تعیین ارزش تشخیصی دستگاه کتون متر نواوت در تشخیص گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی

محمدرضا طاهری جزی[۱]، مریم کریمی دهکردی*[۲]

چکیده

یکی از مهمترین ناهنجاری‌های متابولیکی در اوایل دوره شیردهی بیماری کتوز می‌باشد. آزمون استاندارد طلایی برای تشخیص کتوز، اندازه‌گیری میزان بتاهیدروکسی بوتیرات (BHB) در خون است. در این مطالعه، ارزش تشخیصی دستگاه الکترونیکی کتون متر نواوت جهت تشخیص گاوهای مبتلا به کتوز تحت درمانگاهی در مقایسه با روش آزمون طلایی آزمایشگاهی ارزیابی گردید. از تعداد ٦٨ گاو در بازه زمانی ١٤-٧ روز بعد از زایمان خونگیری انجام شد. در آزمایشگاه، مقدار BHB سرم با روش اسپکتروفتومتری و کیت رندوکس اندازه گیری گردید. در زمان خونگیری میزان BHB خون کامل با دستگاه کتون متر نواوت در همان گاوها نیز تعیین شد. مقادیر BHB حاصل از دو روش با مدل های آماری T- test و همبستگی پیرسون آنالیز گردید. به منظور تعیین بهترین نقطهٔ برش BHB با استفاده از دستگاه نواوت، که بتواند بهترین تمایز را بین گاوهای سالم و مبتلا به کتوز (بر اساس تست مرجع) داشته باشد، همچنین جهت تخمین حساسیت و ویژگی نواوت از آنایز راک استفاده گردید. نتایج نشان داد که مقدار BHB در خون کامل در روش دستی به طور معنی داری بالاتر از روش آزمایشگاهی است. با اینحال بین این دو روش همبستگی معنی دار و خوبی وجود دارد. همچنین نواوت در نقطه برش ۱/۲ میلی‌مول بر لیتر بالاترین ترکیبی از حساسیت و ویژگی (۱۰۰ و ٤١/٩ درصد) را در مقایسه با تست استاندارد دارا می باشد. با توجه به همبستگی خوب و معنی دار تست نواوت و حساسیت بالای آن، می توان گفت تست نواوت از دقت قابل قبولی برای تشخیص گاوهای هایپرکتونمیک برخوردار می باشد.

واژگان کلیدی: کتون متر نواوت، کتوز تحت بالینی، گاو شیری.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۳/۳

مقدمه

کتوز یک اختلال متابولیک شایع در گاوهای شیری پرتولید است که به طور معمول در دو تا چهار هفته پس از زایمان رخ می دهد. این بیماری به دنبال افزایش غلظت کتون بادی ها مانند بتاهیدروکسی بوتیرات (BHB)، استواستات و استون در شیر، ادرار و خون ایجاد می‌شود (۱). به عبارت دیگر پاتوژنز این بیماری متابولیکی مرتبط با بروز تغییرات در روند سوخت و ساز بدن بوده که منجر به کاهش سطح گلوگز خون و افزایش تولید اجسام کتونی در بدن می گردد. لازم به ذکر است که بتاهیدروکسی بوتیرات به دلیل پایداری در خون به عنوان یک استاندارد طلایی برای تشخیص کتوز تحت بالینی در نظر گرفته می شود. در این بیماری، غلظت بتاهیدروکسی بوتیرات به طور معنی دار بیشتر از سایر کتون بادی ها بوده و در دو هفته اول شیردهی به بیش از ۱٤۰۰ میکرومول در لیتر یا ١٤/٤ میلی گرم در دسی لیتر می رسد. معمولا به منظور تمایز گاوهای سالم از گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی، از نقطه برش ۱/۲ تا ۱/٤ میلی مول BHB در نمونه های خون استفاده می شود (۱، ۲).

شیوع کلی کتوز تحت بالینی در گاوهای شیری در اوایل دوره شیردهی ٣٤-٩/٨ درصد تخمین زده شده است (۳). وقوع این بیماری در گاوهای چند شکم زاییده به طور معنی دار بیشتر از گاوهای شکم اول می باشد. احتمال شیوع این بیماری در گاوهایی با وضعیت بدنی (BCS) بیشتر یا مساوی ۳/۷۵، بیشتر از سایر گاوها تخمین زده شده است. علائم بالینی کتوز بالینی در گاوهای شیری شامل بی اشتهایی، لیسیدن و جویدن غیرطبیعی، از دست دادن سریع وزن بدن، کاهش تولید شیر و افزایش خطر ابتلا به سایر بیماری ها (افزایش احتمال جابجایی شیردان، متریت بالینی، کتوز بالینی، آندومتریت بالینی، دوره طولانی مدت آنولاسیون پس از زایمان، افزایش تعداد و شدت ورم پستان و کاهش تولید شیر در اوایل شیردهی) می باشد (٤). از این رو به نظر می رسد که تشخیص سریع و زودهنگام کتوز به وِیژه کتوز

۱- دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
*۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
(ma_karimivet58@yahoo.com)

تحت بالینی در گاوهای شیری بتواند میزان خسارات و ضررهای اقتصادی ناشی از آن بخصوص کاهش وزن و تولید شیر را در گله به طور معنی دار کاهش دهد. مطالعات صورت گرفته نشان داده است که به طور میانگین، ٤٠٪ از گاوهای شیری حداقل یک بار در دوران شیرواری خود مبتلا به کتوز تحت بالینی می شوند، بنابراین تشخیص زودهنگام کتوز تحت بالینی در گاوهای مبتلا در دوره ابتدایی پس از زایمان در سطح گله منجر به بهبود راندمان تولید و بهره وری دامها می گردد. در صورت تشخیص به موقع این بیماری می توان با یک روش درمانی ساده نظیر تغییر در رژیم غذایی دامها، تغذیه مناسب آنها بویژه در دوره انتقالی، مدیریت وضعیت بدنی دامها و نیز استفاده از برخی مواد افزودنی خوراکی مانند نیاسین، پروپیلن گلیکول و یونوفورها می توان ضررهای اقتصادی ناشی از کتوز تحت بالینی را در گله کاهش داد (۲).

در زمان های گذشته به منظور تشخیص کتوز در گاوهای شیری، از روش استاندارد اندازه گیری غلظت BHB در پلاسما یا سرم استفاده می شد. یافته های علمی نشان داده است که غلظت بتاهیدروکسی بوتیرات در خون در مقایسه با سایر کتون بادی ها نظیراستون یا استواستات دارای ثبات و ماندگاری بالاتری بوده و تشخیص آنها در خون نسبت به شیر و ادرا بسیار ساده تر و اطمینان بخش تر است (۵). برخی از روش های اندازه گیری غلظت بتاهیدروکسی بوتیرات وقت گیر و پرهزینه بوده و نیازمند تجهیزات ویژه و نیروی متخصص آزمایشگاهی است. کیت های تجاری موجود برای تعیین سطح بتاهیدروکسی بوتیرات شامل کیت آزمون کلریمتریک Cayman، کیت آزمون بتاهیدروکسی بوتیرات Abcam، کیت الیزا بتاهیدروکسی بوتیرات با آنتی بادی‌های گاوی و غیره می باشند. برخی از تست های تشخیصی تجاری نیز مانند Ketolac, Biolab و München تنها قادرند نتایج آنالیز را به صورت نیمه کمی در اختیار کاربران قرار دهند که چندان قابل اطمینان نیست. معمولاً در آزمایشگاه ها غلظت BHB موجود در سرم یا پلاسما با استفاده از روشهای آنزیمی رنگ سنجی اندازه گیری می شود. این روش برای معاینه گاوها به صورت انفرادی و نیز ارزیابی سلامت گله مفید است، ولی بسیار وقت گیر و هزینه بر بوده و نیازمند نیروی متخصص آزمایشگاهی و تجهیزات تخصصی می‌باشد. بنابراین، روش آنزیمی اندازه گیری بتاهیدروکسی بوتیرات به عنوان یک تست تشخیصی روتین در سطح گله برای تشخیص سریع کتوز تحت بالینی توصیه نمی شود. از این رو، تحقیقات بیشتری برای جایگزینی یک آزمون دقیق، ساده و قابل اعتماد برای اندازه گیری سطح کتون بادی ها در خون و تشخیص اولیه کتوز تحت بالینی در سطح گله صورت گرفت. نتایج این بررسی ها منجر به معرفی چندین روش معتبر و کاربردی برای اندازه گیری کتون بادی ها در خون گردید (٦).

در انسان، استفاده از کتون مترهای الکترونیکی نظیر MediSense Precision و Abbott با هدف اندازه گیری غلظت بتاهیدروکسی بوتیرات در خون باعث شد که پیشنهاد استفاده از کتون متر در گاوهای شیری نیز مطرح شود. در ابتدا از کتون مترهای انسانی برای تشخیص کتوز در گاو استفاده می شد. دقت این کتون مترهای انسانی در تعیین سطح BHB در نمونه های خون گاو در سطح متوسط تا خوب ارزیابی شدند و نتایج آنها از نظر آزمایشگاه های تشخیصی قابل قبول بود. ولیکن از آنجا که استفاده از کتون مترهای انسانی به طور خاص برای تشخیص کتوز در انسان طراحی شده بودند، کاربرد آنها در حیطه دامپزشکی شبهه برانگیز بود و استفاده از آنها در دام توسط شرکت های تولیدکننده کتون متر تایید و پشتیبانی نمی شد. پس از مدتی، استفاده از کتون مترهای انسانی برای تشخیص کتوز در دام منسوخ شد و توصیه شد که از آنها برای اندازه گیری دقیق و قابل اعتماد بتاهیدروکسی بوتیرات در نمونه های خون

حیوانی و سرم گاو استفاده نشود. با پیشرفت تکنولوژی و در طی چند سال گذشته، کتون مترهای مختلفی نظیر کتون مترهای TaiDoc, ,Ketostix, Ketur-Test, Ketodiabur Medi-Test-Keton، نوامکس و نووات برای اندازه گیری سطح کتون بادی ها در انسان و دام معرفی شده اند (۷). بررسی ها نشان داده است که ارتباط معنی دار و مستقیمی بین اندازه گیری غلظت BHB خون با استفاده از روشهای استاندارد آنزیمی با روش اندازه گیری آنها با استفاده از کتون مترهای الکترونیکی در گاوهای شیری (۸، ۹)، گوسفند (۱۰)، بز (۱۱، ۱۲)، سگ و گربه (۱۳)، و انسان (۱٤) وجود دارد.

با توجه به این که روش نواوت یا روش دستی در بالین و در گاوداری انجام می شود، نیازی به ارسال نمونه به آزمایشگاه جهت اندازه گیری BHB نیست، در عین حال که مشکلات بابت ارسال نمونه به آزمایشگاه وجود نخواهد داشت. در نتیجه دامپزشک سریع تر می تواند تست را انجام دهد و به تشخسیص زود هنگام کتوز کمک می کند، مخصوصا در جاهایی که آزمایشگاه وجود نداشته باشد یا دور از دسترس باشد. از آنجایی که صحت و دقت این کتون مترها هنوز به طور دقیق بخصوص در ایران ارزیابی نشده اند، این مطالعه به بررسی روش جدید اندازه‌گیری کتون‌بادی ها در خون با استفاده از دستگاه نواوت (از نظر حساسیت و ویژگی) و مقایسه نتایج آن با تست شاخص بتاهیدروکسی بوتیرات خون به عنوان استاندارد طلایی پرداخته است. در این بررسی مقدار BHB خون در گاوهای در معرض خطر ابتلا به کتوز تحت بالینی در ١٤–٧ روز پس از زایش با استفاده از دو روش فوق مقایسه گردید. نتایج این مطالعه می تواند منجر به کاهش هزینه و زمان مورد نیاز برای بررسی نمونه ها و تشخیص زودهنگام کتور تحت بالینی در گله شود.

مواد و روش‌کار

در این مطالعه که در گاودارهای صنعتی استان اصفهان انجام شد، از تعداد ٦٨ رأس گاو که در بازهٔ زمانی ١٤–٧ روز پس از زایش بودند، به وسیلهٔ ونوجکت از ورید دمی ۱۰ سی‌سی خون اخذ شده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس سرم، جداسازی و به میکروتیوپ منتقل و تا زمان انجام آزمایش در فریزر نگهداری شد. در آزمایشگاه مقدار BHB سرم با استفاده از کیت‌های تجاری موجود در بازار به روش اسپکتروفتومتری با دستگاه اتوآنالایزر و کیت رندوکس (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Co. Antrim, UK) اندازه‌گیری گردید. همزمان با خون‌گیری، از همان تعداد دام و در محل دامداری، با اضافه نمودن قطره‌ای خون (از دم یا گوش به کمک لنست) بر روی نوارهای مخصوص درون دستگاه کتون‌متر نواوت (Nova Vet; Nova Biomedical)، میزان BHB خون ظرف مدت ۱۰ ثانیه آنالیز و جواب ذخیره شد. مقادیر BHB حاصل از هر دو روش با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و نیز مدلهای T test مورد ارزیابی و تجزیه تحلیل آماری قرار گرفتند. همبستگی نتایج به دست آمده از دو روش، با انجام آزمون همبستگی پیرسون (Pearson correlation) ارزیابی گردید. در این مطالعه، روش آزمایشگاهی اسپکتروفتومتری جهت اندازه گیری BHB سرم، به عنوان متد استاندارد استفاده شد. به منظور تعیین بهترین نقطهٔ برش BHB با استفاده از دستگاه کتون‌متر نواوت، که بتواند بهترین تمایز را بین گاوهای سالم و مبتلا به کتوز (بر اساس تست مرجع) داشته باشد، همچنین جهت تخمین حساسیت و ویژگی دستگاه کتون‌متر نواوت، از منحنی راک استفاده گردید. در این مقاله خصوصیات روش نواوت، به عنوان یک تست تشخیصی کتوز، در قالب دقت (accuracy)، حساسیت (sensitivity)، ویژگی (specificity)، ارزش اخباری مثبت و منفی (positive and negative predictive values) بیان شد (۱۵).

نتایج

نتایج مربوط به شیوع کتوز تحت درمانگاهی با توجه به حد آستانه های مختلف BHB سرم در روش استاندارد آزمایشگاهی و BHB خون کامل در روش نواوت در جدول شماره ۱ آورده شده است. با در نظر گرفتن حد آستانه ۱mmol/l (۱٦)، ۸/۸ درصد گاوهای تست شده در روش آزمون طلایی مبتلا به کتوز تحت بالینی هستند (جدول ۱). همچنین میزان BHB در تمامی گاوها در روش نواوت بیشتر یا مساوی ۱ میلی‌مول بر لیتر است. در روش آزمایشگاهی تعداد گاوهای مبتلا به کتوز در نقطه برش ۱/۲ و ۱/٤ میلی-مول بر لیتر مشابه است (۵/۹ درصد)، در حالیکه در روش نواوت به ترتیب ٦۱/۷ و ۱۱/۷ درصد می باشد. همانطور که مشاهده می شود هر چه حد آستانه کتوز را بالاتر در نظر بگیریم، تعداد گاوهای مبتلا به کتوز کمتر هستند. میانگین غلظت BHBA اندازه گیری شده با استفاده از دو متد مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است. غلظت BHBA از ۱ تا ۱/۹ میلی‌مول بر لیتر با دستگاه دستی نواوت و از ۰/۱۸ تا ۱/۷٦ میلی‌مول بر لیتر با روش آزمایشگاهی متغیر بود. به طور کلی، نتایج BHBA حاصل از دو روش با یکدیگر تفاوت معنی داری داشتند (p=۰) به طوریکه نتایج روش دستی در خون کامل بالاتر از نتایج آزمایشگاهی در سرم بود (جدول ۲). با این حال، مقایسه مستقیم داده های BHBA حاصل از روش دستی (در خون کامل) و روش آزمایشگاهی (در سرم) در آزمون همبستگی پیرسون (Pearson correlation) نشان داد که بین این دو روش همبستگی معنی دار (p=۰) و خوبی وجود دارد (r=۰/۷۰۵).

عملکرد تست نواوت در نقاط برش مختلف (۱، ۱/۲، ۱/۳ و ۱/٤)، در مقایسه با BHB سرم بزرگتر مساوی ۱ (شاخص کتوز تحت درمانگاهی با استفاده از روش آزمایشگاهی آزمون طلایی) برای تعیین کتوز تحت بالینی در جدول ۳ نشان داده شده است. هدف از مطالعه حاضر مقایسه غلظت های BHB سرم حاصل از روش آزمایشگاهی استاندارد و یک کتون متر دستی (نواوت) بود. از آنجاییکه نواوت مقدار BHB خون را بیشتر از روش آزمایشگاهی نشان داد (جدول ۲)، در نتیجه، تنظیم آستانه ها (adjustment of the thresholds) برای تفسیر صحیح غلظت های حاصل از روش دستی مورد نیاز بود. لذا در این قسمت با استفاده از جداول کراس تب، ویژگی های تست نواوت را، در حد آستانه

جدول ۱- مقایسه فراوانی (تعداد و درصد) گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی بر اساس حد آستانه های مختلف BHB (بزرگتر یا مساوی نقطه برش) در دو روش آزمایشگاهی و نواوت

نقاط برش BHBA (میلی‌مول بر لیتر)	۰/۵	۰/٦	۰/۷	۰/۸	۰/۹	۱	۱/۲	۱/٤
روش آزمایشگاهی	٤۲ (٦۱/۸)	۳۰ (٤٤/۱)	۱۸ (۲٦/۵)	۱٤ (۲۰/٦)	۱۰ (۱٤/۷)	٦ (۸/۸)	٤ (۵/۹)	٤ (۵/۹)
روش نواوت	۰	۰	۰	۰	۰	٦۸ (۱۰۰)	٤۲ (٦۱/۷)	۸ (۱۱/۷)

مختلف، در مقایسه با روش آزمون طلایی یا همان روش آزمایشگاهی ارزیابی کردیم (جدول ۳). با استفاده از جدول کراس تب مقادیر مثبت حقیقی، مثبت کاذب، منفی حقیقی و منفی کاذب به دست آمدند. این مقادیر برای محاسبه ویژگی های آزمون (حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری مثبت و منفی) مورد استفاده قرار گرفت. زمانیکه نقطه برش BHBA برای جدا کردن گاوهای سالم و بیمار در روش آزمایشگاهی ۱ میلی‌مول بر لیتر در نظر گرفته شود، با توجه به نقطه برش پیشنهادی ۱/۱، ۱/۲، ۱/۳ و ۱/٤ میلی‌مول بر لیتر برای BHBA حاصل از روش نواوت، حساسیت و ویژگی همچنین مقادیر مثبت حقیقی و کاذب و منفی حقیقی و کاذب و نیز ارزش اخباری مثبت و منفی برای روش نواوت محاسبه می‌شود.

جدول ۲- مقایسه میانگین BHB در دو روش

	Mean±sd	minimum	maximum
روش آزمایشگاهی	۰/۰±٦۳/۳۱	۰/۱۸	۱/۷٦
روش نواوت	۱/۰±۲/۲۱	۱	۱/۹

آنالیز راک (ROC) برای تعیین حد آستانه بحرانی

در قسمتی از نتایج، به منظور تعیین حد آستانه بحرانی BHB در روش نواوت، برای تشخیص گاوهای مبتلا به کتوز تحت درمانگاهی، از آنالیز آماری منحنی راک (Receiver Operator Characteristic Analysis; ROC) استفاده گردید. منحنی راک، حساسیت را در مقابل "ویژگی-۱" آنالیز می کند و مقادیرمثبت حقیقی (حساسیت) و مثبت کاذب (ویژگی-۱) را در تمام نقاط برش ممکن نشان می دهد. در این آنالیز، برای کتوز تحت بالینی در روش آزمون طلایی دو نقطه برش ۱میلی‌مول بر لیتر (۱٦) و ۱/۲ میلی‌مول بر لیتر (۱۷) در نظر گرفته شد. برای هر نقطه برش در روش استاندارد، یک سطح زیر منحنی راک (Area under the curve; AUC) و p-value وجود دارد. با توجه به p-value مشخص می‌شود که آیا روش نواوت روش مناسبی برای -

جدول ۳- ویژگی های تست نواوت در حد آستانه های مختلف برای تشخیص کتوز تحت درمانگاهی در مقایسه با روش آزمون طلایی آزمایشگاهی (BHB≥۱ mmol/L)

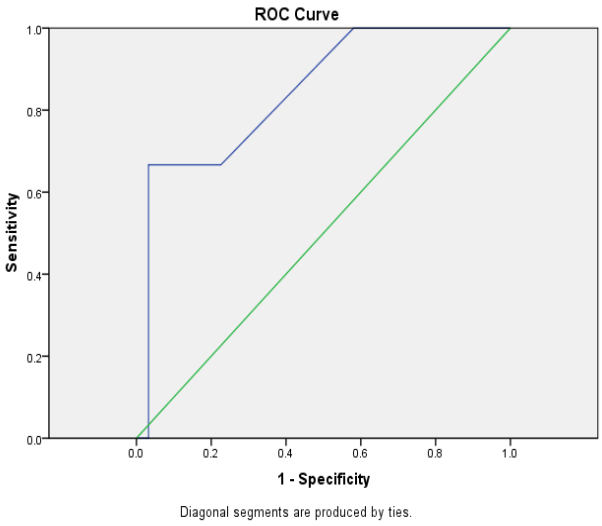
تست نواوت	حد آستانه های BHBA (mmol/L)			
	۱/۱	۱/۲	۱/۳	۱/٤
مثبت حقیقی	٦	٦	٤	٤
مثبت کاذب	٤۲	۳٦	۱٤	٤
منفی حقیقی	۲۰	۲٦	٤۸	۵۸
منفی کاذب	۰	۰	۲	۲
دقت (٪)[۱]	۳۸	٤۷	۷٦	۹۱
حساسیت (٪)[۲]	۱۰۰	۱۰۰	٦٦/۷	٦٦/۷
ویژگی (٪)[۳]	۳۲/۳	٤۱/۹	۷۷/٤	۹۳/۵
ارزش اخباری مثبت (٪)[٤]	۱۲/۵	۱٤/۲	۲۲/۳	۵۰
ارزش اخباری منفی (٪)[۵]	۱۰۰	۱۰۰	۹٦	۹٦/۷

[۱] دقت: مجموع موارد مثبت حقیقی و منفی حقیقی به کل موارد آزمون.
[۲]حساسیت: مثبت حقیقی تقسیم بر مجموع مثبت حقیقی و منفی کاذب.
[۳]ویژگی: منفی حقیقی تقسیم بر مجموع منفی حقیقی و مثبت کاذب.
[٤]ارزش اخباری مثبت: مثبت حقیقی تقسیم بر مجموع مثبت حقیقی و مثبت کاذب. [۵]ارزش اخباری منفی: منفی حقیقی تقسیم بر مجموع منفی حقیقی و منفی کاذب

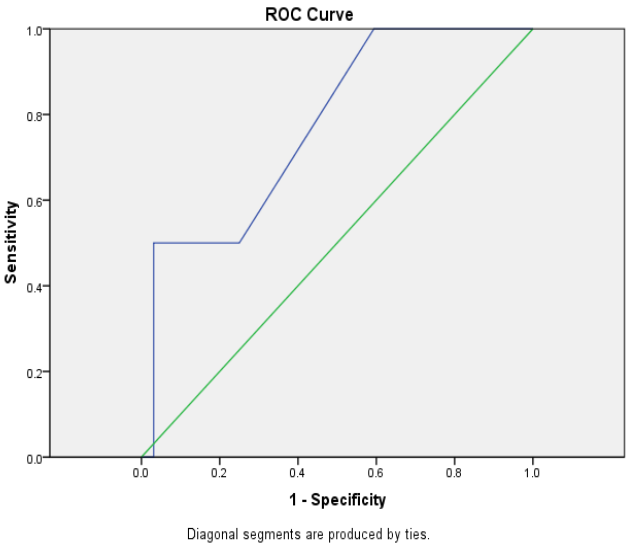
تشخیص کتوز هست یا خیر. نقطه ای روی منحنی راک که ترکیبی از بالاترین حساسیت و ویژگی را داشته باشد به عنوان حد آستانه بحرانی انتخاب می‌شود. تفسیر این حد آستانه بر اساس سطح زیر منحنی صورت می‌گیرد. سطح زیرمنحنی به منظور ارزیابی کارایی تست مورد استفاده قرارگرفت. سطح زیر منحنی بین ۰/۵-۰/۷ بیانگر درستی بالینی پایین، سطح زیر منحنی بین ۰/۷-۰/۹ بیانگر درستی بالینی متوسط و سطح زیر منحنی بالاتر از ۰/۹ نشان دهنده درستی بالینی بالا برای هر تست تشخیصی می باشد (۱۸). نتایج حاصل از آنالیز راک در ارتباط با عملکرد تست نواوت در مقایسه با روش آزمایشگاهی، در جدول ٤ نشان داده شده است. با توجه به جدول، زمانیکه نقطه برش BHB سرم خون (در روش استاندارد) برای تشخیص کتوز تحت درمانگاهی ۱ یا ۱/۲ میلی‌مول بر لیتر در نظر گرفته شود، سطح زیر منحنی به ترتیب ۰/۸٤٤ و ۰/۷۷۳ می باشد (نمودار ۱ و ۲) که با توجه به p=۰/۰۰٦ و p=۰/۰٦ مشخص می شود که این تست درستی بالینی قابل قبول داشته و بنابراین روش نواوت در تشخیص کتوز تحت درمانگاهی (در نقاط برش پیشنهادی) مانند روش آزمون طلایی دارای ارزش تشخیصی می باشد. از منطقه زیر منحنی راک برای ارزیابی دقت آستانه های نواوت استفاده شد. نقاط برش پیشنهادی در هر مورد به همراه حساسیت و ویژگی مربوط به آن نقطه برش در جدول ٤ آورده شده است. بهترین نقطه برش در روش نواوت که بتواند گاوهای سالم و بیمار را از هم جدا کند و بالاترین ترکیبی از حساسیت و ویژگی را داشته باشد، ۱/۱۵ میلی‌مول بر لیتر با حساسیت ۱۰۰ درصد و ویژگی ٤۱/۹ (زمنیکه شاخص کتوز تحت بالینی در روش استاندارد ۱ mmol/L باشد.) و ٤۰/٦ (زمنیکه شاخص کتوز تحت بالینی در روش استاندارد ۱/۲ mmol/L باشد.) است.

جدول ٤- نقاط برش پیشنهادی برای BHB در روش نواوت بر اساس نقاط برش در روش آزمون طلایی

	درستی بالینی (AUC)	P-value	نقطه برش	حساسیت	ویژگی
۱ میلی مول بر لیتر	۰/۸٤٤	۰/۰۰٦	۱/۱۵	۱۰۰	٤۱/۹
۱/۲ میلی مول بر لیتر	۰/۷۷۳	۰/۰٦	۱/۱۵	۱۰۰	٤۰/٦



نمودار ۱- منحنی راک مربوط به نواوت زمانیکه مقدار BHB≥۱mmol/L در روش آزمون طلایی شاخص کتوز تحت بالینی در نظر گرفته شود.



نمودار ۲- منحنی راک مربوط به نواوت زمانیکه مقدار BHB≥۱/۲mmol/L در روش آزمون طلایی شاخص کتوز تحت بالینی در نظر گرفته شود.

بحث

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تست دستی نواوت برای تشخیص کتوز تحت درمانگاهی در مقایسه با روش آزمون طلایی آزمایشگاهی بود. در این مطالعه، نواوت مقادیر BHB خون را بیشتر از روش آزمایشگاهی نشان داد (۱/۰±۲/۲۱ در مقابل ۰/۰±۶۳/۳۱)، با این حال بین این دو روش همبستگی خوب و معنی داری مشاهده گردید. هنگامی که مقادیر BHB بزرگتر یا مساوی ۱ mmol/L در روش آزمون طلایی به عنوان شاخص کتوز تحت بالینی در نظر گرفته شد، حساسیت و ویژگی تست نواوت در تشخیص کتوز در نقطه برش ۱/۱ mmol/L به ترتیب ۱۰۰ و ۳۲/۳ درصد بود. با افزایش نقطه برش BHB به mmol/L ۱/۲، حساسیت تست تغییر نکرد ولی ویژگی تست تا ٤۱/۹ درصد افزایش یافت. با افزایش بیشتر نقطه برش به ۱/۳ و ۱/٤ میلی‌مول بر لیتر، اگر چه ویژگی تست نواوت به ترتیب به ۷۷/٤ و ۹۳/۵ درصد افزایش یافت، ولی حساسیت تست در این دو نقطه برش از ۱۰۰ درصد به ٦٦/۷ درصد کاهش یافت. بنابراین نواوت در نقطه برش ۱/۲ mmol/L بالاترین ترکیبی از حساسیت و ویژگی (۱۰۰ و ٤۱/۹ درصد) را در تشخیص کتوز تحت درمانگاهی دارا می باشد. در آنالیز راک همین حساسیت و ویژگی در نقطه برش ۱/۱۵ میلی‌مول بر لیتر دیده شد. یافته های جدول ۳ و همچنین منحنی ROC نشان می دهند که در روش دستی (کتون متر نواوت) احتمالا حد آستانه ۱/۲ دارای بهترین حساسیت و ویژگی است. اینکه چگونه می توان با استفاده از این روش دستی برای تشخیص موارد کتوز تحت بالینی استفاده کرد، باید گفت که با توجه به حساسیت بالا و ویژگی پایین به دست آمده برای روش نواوت (حساسیت ۱۰۰ درصد و ویژگی ٤۱/۹ درصد) توانایی این تست برای پیدا کردن موارد بیماری (حساسیت) بالا ولی توانایی تست برای پیدا کردن موارد سالم (ویژگی) کمتر است. از نظر بالینی، می توان گفت برای جداسازی گاوهای هایپرکتتیک، یک تست با حساسیت بالا سودمندتر از تستی با ویژگی بالا است، زیرا مزایای اقتصادی و بهداشتی (سلامتی) درمان گاوهای هایپرکتوتیک مثبت بیش از عواقب منفی درمان حیوانات غیرکتونمیک است (۲۰). به عبارت دیگر برای شناسایی گاوهای هایپرکتوتیک، یک تست با حساسیت بالا بسیار مفیدتر از تست های با ویژگی بالاست زیرا مزایای اقتصادی درمان حتی در گاوهایی که سالم باشند و درمان دریافت کنند بیش از حالتی است که بیمار بوده و درمان دریافت نکنند (۲۰).

طبق جدول ۱در حد آستانه ۱/۲ mmol/L، در روش نواوت ٦۱/۷ درصد گاوها مبتلا به کتوز تحت بالینی هستند در حالیکه با روش استاندارد این مقدار ۵/۹ درصد است. در بیان علت تفاوت بین میزان مثبت ها در دو روش در این نقطه برش، می توان به موارد زیر اشاره کرد: ۱- نواوت BHB را در خون کامل اندازه می گیرد درحالیکه در روش گلد استاندارد BHB در سرم اندازه گیری می‌شود که ممکن

است در تفاوت عدد نهایی محاسبه شده موثر باشد.۲- استفاده از روش های مختلف آزمایشگاهی ۳- تعداد پایین نمونه نیز می توند در روش های مقایسه ای این تفاوت ها را سبب شود و با افزایش تعداد نمونه احتمالا تا این اندازه تفاوت وجود نخواهد داشت. امروزه، دستگاه کتون متر نواوت (NovaVet ketone meter) در آمریکا و اروپا به عنوان یک مرجع معتبر برای تشخیص کتوز مورد استفاده قرار می گیرد. این دستگاه در سال ۲۰۱٤ در کشور آلمان در تحقیقات میدانی بر روی ۱۵۵ نمونه گاو شیری بعد از زایمان جهت تشخیص کتوز استفاده شد و تمامی نمونه ها با روش مرسوم اندازه گیری آنزیمی کتون بادی ها مورد مقایسه قرار گرفتند. در این مطالعه دقت دستگاه کتون متر نوات از نظر حساسیت ۹۷-۹۱٪ تشخیص داده شد. همچنین، مطالعه صورت گرفته توسط Mahrt و همکاران نیز در سال ۲۰۱٤ نشان داد که ویژگی بیوسنسورهای کتون متر نواوت برای تشخیص مقادیر بتاهیدروکسی بوتیرات در خون ۸۲٪ می باشد (۱۹).

Bach و همکاران در سال ۲۰۱٦ از چهار کتون متر مختلف برای بررسی هایپرکتونمی در گاوهای شیری در دوره انتقالی استفاده نموده و نتایج موبوطه را مورد ارزیابی و مقایسه قرار دادند. در این مطالعه، کتون مترهای Nova Max،Tai Doc ،Precision Xtra و Nova Vet مورد مطالعه قرار گرفتند و کارایی هر کدام از این کتون مترها با میانگین غلظت BHB که به روش استاندارد طلایی (اسپکتروفتومتریک) اندازه گیری شده بود مقایسه گردید. نمونه های خون از ۲۵۰ گاو نژاد هولشتاین بین روزهای ۲٦۲ آبستنی و ۱۵ روزگی شیرواری اخذ گردید. درتمامی کتون مترها، ضریب همبستگی پیرسون بیشتر از ۹۵٪ بود. در مقایسه با سایر کتون مترها، کمترین حساست و بیشترین ویژگی در اندازه گیری کتون بادی ها (در نقطه برش ۱/۲ میلی مول بر لیتر) مربوط به دستگاه کتون متر نوا مکس و نواوت بود. همچنین، بیشترین موافقت بین نتایج بدست آمده از روش استاندارد طلایی (اسپکتروفتومتریک) و نتایج حاصل از کتون متر مربوط به دستگاه کتون متر نواوت نشان داده شد. در این مطالعه، حساسیت و ویژگی کتون متر نواوت به ترتیب ۹٤/۹٪ و ۹۱/۸٪ گزارش گردید. این مقادیر برای کتون متر نوامکس به ترتیب ۷٤/٤٪ و ۱۰۰٪ مشخص شد. این محققین با مقایسه غلظت های بتاهیدروکسی بوتیرات پلاسما نشان دادند که کتون متر نواوت دارای حداقل خطا با تفاوت میانگین ۰/۰۸ و بیشترین حد پراکندگی از نقاط اطراف میانگین است. از نظر بالینی، خطای مشاهده شده در کتون متر نووات در نقطه برش ۱/۲ میلی مول بر لیتر بسیار ناچیز و قابل اغماض گزارش شده است. در این بررسی، میانگین اختلاف غلظت BHB در کتون متر TaiDoc به طور متوسط کمی بالاتر از میزان واقعی آن نشان داده شده است. همچنین، کتون متر Precision Xtra نیز با اختلاف متوسط ۰/۳٤- میلی‌مول در لیتر میزان بتاهیدروکسی بوتیرات را بالاتر از میزان واقعی آن نشان داده است. از طرف دیگر، این محققین نشان داده اند که میزان هماتوکریت خون گاو کمتر از انسان است که محتمل ترین علت برای قرائت های پایین این فاکتور در خون گاو می باشد. از اینرو، در این مطالعه فاکتور شیب کالیبراسیون ۱/۲۵ بمنظور تصحیح این تفاوت در غلظت هماتوکریت توصیه شده است. محاسبه این فاکتور شیب با استفاده از کتون متر نوا مکس امکان پذیر نیست. این در حالی است با استفاده از نواوت می توان این فاکتور شیب را تعیین و حساست و ویژگی تست را بهبود بخشید. این محققین استفاده از کتون متر NovaVet و سپس TaiDoc را برای استفاده در فارم و مونیتورینگ و درمان هایپرکتونمی در گاوهای شیری توصیه نموده اند (۲۰). مطالعات مختلفی به منظور بررسی و مقایسه دستگاه های کتون متر مختلف صورت گرفته است و حساسیت و دقت این دستگاه ها با یکدیگر مقایسه گردیده است. Carrier و همکاران در سال ۲۰۰٤ با هدف بررسی عملکرد سه کتون متر KetoCheck, Ketostix و KetoTest غلظت های سرمی بتاهیدروکسی بوتیرات را در شیر، ادرار و سرم گاوهای شیری اندازه گیری نمودند. در این مطالعه، شیوع کتوز تحت بالینی در گاوهای شیری تحت مطالعه ۷/٦ ٪ تخمین زده شد. این محققین

بمنظور تشخیص استواستات در شیر و ادرار به ترتیب از KetoCheck و Ketostix استفاده نمودند. KetoCheck دارای ویژگی بسیار بالا (۹۹٪) و حساسیت بسیار پایین (۴۱٪) برای تشخیص استواستات در شیر بود. این در حالی بود که حساسیت و ویژگی نوار Ketostix در تشخیص استواستات ادرار به ترتیب ٪۷۸ و ۶۹٪ گزارش شده است. نوار KetoTest نیز در نقطه برش ۱۰۰ میکرومول در لیتر توانست با حساسیت و ویژگی به ترتیب ٪۷۳ و ۹۶٪ میزان استواستات را در شیر تشخیص دهد. در صورت بالا بردن نقطه برش تا ۲۰۰ میکرومول بر لیتر میزان حساسیت و ویژگی این تست به ۲۷٪ و ۹۹٪ رسید. در این بررسی، استفاده از Ketostix در نقطه برش پایین و یا KetoTest در مقیاس ۱۰۰ میکرومول بر لیتر باعث ایجاد تنها ۴-۳ نتیجه مثبت کاذب در هر ۱۰۰ نمونه انداه گیری شده گردید (زمانی که سطح شیوع کتوز تحت بالینی در گله ۳۰-۵ ٪ بود). همچنین، شیوع منفی کاذب با استفاده از این کتون مترها در همان سطح شیوع تنها ۵-۱ ٪ گزارش شد. این محققین استفاده از نوارهای Ketostixیا KetoTest را بمنظور تشخیص میزان استواستات در هرگاو بصورت انفرادی و نیز در سطوح تجاری در گله های گاوهای شیری توصیه نمودند. این در حالی بود که KetoCheck بعنوان یک تست غربالگری دارای کاربرد و قابلیت محدودتری در تشخیص کتوز تحت بالینی معرفی شده است (۲۱).

در مطالعه مشابه، Voyvoda و Erdogan در سال ۲۰۱۰ نیز مقادیرβHBA و گلوگز خون را با استفاده از کتون‌متر Optium Xceed و روش مرسوم آزمایشگاهی (آنزیمی) اندازه گیری نمودند و مزایای استفاده از کتون متر را در تشخیص کتوز تحت درمانگاهی در گاوهای شیری مورد بررسی قرار دادند. دراین مطالعه، تعداد ۷۸ نمونه خون از گاوهای هلشتاین سالم در فواصل زمانی ۵ تا ۶۰ روز بعد از زایمان اخذ گردید. این محققین نشان دادند که اندازه گیری کتون بادی ها با استفاده از کتون متر الکترونیکی بسیار سریعتر و بهتر از روش آنزیمی بوده و مقادیر اندازه گیری شده نیز بسیار واقعی تر و دقیق تر از روش های آنزیمی است. در این مطالعه، مقادیرBHB و گلوگز بدست آمده از دستگاه کتون متر Optium Xceed در مقایسه با روش آزمایشگاهی به طور معنی داری بالاتر بود. ضریب همبستگی برای BHB و گلوکز در استفاده از این کتون متر درمقایسه با روش آزمایشگاهی به ترتیب ۰/۹۸ و ۰/۶۳ گزارش گردید. هنگامیکه مقادیر BHBA بزرگتر یا مساوی ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر (شاخص کتوز تحت بالینی) در نظر گرفته شد، حساسیت و ویژگی این تست در تشخیص کتوز تحت بالینی به ترتیب ۸۵٪ و ۹۴٪ بود. با افزایش نقطه برش BHB به ۱۴۰۰ میکرومول بر لیتر، حساسیت و ویژگی تست به ترتیب تا ۹۰٪ و ۹۸٪ افزایش یافت. این محققین تایید نمودند که استفاده از دستگاه مونیتورینگ کتون بادی ها در خون می تواند به عنوان یک تست تشخیصی معتبر و سریع جهت تشخیص کتوز تحت درمانگاهی در شرایط فارم استفاده شود (۸).

Pineda و Cardoso در سال ۲۰۱۵ مطالعه ای را با هدف مقایسه غلظت BHB سرم و پلاسما با استفاده از روش آزمایشگاهی آنزیماتیک و دستگاه کتون متر Precision Xtra انجام دادند. در این مطالعه، تعداد ۳۷۴ نمونه (۱۸۷ نمونه سرم و ۱۸۷ نمونه پلاسما) مربوط به گاوهای هلشتاین از ۱۱ روز قبل (۵۲ نمونه) تا ۵ روز بعد از زایمان (۱۳۷ نمونه) استفاده شدند. ضریب همبستگی برایBHB پلاسما و سرم به ترتیب ۰/۷۴ و ۰/۶۸ بود. بالاترین حساسیت و ویژگی این کتون متر زمانی بدست آمد که حد آستانه کتوز برای تشخیص BHB پلاسما ۱۸۰۰ میکرومول بر لیتر و برای تشخیص BHB سرم ۲۱۰۰ میکرومول بر لیتر تعیین شد. این محققین نشان دادند که این کتون متر در نقاط برش ذکر شده می تواند به درستی گاوهای سالم را از گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی را تفکیک کند (۲۲). در نهایت، Fiorentin و همکاران نیز در سال ۲۰۱۷ با تایید این نکته که اندازه گیری بتاهیدروکسی بوتیرات خون یک ابزار مهم برای تشخیص کتوز تحت بالینی در گاوهای شیری است به بررسی میزان دقت و حساسیت دستگاه های الکترونیکی پورتابل در تعیین میزان

بتاهیدروکسی بوتیرات خون در اوایل شیرواری در گاوهای شیری پرداختند. در این مطالعه، ۹۸ نمونه خون از گاوهای شیری در اولین دوره شیرواری جمع آوری شدند و با دستگاه های پورتابل Free Style Optimum (FSO) و KetoVet (KVE) مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه گیری اسپکتروفتومتریک BHB نیز به عنوان روش استاندارد در نظر گرفته شد. در این مطالعه، شیوع کتوز تحت بالینی در روش های استاندارد اسپکتروفتومتریک، FSO و KVE به ترتیب ۳۷/۷٪، ٤۰/۸ ٪ و ٤۲/۸٪ تخمین زده شد. شاخص های حساسیت و ویژگی در روش FSO به ترتیب ۸۸/۱٪ و ۹۸/٤٪ و در روش KVE به ترتیب ۷۸/۷٪ و ۹۲/٤٪ نشان داده شد. در این مطالعه، ضریب همبستگی پیرسون در روش های پورتابل FSO و KVE در مقایسه با روش استاندارد اسپکتروفتومتریک به ترتیب ۰/۹٦ و ۰/۹۳ تعیین گردید. هیچ اختلاف معنی داری در مقادیرBHB بین دو روش پورتابل با روش اسپکتروفتومتریک مشاهده نشد. در این مطالعه، شاخص های پیشگویی کننده (PV) در صورت استفاده از FSO (PV مثبت ۹۷/۳ درصد و PV منفی ۹۲/٤ درصد) بالاتر و بهتر از روش KVE (PV مثبت ۸۸/۱ درصد و PV منفی ۸۵/۹ درصد) بود. نتایج این تحقیق نشان داد که هر دو سیستم پورتابل دقت و قابلیت خوبی برای اندازه گیری BHB خون در گاوهای شیری دارند (۲۳). با توجه به همبستگی خوب و معنی‌دار تست نواوت با تست آزمون طلایی آزمایشگاهی و همچنین حساسیت بالای این تست در تشخیص کتوز تحت‌بالینی می توان گفت تست نواوت از دقت قابل قبولی برای تشخیص گاوهای هایپرکتونمیک برخوردار می‌باشد. استفاده از دستگاه کتون متر نواوت به عنوان جایگزین مناسبی برای روش‌های رنگ سنجی آزمایشگاهی و کیت‌های تجاری پرهزینه، به تشخیص زودهنگام کتوز تحت‌بالینی در فیلد کمک خواهدکرد. با تشخیص به موقع این بیماری می‌توان با یک روش درمانی ساده نظیر تغییر در رژیم غذایی دامها، تغذیه مناسب آنها بویژه در دوره انتقال، مدیریت وضعیت بدنی دامها و نیز استفاده از برخی مکمل‌های غذایی ضررهای اقتصادی ناشی از کتوز تحت‌بالینی را در گله کاهش داد.

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان از آقای دکتر محمد قاسمی، مدیر محترم آزمایشگاه رویان پژوه شهرکرد، به جهت همکاری در انجام آزمایشات تحقیق حاضر، تقدیر و تشکر می‌نمایند.

فهرست منابع

1. Duffield T. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. Veterinary clinics of North America: Food animal practice. 2000 Jul 1; 16(2):231-53.
2. Gordon JL, LeBlanc SJ, Duffield TF. Ketosis treatment in lactating dairy cattle. The veterinary clinics of North America. Food animal practice. 2013 May 4; 29(2):433-45.
3. Enjalbert F, Nicot MC, Bayourthe C, Moncoulon R. Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. Journal of dairy science. 2001 Mar 1; 84(3):583-9.
4. Youssef MA, El-Khodery SA, El-deeb WM, Abou El-Amaiem WE. Ketosis in buffalo (Bubalus bubalis): clinical findings and the associated oxidative stress level. Tropical animal health and production. 2010 Dec 1; 42(8):1771-7.
5. Oetzel GR. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. Veterinary Clinics: Food Animal Practice. 2004 Nov 1; 20(3):651-74.
6. Weng X, Zhao W, Neethirajan S, Duffield T. Microfluidic biosensor for β-Hydroxybutyrate (βHBA) determination of subclinical ketosis diagnosis. Journal of nanobiotechnology. 2015 Dec 1; 13(1):13.
7. LeBlanc S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. Journal of reproduction and Development. 2010; 56(S):S29-35.
8. Voyvoda H, Erdogan H. Use of a hand-held meter for detecting subclinical ketosis in dairy cows. Research in veterinary science. 2010 Dec 1; 89(3):344-51.

9. Iwersen M, Klein-Jöbstl D, Pichler M, Roland L, Fidlschuster B, Schwendenwein I, Drillich M. Comparison of 2 electronic cowside tests to detect subclinical ketosis in dairy cows and the influence of the temperature and type of blood sample on the test results. Journal of dairy science. 2013 Dec 1; 96(12):7719-30.
10. Pichler M, Damberger A, Schwendenwein I, Gasteiner J, Drillich M, Iwersen M. Thresholds of whole-blood β-hydroxybutyrate and glucose concentrations measured with an electronic hand-held device to identify ovine hyperketonemia. Journal of dairy science. 2014b Mar 1; 97(3):1388-99.
11. Doré V, Dubuc J, Bélanger AM, Buczinski S. Evaluation of the accuracy of an electronic on-farm test to quantify blood β-hydroxybutyrate concentration in dairy goats. Journal of dairy science. 2013 Jul 1; 96(7):4505-7.
12. Pichler M, Damberger A, Arnholdt T, Schwendenwein I, Gasteiner J, Drillich M, Iwersen M. Evaluation of 2 electronic handheld devices for diagnosis of ketonemia and glycemia in dairy goats. Journal of Dairy Science. 2014a Dec 1; 97(12):7538-46.
13. Hoenig M, Dorfman M, Koenig A. Use of a hand-held meter for the measurement of blood beta-hydroxybutyrate in dogs and cats. Journal of veterinary emergency and critical care. 2008; 18: 86-7.
14. Byrne HA, Tieszen KL, Hollis S, Dornan TL, New JP. Evaluation of an electrochemical sensor for measuring blood ketones. Diabetes care. 2000 Apr 1; 23(4):500-3.
15. Šimundić AM. Measures of diagnostic accuracy: basic definitions. Medical and biological sciences. 2008 Jan 1; 22(4):61.
16. Whitaker DA, Smith EJ, Kelly JM. Some effects of nutrition and management on the fertility of dairy cattle. The Veterinary Record. 1993; 133(3): 61-64.
17. Padilla L, Shibano KI, Inoue J, Matsui T, Yano H. Plasma vitamin C concentration is not related to the incidence of ketosis in dairy cows during the early lactation period. Journal of veterinary medical science. 2005; 67(9): 883-886.
18. Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. Preventive veterinary medicine. 2000; 45(1-2): 23-41.
19. Mahrt A, Burfeind O, Voigtsberger R, Müller A, Heuwieser W. Evaluation of a new electronic handheld meter for measurement of β-hydroxybutyric acid in dairy cows. Tierarztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere. 2014; 42(1):5-10.
20. Bach KD, Heuwieser W, McArt JA. Comparison of 4 electronic handheld meters for diagnosing hyperketonemia in dairy cows. Journal of dairy science. 2016 Nov 1; 99(11):9136-42.
21. Carrier J, Stewart S, Godden S, Fetrow J, Rapnicki P. Evaluation and use of three cowside tests for detection of subclinical ketosis in early postpartum cows. Journal of dairy science. 2004 Nov 1; 87(11):3725-35.
22. Pineda A, Cardoso FC. Validation of a handheld meter for measuring β-hydroxybutyrate concentrations in plasma and serum from dairy cows. Journal of dairy science. 2015 Dec 1; 98(12):8818-24.
23. Fiorentin E, Tiecher A, Menegat C, Soares C, Aires A, Rocha R, Gonzalez FH. Accuracy of two hand-held electronic devices for determination of blood β-hydroxybutyrate in dairy cows. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. 2017 Jul; 18(3):439-45.