲۰). شدت این تغییرات به عامل عفونی و پاسخ التهابی بستگی دارد. پروتئین های فاز حاد، کاندید های مناسبی برای تشخیص و پایش ورم پستان هستند (۱۶، ۲۰). گرونلوند و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند در گاوهای مبتلا به ورم پستان استافیلوکوکی، آمیلوئید A به سرعت در سرم و شیر افزایش می یابد. اکرسال و همکاران در سال ۲۰۰۱، مک دونالد و همکاران در سال ۲۰۰۱ و لارسون و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند، غلظت آمیلوئید A در سرم و شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان بیش از گاوهای مبتلا به التهاب های خارج پستان است که این امر می تواند به دلیل سنتز داخل پستانی SAA3 باشد (۶، ۱۴، ۱۵).

در مطالعه حاضر، درستی بالینی آمیلوئید A شیر و پروتئین های سرم شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو با در نظر گرفتن شمارش سلول های سوماتیک و کشت باکتریایی شیر به عنوان استاندارد طلایی تشخیص این بیماری تعیین گردید. غلظت آمیلوئید A شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی به طور بسیار معناداری نسبت به گاوهای سالم بالاتر بود ($P<۰/۰۰۱$) که این یافته با نتایج تحقیق سایر محققین همخوانی دارد (۸، ۹، ۲۲). افزایش غلظت آمیلوئید A شیر در مبتلایان به ورم پستان تحت بالینی به دلیل ماهیت التهابی ورم پستان است که منجر به تولید سیتوکین های پیش التهابی نظیر اینترلوکین های ۱ و ۶ و فاکتور نکروز بافتی آلفا (TNF-α) می شود. این سیتوکین ها موجب افزایش سنتز پروتئین های مثبت فاز حاد نظیر آمیلوئید A در کبد می شود (۵). به علاوه ثابت شده که آمیلوئید A سنتز داخل پستانی نیز دارد به طوری که این سنتز در پاسخ به التهاب بافت پستان به چندین برابر افزایش می یابد (۶، ۱۵). اکرسال و همکاران در سال ۲۰۰۱، مک دونالد و همکاران در سال ۲۰۰۱ و لارسون و همکاران در سال ۲۰۰۵ عنوان کردند که آمیلوئید A، سنتز داخل پستانی دارد و این سنتز در التهاب غده پستان افزایش می یابد بنابراین افزایش غلظت این پروتئین فاز حاد در شیر تنها بیانگر حضور یک روند التهابی در غده پستان است لذا از اندازه گیری آن در شیر می توان به عنوان یک شاخص تشخیصی زودهنگام در ورم پستان استفاده نمود (۶، ۱۴، ۱۵). در این مطالعه، غلظت سرمی آمیلوئید A تعیین نگردید. زیرا در مقایسه بین سنجش پروتئین های فاز حاد در سرم و شیر به دلیل این که می توان تعداد زیادی نمونه شیر با استرس کمتر به دست آورد، نمونه شیر بر سرم برتری دارد (۲۲). به علاوه ویژگی اندازه گیری پروتئین های فاز حاد در سرم بسیار پایین است زیرا با افزایش غلظت سرمی این پروتئین ها تنها می توان به وجود التهاب پی برد ولی نمی توان نوع التهاب را مشخص کرد (۵).

میانگین غلظت آمیلوئید A شیر در گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی نسبت به میانگین های گزارش شده توسط اکثر محققین تفاوت قابل توجهی دارد (پایین تر است) (۲۲) ولی به میانگین گزارش شده توسط گرادی و همکاران نزدیک است (۸). گرادی و همکاران در سال ۲۰۰۹ با در نظر گرفتن نقطه برش cells/ml ۱۵۰،۰۰۰ برای سلول های سوماتیک، میانگین غلظت آمیلوئید A شیر در گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی را به ترتیب ۰/۱ و ۵/۵ میلی گرم در لیتر گزارش کردند (۸). صافی و همکاران در سال ۲۰۰۹ با در نظر گرفتن نقطه برش cells/ml ۱۳۰،۰۰۰ برای سلول های سوماتیک، به این نتیجه رسیدند که میانگین غلظت آمیلوئید A در شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی به ترتیب ۹ و ۶۷ میلی گرم در لیتر است (۲۲). این تفاوت و تنوع در گزارش های مختلف می

تواند به دلیل تفاوت های بیولوژیک گاوها، تفاوت در شدت (پاتوژنیسیته) و نوع عامل مسبب ورم پستان تحت بالینی، تفاوت در روش های اندازه گیری و در نظر گرفتن نقاط برش مختلف برای تعداد سلول های سوماتیک (استاندارد طلایی تشخیص ورم پستان تحت بالینی) در مطالعات مختلف باشد. نکته قابل توجه دیگر آن که در مطالعه حاضر، برای اندازه گیری غلظت آمیلوئید A شیر از کیتی استفاده شد که تنها ایزوفرم پستانی این پروتئین را اندازه می گیرد که این امر پایین تر بودن میانگین غلظت آمیلوئید A شیر در گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی این مطالعه را نسبت به برخی مطالعات دیگر که در آنها از کیتی استفاده شده که هر دو ایزوفرم پستانی و سرمی (کبدی) این پروتئین را اندازه می گیرند، توجیه می کند.

در مطالعه حاضر، آمیلوئید A شیر در نقطه برش ۱/۶ mg/L، بالاترین حساسیت (۹۲/۳%)، ویژگی (۹۲/۱%) و درستی بالینی (۰/۹۷۸) را در تشخیص ورم پستان تحت بالینی از خود نشان داد. صافی و همکاران در سال ۲۰۰۹ در بین پروتئین های فاز حاد بر اساس کشت باکتریایی بیشترین حساسیت، ویژگی و درستی بالینی را آزمایش تعیین غلظت آمیلوئید A شیر در تشخیص گاوهای سالم از گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی عنوان کردند. به علاوه خاطر نشان کردند که در این حالت حساسیت سنجش غلظت آمیلوئید A شیر ۹۰/۶ درصد در نقطه برش mg/L ۱۶/۴ می باشد و این آزمایش دارای ۱/۷ درصد موارد مثبت کاذب و ۹/۶ درصد موارد منفی کاذب است (۲۲).

در این مطالعه، میانگین و میانه غلظت آلبومین و ایمونوگلوبولین ها در سرم شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی به طور معناداری نسبت به سرم شیرگاوهای سالم بیشتر بود که این امر با گزارش های سایر محققین همخوانی داشت (۱۱، ۱۷، ۲۱). افزایش غلظت آلبومین و ایمونوگلوبولین های سرم شیر در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی می تواند به دلیل تخریب سد خونی شیری در پاسخ به التهاب پستان و نشت این پروتئین ها از خون به شیر (۱۱)، افزایش نفوذ پذیری عروق پستان در اثر التهاب (۱۳)، افزایش نفوذ لوکوسیت ها به بافت پستان در پاسخ به التهاب که موجب کاهش تمامیت (استحکام) تایت جانکشن های پستان و افزایش تبادلات بین خون و شیر (۱۱، ۱۳) و افزایش سنتز داخل پستانی آلبومین در پاسخ به التهاب باشد (۲۵). شامای و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که در گاوهای مبتلا به ورم پستان، بیان mRNA آلبومین در غده پستان و ترشح آلبومین توسط سلول های اپیتلیال بافت پستان به ترتیب ۴ و ۳/۵ افزایش می یابد (۲۵) بنابراین آلبومین شیر یک پروتئین فاز حاد مثبت است. افزایش شدید و قابل توجه آلبومین سرم شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در این مطالعه نیز موید این نکته است که منبع اصلی افزایش آلبومین سرم شیر در این شرایط خود غده پستان است.

نکته دیگر آنکه درستی بالینی آلبومین و ایمونوگلوبولین های سرم شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو بالا بود. میانگین و میانه غلظت آلفالاکتالبومین سرم شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی به طور بسیار معناداری نسبت به گاوهای سالم بالاتر بود (P<۰/۰۰۱). اگر چه کاهش معناداری در غلظت بتالاکتوگلوبولین سرم شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در مقایسه با گاوهای سالم مشاهده نشد (=۰P/۱۹۳) ولی میانگین و میانه غلظت این پروتئین در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اندکی نسبت به گاوهای سالم پایین تر بود. تغییرات غلظت آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین سرم شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در مطالعات محققین مختلف تا حدی متناقض است. اکثر محققین گزارش کردند که غلظت بتالاکتوگلوبولین سرم شیر در طی ورم پستان، کاهش می یابد (۱۱، ۱۳، ۲۱). بنابراین بتالاکتوگلوبولین را می توان پروتئین فاز حاد منفی شیر در نظر گرفت. ناگاساوا و تاناهاشی در سال ۱۹۶۳ عنوان کردند که غلظت بتالاکتوگلوبولین در سرم

شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان، تغییری نمی کند (۱۷). ویت و بلکبورن در سال ۱۹۶۳ نشان دادند که در گاوهای مبتلا به ورم پستان، غلظت آلفالاکتالبومین سرم شیر به شدت افزایش می یابد (۲۸) که این یافته با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد در حالی که برخی از محققین کاهش غلظت این پروتئین را در سرم شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی گزارش کردند (۱۱، ۲۹). ویکستروم در پایان تحقیق خود اعلام می دارد که مطالعات بیشتری می بایست بر روی آلفالاکتالبومین صورت پذیرد زیرا مکانیسم هایی که در ایجاد تغییر و تنوع در غلظت این پروتئین درشیردخیلند، هنوز شناخته نشده اند (۲۹). این تنوع در تغییر غلظت آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین سرم شیر در مطالعات مختلف می تواند به دلیل تفاوت در روش های اندازه گیری این پروتئین ها، شدت ورم پستان، نوع پاتوژن مسبب ورم پستان و پاسخ های بیولوژیک حیوان باشد.

نکته دیگر آنکه درستی بالینی آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین سرم شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو به ترتیب متوسط و پایین بود. با توجه به اطلاعات نویسندگان این مقاله، تاکنون در خصوص حساسیت، ویژگی، درستی بالینی و نقطه برش پروتئین های سرم شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو تحقیقی در دنیا صورت نگرفته است و تحقیق حاضر از این نظر منحصر به فرد است. اکراشتات در سال ۲۰۰۸ گزارش کرد شمارش سلول های سوماتیک در تشخیص کوارترهای آلوده فاقد حساسیت ویژگی کافی است بنابراین در تشخیص ورم پستان تحت بالینی نیاز به بیومارکرهای جدید است (۱). تنها مشکل استفاده از پروتئین های فاز حاد در تشخیص ورم پستان تحت بالینی، هزینه بر بودن آنها است که امروزه مطالعاتی بر روی طراحی روش های ساده، سریع و حساس جهت اندازه گیری پروتئین های فاز حاد شیر گاو در حال انجام است (نظیر طراحی نانوسنسورها) تا بتوان این اندازه گیری را با هزینه بسیار پایین در سطح فارم نیز انجام داد. با توجه به حساسیت و ویژگی بالای آمیلوئید A شیر و برخی از پروتئین های سرم شیر نظیر آلبومین و ایمونوگلوبولین ها در تشخیص ورم پستان تحت بالینی (درستی بالینی پروتئین های مذکور از استاندارد طلایی تشخیص این بیماری یعنی شمارش سلول های سوماتیک نیز به مراتب بالاتر است) امکان دارد اندازه گیری این بیومارکرها در آینده ای نزدیک جایگزین شمارش سلول های سوماتیک شود یا به عنوان یک آزمایش مکمل در کنار آن به کار رود تا با تشخیص زودهنگام ازخسارت های هنگفتی که این بیماری به صنعت گاو شیری که یکی از ارکان مهم اقتصاد هر کشور است می زند تا حد زیادی کاسته شود. البته برای اثبات این موضوع نیاز است تحقیقات بیشتری بر روی پتانسیل پروتئین های سرم شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی صورت پذیرد.

References

1- Åkerstedt, M., Persson Waller, K., Bach Larsen, L., Forsbäck, L., Sternesjö, Å. (2008) Relationship between haptoglobin and serum amyloid A in milk and milk quality. Int. Dairy J, 18:669-674

2- Barrington, G.M., Besser, T.E., Davis, W.C., Gay, C.C., Reeves, J.J., McFadden, T.B. (1997) Expression of immunoglobulin G1 receptors by bovine mammary epithelial cells and mammary leukocytes. J Dairy Sci., 80:86-93

3- Bell, J.W., Stone, W.K. (1978) Rapid separation of whey proteins by cellulose acetate electrophoresis. J Dairy Sci., 62:502-504

4- Bolourchi, M., Mokhber Dezfouli, M.R., Kasravi, R., Moghimi Esfandabadi, A., Hovareshti, P. (2008) An estimation of national average of milk somatic cell count and production losses due to subclinical mastitis in commercial dairy herds in Iran. J Vet. Res., 63: 263-266.

5- Eckersall, P.D. (2008) Proteins, proteomics and

dysproteinemias. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds) Clinical biochemistry of domestic animals, 6th ed. Academic Press, San Diego: 117-155.

6- Eckersall, P.D., Young, F.J., McComb, C., Hogarth, C.J., Safi, S., Weber, A., McDonald, T., Nolan, A.M., Fitzpatrick, J.L. (2001) Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. Vet. Rec. 148:35-41.

7- Gardner, I.A., Greiner, M. (2006) Receiver-operating characteristic curves and likelihood ratios: improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. Vet. Clin. Pathol., 35:8-17.

8- Gerardi, G., Bernardini, D., Azzurra Elia, C., Ferrari, V., Iob, L., Segato, S. (2009) Use of serum amyloid A and milk amyloid A in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. J Dairy Res., 76:411-417.

9- Grönlund, U., Hulten, C., Eckersall, P.D., Hogarth, C., Waller, K.P. (2003) Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced Staphylococcus aureus mastitis. J Dairy Res., 70:379-386.

10- Holdaway, R.J., Holmes, C.W., Steffert, I.J. (1996) A comparison of indirect methods for diagnosis of subclinical intramammary infections in lactating dairy cows, Part II: The discriminative ability of eight parameters in foremilk from individual quarters and cows. Aust. J Dairy Technol., 51:72-78.

11- Ishikawa, H., Shimizu, T., Hirano, H., Saito, N., Nakano, T. (1982) Protein composition of whey from subclinical mastitis and effect of treatment with levamisole. J Dairy Sci. 65:653-658.

12- Johnson, B.C., Swanson, A.M. (1952) Milk serum proteins. I. A quantitative biuret test for milk serum proteins. J Dairy Sci., 35:823-828.

13- Khan, M.Z., Khan, A. (2006) Basic facts of mastitis in dairy animals: a review. Pak. Vet. J.,26:204-208.

14- Larson, M.A., Weber, A., Weber, A.T., McDonald, T.L. (2005) Differential expression and secretion of bovine serum amyloid A (SAA3) by mammary epithelial cells stimulated with prolactin or lipopolysaccahride. Vet Immunol. Immunopathol., 107:255-264.

15- McDonald, T.L., Larson, M.A., Mack, D.R., Weber, A. (2001) Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum. Vet. Immunol. Immunopathol., 83:203-211.

16- Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M. (2004) Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. Vet. J., 168:28-40.

17- Nagasawa, T., Tanahashi, T. (1963) Electrophoretic studies on proteins in milk of cows with mastitis. Japanese J Zootechnol. Sci.,33:461.

18- National Mastitis Council (1990) Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. 3rd Ed. National Mastitis Council, Inc. Arlington, VA.

19- O›Mahony, M.C., Healy, A.M., Harte, D., Walshe, K.G., Torgerson, P.R., Doherty, M.L. (2006) Milk amyloid A: Correlation with cellular indices of mammary inflammation in cows with normal and raised serum amyloid A. Res. Vet. Sci., 80:155-161.

20- Pyörälä, S. (2003) Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. Vet. Res., 34:565-578.

21- Randolph, H.E., Erwin, R.E., Richter, R.L. (1973) Influence of mastitis on properties of milk. VII. Distributions of milk proteins. J Dairy Sci., 57:15-18.

22- Safi, S., Khoshvaghti, A., Jafarzadeh, S.R., Bolourchi, M., Nowrouzian, I. (2009) Acute phase proteins in the diagnosis of subclinical mastitis. Vet. Clin. Pathol., 38:471-476.

23- Schepers, A.J., Lam, T.J.G.M., Schukken, Y.H., Wilmink, J.B.M., Hanekamp, W.J.A. (1997) Estimation of variance components for somatic cell counts

to determine thresholds for uninfected quarters. J Dairy Sci., 80:1833-1840.

24- Seegers, H., Fourichon, C., Beaudeau, F. (2003) Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Vet. Res., 34:475-491.

25- Shamay, A., Homans, R., Fuerman, Y., Levin, I., Barash, H., Silanikove, N., Mabjeesh, S.J. (2005) Expression of albumin in non-hepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland. J Dairy Sci., 88:569-576.

26- Sloth, K.H., Friggens, N.C., Løvendahl, P., Andersen, P.H., Jensen, J., Ingvartsen, K.L. (2003) Potential for improving description of bovine udder health status by combined analysis of milk parameters. J Dairy Sci., 86:1221-1232.

27- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A., Wheeler, T.T. (2009) Immune components of bovine colostrum and milk. J Anim. Sci.,87:3-9.

28- Waite, R., Blackburn, P.A. (1963) The relationship between milk yield, composition, and tissue damage in a case of subclinical mastitis. J Dairy Res., 30:23.

29- Wickstrom, E. (2009) New markers of bulk milk quality in relation to mastitis. Licentiate Thesis, Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, Sweden.