JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره سوم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۱
صفحات ۲۴۷-۲۳۵

تعیین ارزش تشخیصی لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز شیر در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی

عباس کلانتری[1*]، شهاب الدین صافی[1]، عباس رحیمی فروشانی[2]

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

۲- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، تهران، ایران

***نویسنده مسئول:** masoud_shamakhi@yahoo.com*

چکیده

امروزه شمارش سلولهای سوماتیک و کشت باکتریایی به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته می‌شود. شمارش سلولهای پیکری، دقت تشخیصی پایینی دارد و از طرفی آزمایشات باکتریولوژیک به عنوان یک تست روتین در تشخیص ورم‌پستان تحت بالینی مناسب نیستند. بنابراین برای شناسایی حیوانات مبتلا نیاز به مارکرهای جدیدی است که دارای درستی بالینی بالایی باشند. هدف از این مطالعه تعیین ارزش تشخیصی لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاوهای شیری بود. فعالیت این آنزیم‌ها در التهاب پستان افزایش می یابند و پتانسیل آن را دارند که به عنوان یک آزمایش غربالگر در تشخیص ورم‌پستان تحت بالینی استفاده شوند. تعداد ۱۴۵ راس گاو نژاد هلشتاین که از لحاظ بالینی سالم بودند، بطور تصادفی از ۷ گاوداری صنعتی در استان‌های تهران و مازندران انتخاب شدند. از این تعداد ۷۷ راس گاو بر اساس بالاتر بودن تعداد سلولهای سوماتیک از ۱۰۰×۱۰^{۳} cells/ml و مثبت شدن نتیجه کشت میکروبی نمونه شیر حداقل یک کارتیه آنها در گروه گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی قرار گرفتند. سرم خون و شیر چربی‌گرفته (سانترفیوژ شده در g ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در ^{O} ۴) جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها با استفاده از کیت‌های تجاری استفاده گردید. حساسیت و ویژگی تشخیصی و نقاط برش هر تست بوسیله منحنی راک تعیین گردید. میانگین و میانه فعالیت لاکتات‌دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی به طور بسیار معنی داری نسبت به گاوهای سالم بالاتر بود (P>۰/۰۰۱). لاکتات دهیدروژناز شیر، دقیق‌ترین تست با حساسیت تشخیصی ۹۴/۸% و ویژگی ۹۴/۱% در نقطه برش ۱۰۹ U/L بود. نتایج این مطالعه نشان داد که تعیین فعالیت لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز در شیر می تواند به عنوان یک روش قابل اعتماد در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: لاکتات دهیدروژناز، آلکالین فسفاتاز، ورم پستان تحت بالینی، گاو شیری

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 3(4)235-247, 2013

Determination of the diagnostic value of milk lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase in bovine subclinical mastitis

kalantari, A.[1*], Safi, S.[1], Rahimi Foroushani, A.[2]

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

2- Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences,Tehran, Iran

**** Corresponding author:*** kalantariabbas@yahoo.com

Abstract

Currently, somatic cell count (SCC) and bacterial culture is considered as the gold standard of detecting subclinical mastitis. However, the above-mentioned tests have a low diagnostic accuracy. Therefore, for identification of infected animals, new biomarkers with high clinical accuracy are needed. The objective of this study was to determine the diagnostic value of milk lactate dehydrogenase (LDH) and alkaline phosphatase (ALP) for the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. The activities of these enzymes increase during mastitis, which make them to be the potential biomarkers for screening of mastitis. A total of 145 clinically healthy cows were randomly selected. Of these, 77 cows were considered to be affected by subclinical mastitis based on a SCC higher than 100×1000 cells/ml of milk and positive bacterial culture results of milk samples obtained from at least one of the quarters. Enzymes activities were measured in blood serum and defatted milk (centrifuged at 5000¬ g for 15 min at 4^{O}) using commercial kits. Diagnostic sensitivity and specificity and cutoff points for each test were determined via receiver-operating characteristics curve. Significant ($P<0.001$) increases in the mean and median activities of LDH and ALP were found in the milk samples collected from cows with subclinical mastitis. Milk LDH had the most clinical accuracy with 94.8% sensitivity and 94.1% specificity at cutoff point of 109 U/L. The results of the present study showed that the measurement of LDH and ALP activities in milk samples could be used as reliable method for detection of bovine subclinical mastitis.

Key words: Lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase, subclinical mastitis, dairy cow

مقدمه

علی‌رغم پیشرفت‌های عظیم در ژنتیک، سیستم تغذیه، جایگاه و شرایط شیردوشی، در بیشتر گله‌های شیری پر تولید افزایش مشخصی در گروهی از بیماری‌های چند عاملی که تحت عنوان «بیماریهای مرتبط با تولید» شناخته می‌شوند وجود دارد (۷). در میان این بیماری‌ها، ورم پستان همچنان از جنبه اقتصادی مهمترین بیماری است که منجر به کاهش تولید شیر، هزینه‌های درمانی، منع مصرف شیر در خلال درمان (۳، ۲۱)، تغییر در بهداشت و کیفیت ترکیبات شیر، کاهش زاد و ولد، مرگ و حذف زود هنگام می‌گردد (۲۰، ۳۰، ۳۶). در واقع ورم پستان معمول‌ترین و از لحاظ اقتصادی مهمترین بیماری در صنعت پرورش گاو شیری است (۳۱). ورم پستان در دو فرم مختلف رخ می‌دهد، ورم پستان‌های بالینی و تحت بالینی. ورم پستان بالینی به علت ناهنجاریهای پستان، تغییرات ظاهری در شیر و همچنین علائم عمومی که ممکن است در گاوهای مبتلا دیده شود به آسانی قابل تشخیص است (۱). مشکل در موارد ورم پستان تحت بالینی است که هیچ تغییر ظاهری در پستان یا شیر ندارد و مخفی و درمان نشده باقی می‌ماند و سبب ضررهای اقتصادی شدیدی در اغلب نژادهای شیری می‌گردد (۱، ۱۰، ۲۷). بطوریکه ۸۰ –۷۰% از خسارتهای ناشی از تورم پستان را مربوط به آن می‌دانند (۱۴). ورم پستان تحت بالینی نه تنها سبب کاهش کمیت و کیفیت شیر می شود بلکه خطر انتقال بیماری به گاوهای سالم نیز وجود دارد بطوریکه عدم تشخیص به موقع این بیماری منجر به اپیدمی وسیع بیماری در گله و افزایش هزینه درمانی می‌گردد (۳، ۱۰، ۲۷، ۲۸). بنابراین بکارگیری تکنیک‌های کارآمدی که قادر باشند بیماری را در مراحل ابتدایی آن شناسایی نمایند از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۶، ۲۷). اگرچه برای تشخیص ورم پستان تحت بالینی آزمایشات مختلفی در شیر نظیر: شمارش سلولهای پیکری ، آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی، آزمایشات باکتریولوژیک، اندازه‌گیری هدایت الکتریکی، اندازه‌گیری لاکتوز و پلاسمین ، اندازه‌گیری پروتئین‌های فاز حاد و سنجش فعالیت آنزیم‌های شیر پیشنهاد شده است، واکنش‌های التهابی که بوسیله عفونت‌ها در بافت پستانی ایجاد می‌شود غالباً بوسیله شمارش سلولهای سوماتیک در شیر سنجیده می‌شود (۳۴). باید به این نکته توجه کرد که این روش، فاقد ویژگی کافی است زیرا مقادیر بالای آن لزوماً بیانگر ورم پستان نمی‌باشد و علاوه بر آن فاکتورهای دیگری نیز می‌توانند شمارش سلولهای پیکری را تحت تاثیر قرار دهند (۲، ۲۷، ۲۹). از سوی دیگر برای اینکه این آزمایش به عنوان یک تست غربالگر در تشخیص کارتیه‌های آلوده در گله گاوهای شیری استفاده شود حساسیت کافی ندارد (۳، ۲۸، ۲۹). همچنین روش استاندارد برای شمارش سلولهای پیکری روش الکترواپتیکال فوزوماتیک است که در بسیاری از کشورهای در حال توسعه فقط محدود به آزمایشگاهای مرجع است (۴، ۲۷). امروزه شمار سلول‌های سوماتیک شیر به همراه کشت باکتریایی به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص ورم پستان تحت‌بالینی در نظر گرفته می‌شود (۳، ۲۷، ۳۲، ۳۴). اما آزمایش‌های باکتریولوژیک نیز به دلیل پرهزینه و وقت‌گیر بودن، به عنوان یک تست روتین در تشخیص ورم پستان تحت بالینی مناسب نیستند (۲۷، ۲۸). بنابراین جهت تشخیص زودهنگام ورم پستان تحت بالینی نیاز به بیومارکرهای جدیدی است که نه تنها دارای دقت تشخیصی بالایی باشند بلکه با استفاده از تکنیک‌های روتین به آسانی و سریع تعیین گردند (۳، ۲۷). اخیراً کاربرد پروتئین‌های فاز حاد در بررسی و مدیریت سلامت حیوان مورد توجه فراوان قرار گرفته است (۱۳، ۱۸، ۳۳). تحقیقات زیادی نیز در زمینه تشخیص پروتئین‌های فاز حاد در شیر انجام شده و مشخص گردیده که اندازه‌گیری این پروتئین‌ها در شیر ارزش تشخیصی دارد ولی به دلیل پرهزینه بودن کیت‌های تشخیصی این پروتئین ها، استفاده از آنها به عنوان روش‌های رایج نیاز به زمان دارد (۱، ۱۶، ۲۶). سالهاست که به استفاده از آنزیم‌های مختلف در شیر به

عنوان بیومارکرهایی جهت شناسایی ورم پستان توجه شده است و مشخص گردیده که تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های شیر دارای پتانسیل تشخیصی برای ورم پستان است (۹، ۲۰). چرا که برخی از آنزیم‌های شیر نظیر لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز در التهاب پستان افزایش می یابند و پتانسیل آن را دارند که به عنوان یک آزمایش غربالگر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی استفاده شوند (۶، ۷، ۱۴، ۱۷، ۳۶). هجوم لکوسیت‌های چند هسته‌ای و ماکروفاژها یکی از دفاع‌های ضروری بدن در برابر التهاب پستان است. در طی روند التهابی، این سلولها و سلولهای آسیب دیده اپیتلیوم پستان و سلولهای بینابینی، فراورده‌هایی ترشح می کنند که دربردارنده آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌باشند. برخی از این آنزیم‌ها همچون لاکتات دهیدروژناز جز آنزیم‌های غیر لیزوزومی‌اند و برخی دیگر لیزوزومی‌اند (۶، ۲۵). لاکتات دهیدروژناز آنزیم سیتوپلاسمی است که به عنوان بیومارکری جهت بررسی سلامت پستان پیشنهاد شده است (۲، ۶، ۷، ۱۱، ۳۶). تحقیقات نشان داده که فعالیت این آنزیم بطور معنی‌داری در شیرهای اخذ شده از کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی افزایش می‌یابد (۶، ۷، ۱۱، ۱۴، ۳۶) و میزان فعالیت این آنزیم در شیر همبستگی زیادی با سلولهای سوماتیک به خصوص در کارتیه های مبتلا به ورم پستان دارد (۱۱، ۱۴، ۳۷). همچنین تحقیقات نشان داده که فعالیت آلکالین فسفاتاز بطور معنی‌داری در شیر کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی نسبت به کارتیه‌های سالم افزایش می یابد (۵، ۸، ۱۹، ۳۷) و میزان فعالیت آن با سلولهای سوماتیک همبستگی مثبت دارد (۵، ۳۷). منشا فعالیت لاکتات دهیدروژناز افزایش یافته ناشی از لکوسیت‌هایی است که در شیر ورم پستانی یافت می شوند (۱۴) و همچنین سلولهای اپیتلیوم پستانی و بینابینی که در طی روند التهابی آسیب دیده‌اند (۶، ۹). اگرچه اهمیت سلولهای اپیتلیال آسیب دیده برای فعالیت لاکتات دهیدروژناز در شیر مشخص نیست (۱۴)، منشا افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز از لکوسیتها و سلولهای اپیتلیال پستانی و سلولهای بافت بینابینی آسیب دیده در طی التهاب و خصوصاً ناشی از لکوسیت های تخریب شده است (۵، ۱۹). هدف از این تحقیق تعیین ارزش تشخیصی لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز شیر در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بود. در حال حاضر روشهای معمول که جهت شناسایی ورم پستان تحت بالینی استفاده می شوند چندان موثر نیستند. نتایج این تحقیق نشان داد که اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های شیر میتواند به عنوان یک روش تشخیصی با حساسیت و ویژگی قابل قبول جهت شناسایی زود هنگام کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش کار

نحوه انتخاب حیوانات و نمونه‌گیری شیر: تعداد ۱۴۵ راس گاو نژاد هلشتاین به طور تصادفی از ۷ گاوداری صنعتی در استانهای تهران و مازندران، ایران انتخاب شدند. گاوهای مورد مطالعه در دوره شیرواری به سر می‌بردند و سه مرتبه در روز با استفاده از ماشین شیردوشی مورد دوشش قرار می‌گرفتند. 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 ندادند. به علاوه گاوهایی که در اواخر دوره آبستنی و یا اوایل دوره شیرواری بودند نیز از این مطالعه خارج شدند. تمامی گاوهای مورد مطالعه بطور مشابه از سیلوی ذرت، کنسانتره و کاه و یونجه تغذیه می شدند. جهت نمونه‌گیری، قبل از دوشش ظهر ابتدا کارتیه‌های هر گاو با آب ولرم بطور کامل شستشو و خشک گردیدند.. سپس انتهای سرپستانک‌ها با الکل اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و خشک گردیدند. سپس پس از دور ریختن سه دوشش اول

نمونه‌های شیر در سه قسمت اخذ گردید. یک قسمت جهت آنالیز شمارش سلولهای سوماتیک ارسال گردید. قسمتی از شیر جهت سنجش فعالیت آنزیم‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه کلینیکال پاتولوژی پلی‌کلینیک تخصصی حیوانات خانگی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران منتقل و بلافاصله خامه آن بطور کامل گرفته شد و تا مشخص شدن نتایج کشت میکروبی و شمارش سلولهای پیکری، شیر چربی گرفته در ۲۰°C- فریز گردید. نمونه‌های شیر جهت آزمایشات باکتریولوژی در فالکون‌های استریل جمع آوری و در مجاورت یخ، بلافاصله به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران منتقل شد. همچنین جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها در سرم، بطور همزمان یک نمونه خون از ورید وداج هر گاو توسط لوله‌های خلاء (Vacutainer tubes) گرفته شد و بلافاصله به آزمایشگاه ارسال گردید تا سرم جدا گردد. نمونه‌های سرم بدون همولیز تا زمان آنالیز در ۲۰°C- فریز گردید. در این مطالعه نقطه برش $10^3 \times 100$ cells/ml برای سلولهای سوماتیک شیر، به منظور تفکیک گاوهای سالم از گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته شد. گاوهایی که حداقل، شیر یکی از کارتیه‌های آنها دارای شمار سلولهای پیکری بالاتر از $10^3 \times 100$ cells/ml و نتیجه کشت باکتریایی آنها نیز مثبت بود، به عنوان مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته شدند. همچنین گاوهایی که شمار سلولهای پیکری شیر هر چهار کارتیه آنها پایین‌تر از $10^3 \times 100$ cells/ml و نتایج کشت باکتریایی آنها نیز منفی بود به عنوان گاوهای سالم (گروه کنترل) در نظر گرفته شدند. در گاوهای سالم، شیر هر چهار کارتیه با هم مخلوط و به عنوان یک نمونه (Composite milk) جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها در نظر گرفته شد.

شمارش سلولهای پیکری و کشت باکتریایی شیر: شمارش سلول‌های پیکری در نمونه‌های شیر با استفاده از دستگاه شمارشگر سلولی فوزوماتیک (Fossomatic 5000; Foss Electric, Hillerød, Denmark) انجام پذیرفت. کشت باکتریایی نمونه‌های شیر در محیط آگار خون‌دار، مک کانکی آگار و محیط‌های کروم آگار (CHROM agar ™ Mastitis; GP & GN) انجام شد که جهت تایید تشخیص از محیط‌های کشت افتراقی بر طبق استانداردهای موسسه ملی ورم پستان استفاده گردید (National Mastitis Council, 1999).

سنجش فعالیت آنزیم‌های شیر: چربی نمونه‌های شیر بوسیله سانترفیوژ در ۵۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه در ۴°C جدا گردید. سرم خون و شیر چربی گرفته جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت لاکتات‌دهیدروژناز با استفاده از روش DGKC بر اساس واکنش

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{lactate} + \text{NAD}^+$$

همچنین فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به روش DGKC، بر اساس واکنش

$$\text{p-Nitrophenylphosphate} + \text{H}_2\text{o} \xrightarrow{\text{ALP}} \text{p - Nitrophenol} + \text{Phosphate}$$

بوسیله‌دستگاه‌اتوآنالایزر(AutoanalyzerBT1500,ROMA,ITALIA) و با استفاده از کیت شرکت فراسامد- ایران اندازه‌گیری گردید. در نمونه‌هایی که غلظت آنزیم‌ها از محدوده خطی کیت خارج بود، نمونه‌ها با سرم فیزیولوژی (کلرور سدیم ۹ گرم در لیتر) به نسبت ۱:۱۰ طبق دستورالعمل بروشور کیت کارخانه سازنده رقیق شده و نتیجه در ۱۰ ضرب گردید.

آنالیز آماری: آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. در ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف یک نمونه‌ای مشخص گردید که توزیع داده‌های مربوط به لاکتات دهیدروژناز سرم نرمال بود. همچنین این آزمون نشان داد که داده‌های مرتبط با سلولهای پیکری، لاکتات دهیدروژناز شیر و آلکالین فسفاتاز در شیر و سرم توزیع نرمالی ندارند. بنابراین از آزمون من ویتنی به منظور مقایسه میانگین داده‌های با توزیع غیر نرمال و از آزمون T نمونه‌های مستقل جهت مقایسه میانگین

فعالیت لاکتات‌دهیدروژناز سرم بین گاوهای سالم و گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی استفاده شد. همچنین جهت بررسی همبستگی بین پارامترهای مورد نظر از ضریب همبستگی اسپیرمن استفاده گردید. نقطه برش مطلوب برای فعالیت آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز در شیر و سرم به نحوی که بالاترین حساسیت و ویژگی تشخیصی را پیشنهاد دهند بوسیله منحنی راک با در نظر گرفتن شمارش سلول‌های سوماتیک و کشت باکتریایی شیر به عنوان استاندارد طلایی انجام پذیرفت. سطح زیر منحنی به منظور ارزیابی کارایی هر تست مورد استفاده قرار گرفت به طوری که سطح زیر منحنی بین ۰/۷ – ۰/۵ بیانگر درستی بالینی پایین، سطح زیر منحنی بین ۰/۹ – ۰/۷ بیانگر درستی بالینی متوسط و سطح زیر منحنی بالاتر از ۰/۹ نشان دهنده درستی بالینی بالا برای هر تست تشخیصی در نظر گرفته شد (۱۲). سطح زیر منحنی تست‌های 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 معنی‌داری $\alpha = 0.05$ مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

از ۱۴۵راس گاو انتخاب شده در این مطالعه، ۷۷ گاو بر اساس شمارش سلولهای پیکری بالاتر از 100×10^3 cells/m و نتیجه کشت باکتریایی مثبت در نمونه شیر حداقل یکی از کارتیه‌ها، مبتلا به ورم‌پستان تحت بالینی در نظر گرفته شدند. همچنین ۶۸ گاو بر اساس شمارش سلولهای پیکری پایین‌تر از 100×10^3 cells/m و نتایج کشت باکتریایی منفی در نمونه‌های شیر گرفته شده از هر ۴ کارتیه، سالم در نظر گرفته شدند. در ۷۷ نمونه شیر مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، استرپتوکوکوس یوبریس از ۲۰ نمونه (۲۵/۹۷%)، استافیلوکوکوس آرئوس از ۱۸ نمونه (۲۳/۳۸%)، استرپتوکوکوس آگالاکتیه و اشریشیاکولی از ۱۴ نمونه (۱۸/۱۸%) و استرپتوکوکوس دیس‌گالاکتیه از ۱۱ نمونه (۱۴/۲۹%) جدا شدند. آمار توصیفی پارامترهای مورد مطالعه در سرم و شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در جدول (۱) آورده شده است. میانگین و میانه فعالیت لاکتات دهیدروژناز شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی به طور بسیار معنی‌داری نسبت به گاوهای سالم بالاتر بود (P<۰/۰۰۱). همچنین میانگین و میانه فعالیت آلکالین فسفاتاز شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی به طور بسیار معنی‌داری نسبت به گاوهای سالم بالاتر بود (P<۰/۰۰۱). در حالیکه میانگین فعالیت لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز در سرم گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی تفاوت معنی‌داری با گاوهای سالم نداشت (P=۰/۷۷۵ و P=۰/۸۷۳). همچنین میان فعالیت آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز در شیر و شمار سلولهای پیکری بطور بسیار معنی‌داری (P/۰۰۱>۰) همبستگی مثبت وجود داشت. حساسیت، ویژگی، درستی بالینی (سطح زیر منحنی) و نقطه برش آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز شیر و سرم در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو در جدول(۲) به نمایش در آمده است. نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت لاکتات‌دهیدروژناز شیر در نقطه برش ۱۰۹ U/L، حساسیت ۹۴/۸% و ویژگی ۹۴/۱% و فعالیت آلکالین‌فسفاتاز شیر در نقطه برش ۴۰۹ U/L، حساسیت ۸۳/۱% و ویژگی ۷۷/۹% در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو شیری داشتند. همچنین آزمون مک نمار نشان داد که این دو نقطه برش از نظر تشخیصی با یکدیگر توافق داشتند (P=۰/۵۹۷). غلظت‌های لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز سرم واجد درستی بالینی پایینی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو شیری بودند (جدول ۲) و لذا پارامترهای مناسبی جهت تشخیص ورم پستان تحت بالینی نمی‌باشند.

جدول ۱- آمار توصیفی برای لاکتات‌دهیدروژناز شیر، لاکتات‌دهیدروژناز سرم، آلکالین فسفاتاز شیر و آلکالین فسفاتاز سرم در گاوهای هلشتاین سالم (n=۶۸) و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی (n=۷۷) با در نظر گرفتن کشت باکتریایی و نقطه برش ۱۰۰×۱۰^{۳} cells/ml برای سلولهای سوماتیک

پارامتر(U/L)	تعداد سلولهای سوماتیک (×۱۰۰۰/cells/ml)	کشت میکروبی شیر	میانگین±انحراف از میانگین	میانه	حداقل- حداکثر	P-Value
لاکتات دهیدروژناز شیر	<۱۰۰	−	۵۴ ± ۴	۴۶	۱۴-۲۱۲	<۰/۰۰۱*
	>۱۰۰	+	۸۳۹ ± ۱۱۳	۵۰۴	۸۰-۴۸۵۵	
آلکالین فسفاتاز شیر	<۱۰۰	−	۳۰۰±۲۳	۲۵۹/۵۰	۶۴-۹۳۷	<۰/۰۰۱*
	>۱۰۰	+	۹۱۸ ± ۶۹	۷۹۳	۱۷۳-۳۹۸۰	
لاکتات-دهیدروژناز سرم	<۱۰۰	−	۱۶۰۲ ±۴۴۰	۱۵۸۷	۷۵۲-۲۴۱۱	۰/۷۷۵**
	>۱۰۰	+	۱۶۲۳ ± ۴۴۶	۱۶۱۱	۶۷۹-۲۴۵۱	
آلکالین فسفاتاز سرم	<۱۰۰	−	۱۲۱ ± ۷	۱۰۶	۵۵-۴۰۵	۰/۸۷۳*
	>۱۰۰	+	۱۱۹ ± ۷	۱۰۷	۵۴-۴۷۶	

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

جدول۲ – نقاط برش پیشنهادی، حساسیت، ویژگی و درستی بالینی (سطح زیر منحنی) لاکتات‌دهیدروژناز شیر، لاکتات دهیدروژناز سرم، آلکالین فسفاتاز شیر و آلکالین فسفاتاز سرم در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو بر اساس نقطه برش $cells/ml$ ۱۰۰×۱۰^{۳} برای سلولهای سوماتیک و نتایج کشت میکروبی

پارامتر	نقطه برش(U/L)	حساسیت (با محدوده اطمینان ۹۵٪)	ویژگی (با محدوده اطمینان ۹۵٪)	درستی بالینی(سطح زیر منحنی)
لاکتات‌دهیدروژناز شیر	۱۰۹/۵	۹۴/۸	۹۴/۱	۰/۹۹۲[a]
لاکتات‌دهیدروژناز سرم	۴۰۹/۵	۸۳/۱	۷۷/۹	۰/۸۹۵[a]
آلکالین فسفاتاز شیر	۱۲۸۵/۵	۷۴	۲۹/۴	۰/۵۲۰[b]
آلکالین فسفاتاز سرم	۸۶/۵	۷۴	۲۶/۵	۰/۴۹۲[b]

* تنها نقاط برشی که دارای حروف مشابه در بالای خود هستند از نظر تشخیصی با یکدیگر توافق دارند (آزمون مک‌نمار)

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج باکتریولوژیک گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی این مطالعه، نشان دهنده باکتری‌های معمولی است که بطور رایج از شیر کارتیه گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی جدا می‌گردد. پاتوژن‌های واگیر مسبب ورم پستان که در این تحقیق جدا شدند عبارت بودند از استرپتوکوکوس آگالاکتیه (۱۸/۱۸%) و استافیلوکوکوس آرئوس(۲۳/۳۸%). همچنین پاتوژن‌های محیطی جدا شده عبارت بودند از استرپتوکوکوس یوبریس (۲۵/۹۷%)، استرپتوکوکوس دیس‌گالاکتیه (۱۴/۲۹%) و اشریشیا کولی (۱۸/۱۸%). نتایج این تحقیق نشان داد که میانگین فعالیت لاکتات دهیدروژناز شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بطور بسیار معنی‌داری نسبت به گاوهای سالم بالاتر بود (P<۰/۰۰۱) که این یافته با نتایج تحقیق سایر محققین همخوانی دارد (۶، ۷، ۱۱، ۱۴، ۳۶). همچنین میان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در شیر و شمار سلولهای پیکری بطور بسیار معنی داری (P<۰/۰۰۱) همبستگی مثبت وجود داشت که قبلاً توسط محققین دیگر گزارش شده بود (۱۱، ۱۴، ۳۷). همچنین میانگین فعالیت آلکالین فسفاتاز شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی بطور بسیار معنی‌داری نسبت به گاوهای سالم بالاتر بود (P<۰/۰۰۱) و میان فعالیت این آنزیم در شیر و شمار سلولهای پیکری بطور بسیار معنی داری (P<۰/۰۰۱) همبستگی مثبت وجود داشت که این یافته ها نیز با نتایج سایر محققین همخوانی داشت (۵، ۸، ۱۹، ۳۶، ۳۷). در حالیکه میانگین غلظت این آنزیم‌ها در سرم گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی تفاوت معنی داری با گاوهای سالم نداشت (P<۰/۰۵) که مشابه چنین یافته‌ای توسط باتوانی و همکاران در سال ۲۰۰۳ و ۲۰۰۷ گزارش شده بود. در این مطالعه درستی بالینی لاکتات دهیدروژناز و آلکاین فسفاتاز در شیر و سرم در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو با در نظر گرفتن شمارش سلولهای سوماتیک و کشت باکتریایی شیر به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص این بیماری تعیین

گردید که لاکتات دهیدروژناز شیر در نقطه برش پیشنهادی ۱۰۹ U/L بالاترین حساسیت(۹۴/۸%)، ویژگی (۹۴/۱%) و درستی بالینی (۰/۹۹۲) را در تشخیص ورم پستان تحت بالینی از خود نشان داد. همچنین آلکالین فسفاتاز شیر در نقطه برش ۴۰۹ U/L واجد حساسیت ۸۳/۱% و ویژگی ۷۷/۹% و درستی بالینی ۰/۸۹۵ بود. سیمونز و رایت در سال۱۹۷۴پیشنهاد داده بودند که فعالیت لاکتات دهیدروژناز شیر می تواند به عنوان شاخص حساسی از تغییرات التهابی غده پستان در نظر گرفته شود. کاتسولوس و همکارانش در سال۲۰۱۰ گزارش کردند که فعالیت لاکتاتدهیدروژناز در نقطه برش ۱۹۷ U/L برای گوسفند و نقطه برش ۱۸۵ U/L برای بز به ترتیب در گوسفند و بز دارای حساسیت ۹۲/۸% و ۹۸/۲% و ویژگی ۹۵/۴% و ۹۶/۳% و اندازه‌گیری فعالیت لاکتات دهیدروژناز در میان سایر آنزیم‌ها روشی حساس و و قابل اطمینان در تشخیص ورم پستان تحت‌بالینی بود. شاگاندا و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز همبستگی زیادی با شمار سلولهای پیکری خصوصاً در نمونه‌های شیر مبتلا به ورم پستان بالینی داشت، همچنین فعالیت این آنزیم حساسیت بالاتری از ان- استیل- بتا - گلوکوزامینیداز (NAGase) در شناسایی ورم پستان داشت. اکرشتد و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که لاکتات دهیدروژناز در میان تمام بیومارکرهای ورم پستان کمترین اختلاف (variation) را داشت. هیس و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش نمودند لاکتات دهیدروژناز پارامتر مفیدی برای تشخیص ورم پستان تحت بالینی می‌باشد. یانگ و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش کردند که اندازه‌گیری فعالیتهای لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز در شیر می‌تواند روش تشخیصی مناسبی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته شود. این نتایج، متفاوت با تحقیقات بابایی و همکاران در سال ۲۰۰۷ است که گزارش نمودند فعالیت لاکتات دهیدروژناز پارامتر حساس و مناسبی جهت تشخیص زود هنگام ورم پستان تحت بالینی نمی‌باشد و تنها آلکالین فسفاتاز دارای حساسیت بالایی در این خصوص است. در تحقیق حاضر لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز سرم در تشخیص ورم پستان تحت بالینی از درستی بالینی پایینی برخوردار بودند و لذا نمی توانند به عنوان شاخص مناسبی در بررسی التهاب پستان بکار گرفته شوند.

التهاب پستان به چندین روش می تواند بر ترکیبات شیر تاثیر گذارد، بر اثر افزایش نفوذ پذیری سد خون- شیر پروتئین‌های سرم به داخل شیر نشت کنند. علاوه بر این سلولهای اپیتلیال آسیب دیده منجر به آزاد شدن ترکیبات داخل سلولی به شیر شوند و در نهایت سنتز ترکیباتی که اختصاصاً توسط اپیتلیوم پستانی تولید می شود کاهش یابند (۱، ۲۲). عفونت داخل پستانی نفوذپذیری عروق خونی کوچک را بوسیله ترشح واسطه‌های شیمیایی مختلف نظیر هیستامین، پروستاگلندین، کینین و رادیکالهای آزاد اکسیژن از سلولهای التهابی افزایش می دهد (۱۵). منشا فعالیت لاکتات دهیدروژناز افزایش یافته ناشی از لکوسیت‌هایی است که در شیر ورم پستانی یافت می شوند (۱۴). همچنین سلولهای اپیتلیوم پستانی و بینابینی که در طی روند التهابی آسیب دیده‌اند می‌باشد (۶، ۹). منشا افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز از لکوسیتها و سلولهای اپیتلیال پستانی و سلولهای بافت بینابینی آسیب دیده در طی التهاب و خصوصاً ناشی از لکوسیت های تخریب شده است (۵، ۱۹). همچنین از آنجاییکه سد خونی - شیری بر اثر عفونت آسیب می بیند لذا این احتمال نیز وجود دارد که لاکتات دهیدروژناز یا آلکالین فسفاتاز از خون به شیر منتقل شوند (۶). در حالی که باتوانی و همکارانش نشان دادند سرم خون منبع قابل توجهی از این آنزیم ها در شیر نبوده، بلکه به احتمال زیاد از لکوسیتهای تخریب شده و سلولهای پارانشیمی پستان آزاد می‌شوند. اگرچه اهمیت سلولهای اپیتلیال آسیب دیده برای فعالیت لاکتات دهیدروژناز در شیر مشخص نیست (۱۴). تحقیقات ما نیز نشان داد که همبستگی مثبت و بسیار

معنی داری میان لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز شیر با سلولهای سوماتیک وجود دارد و از سویی افزایش معنی‌داری در فعالیت این آنزیم‌ها در سرم خون گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی نسبت به گاوهای سالم دیده نمی شود. امروزه شمار سلول های سوماتیک شیر به همراه کشت باکتریایی به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص ورم پستان تحت‌بالینی در نظر گرفته می‌شوند (۱، ۲۸، ۳۲، ۳۴). باید توجه کرد که شمارش سلولهای پیکری، فاقد ویژگی کافی است زیرا مقادیر بالای آن لزوماً بیانگر ورم پستان نمی باشد. به عبارت دیگر تعداد سلول های سوماتیک علاوه بر التهاب پستان تحت تاثیر بسیاری عوامل دیگر نظیر تعداد دوره‌های شیرواری گاو، مرحله شیرواری، میزان تولید شیر، فصل، سن و نژاد گاو نیز قرار دارد (۳، ۲۷، ۲۹). از سوی دیگر برای اینکه این آزمایش به عنوان یک تست غربالگر در تشخیص کارتیه‌های 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 (۳، ۲۹). در ضمن تعدادشان در چند روز نخست شیرواری افزایش یافته و ممکن است تا اولین ماه شیرواری بالا بماند (۱، ۲۳). از سویی روش استاندارد برای شمارش سلولهای پیکری روش الکترواپتیکال فوزوماتیک است که در بسیاری از کشورهای در حال توسعه فقط محدود به آزمایشگاهای مرجع است (۴، ۲۷). 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. همچنین یکبار کشت باکتریایی نمی‌تواند همه کارتیه های عفونی را نشان دهد. همچنین پرهیز از آلودگی در حین نمونه‌گیری مشکل بوده و از سویی احتمال نتایج منفی کاذب در کارتیه‌هایی که بطور مزمن آلوده‌اند وجود دارد (۶). لذا در تشخیص زودهنگام ورم پستان تحت بالینی نیاز به شاخص‌های التهابی در شیر است که بتوانند با استفاده از تکنیک‌های روتین آسان، قابل اطمینان و سریع اندازه‌گیری گردند (۲۷). تحقیقات زیادی در زمینه تشخیص پروتئین‌های فاز حاد در شیر انجام شده و مشخص گردیده که اندازه‌گیری این پروتئین ها در شیر ارزش تشخیصی دارد ولی به دلیل پرهزینه بودن کیت‌های تشخیصی این پروتئین ها، استفاده از آنها به عنوان روش‌های رایج نیاز به زمان دارد (۱، ۱۶، ۲۶). سالهاست که به استفاده از آنزیم‌های مختلف در شیر به عنوان بیومارکرهایی جهت شناسایی ورم پستان توجه شده است و مشخص گردیده که تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های شیر دارای پتانسیل تشخیصی برای ورم پستان بالینی و تحت بالینی است (۹، ۲۰). تحقیقات حاضر نشان می دهد اندازه‌گیری فعالیت آنزیم های لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز شیر که هم آسان و هم کم هزینه‌تر از سایر روش هاست میتواند به عنوان یک روش تشخیصی با حساسیت و ویژگی قابل قبول جهت شناسایی کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی مورد استفاده قرار گیرد. ضمن آنکه بر خلاف سایر روش های روتین تشخیصی ورم پستان، در ابتدای شیرواری و جهت غربال حیوانات جهت درمان انتخابی دوره خشک نیز مناسب می باشد (۶).

تحقیقات ما نشان داد که اندازه‌گیری لاکتات‌دهیدروژناز واجد درستی بالینی، حساسیت و ویژگی بالا در تشخیص ورم پستان تحت بالینی می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک روش قابل اطمینان جهت تشخیص ورم پستان تحت‌بالینی گاو مورد استفاده قرار گیرد. لذا اندازه‌گیری لاکتات‌دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز و خصوصاً لاکتات دهیدروژناز شیر این پتانسیل را دارد که بتواند جایگزین شمارش سلولهای پیکری و یا به عنوان آزمایشی مکمل در کنار آن بکار رود تا با تشخیص زودهنگام از خسارات هنگفتی که این بیماری به صنعت گاو شیری می‌زند تا حد زیادی کاسته شود.

References

1- Akerstedt, M. (2008) Bovine acute phase proteins in milk – Haptoglobin and Serum Amyloid A as Potential Biomarkers for Milk Quality. Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences. 16:1-55.

2- Akerstedt, M., Forsbäck L., Larsen T., Svennersten-Sjaunja K. (2011) **Natural variation in biomarkers indicating mastitis in healthy cows**. J Dairy Res. 78 (1) 88-96.

3-Akerstedt, 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 (6) 669-674.

4- Akerstedt M., Persson Waller K., Sternesjo A. (2007) Haptoglobin and serum amyloid A in relation to the somatic cell count in quarter, cow composite and bulk tank milk samples. J Dairy Res. 74 (2) 198-203.

5- Anirban G., Sandeep G., and Anshu S., (2012) Evaluation of milk trace elemants, lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activity of subclinical mastitis as indicaror of SCM in riverine buffalo, Asian - Aust.J.Animi.Sci. 25 (3) 53-360.

6- Babaei H.,Mansouri - Najand L., Molaei M.M., Kheradmand A., Sharifian M. (2007) Assessment of lacate dehydrogenase ,alkaline phosphatase and aspatate aminotransferase activities in cow's milk as an indicator of subclinical mastitis. Veterinary Research Communications. 31:419-425.

7- Batavani R.A., Asri S., Naebzadeh H. (2007) The effect of subclinical mastitis on milk composition in dairy cows. 8 (3) 205-211.

8- Batavani R.A., Mortaz E., Falahian K., Dawoodi M.A. (2003) Study on frequency ,etiology and some enzymatic activities of subclinical ovine mastitis in urmia.Iran.Small Ruminant Research. 50 (1) 45-50.

9- Bogin, E. and Ziv, G. (1973) Enzymes and minerals in normal and mastitic milk. Cornell Veterinarian. 63 (4) 666–676.

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

11- Chagunda M.G., Larsen T., Bjerring M., Ingvartsen K.L. (2006) L-lactate dehydrogenase and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis.J Dairy Res. 73 (4) 431-440.

12- 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(1) 8–17.

13- Hirvonen J., Eklund K., Teppo, A.M., Huszenica G., Kulcsar, M., Saloniemi, H., Pyorala, S. (1999) Acute phase respose in dairy cows with experimentally induced Escherichia coli mastitis. Acta Vet Scand. 40 (1) 35-46.

14- Hiss, S., Muellrr, U., New-Zahren, A., Sauerwein, H. (2007) Haptoglobin and Lactate dehydrogenase measurements in milk for the identification of subclinically diseased udder quarters.Veterinarni Medicina.52 (6) 245-252.

15- Honkanen-Buzalski, T. and Sandhom, M. (1981) Trypsin inhibitors in mastitic milk and colostrums:

correlation between trypsin inhibitor capacity, bovine serum albumin and somatic cell content. Journal of Dairy Research.233–213 (2) 48 .

16- Hulten C., Sletten K., Foyn Bruun C., Marhaug G. (1997) The acute phase serum amyloid A in the horse: isolation and characterization of three isoforms. Vet Immunol Immunopathol. 57 (3-4) 215-227.

17- Ibtisma, E.M., Zubeir, E.L.,Owni, O.A., Mohamed, G.E. (2005) Correlation of minerals and enzymes in blood serum and milk of healthy and mastitic cows.research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 1(1) 45-49.

18- Kaneko, J., Harwey, J.W., Bruss, M.L. (2008) Clinical biochemistry of domestic animals University of California, Davis,America., 135-141.

19- Katsoulos, P.D., Christodoulopoulos, A., Minas, M.A. Karatzia, K., Pourliotis and S. K. (2010) The role of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase in the diagnosis of subclinical intramammary infections in dairy sheep and goats. J. Dairy Res. 77 (1) 107-111.

20- Kitchen, B. (1981) Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. J Dairy Res. 48:167-188.

21- Leslie, K.E., Dingwell, R.T. (2000). Mastitis control: where are we and where are we going? In: Andrews, AH (Ed.), The health of dairy cattle. (1st. Edn.), Malden, Blackwell Series. PP:370-381.

22- Mattila, T., Saari, S., Vartiala, H., Sandholm, M. (1985) Milk antitrypsin as a marker of bovine mastitis:correlation with bacteriology. Journal of Dairy Science. 68 (1) 114–122.

23- Middleton, J.R., Hardin, D., Steevens, B., Randle, R., Tyler, J.W. (2004) Use of somatic cell counts and California mastitis test results from individual quarter milk samples to detect subclinical intramammary infection in dairy cattle from a herd with a high bulk tank somatic cell count. J Am Vet Med Assoc. 224 (3) 419-423.

24- National Mastitis Council (1990) Microbioө logicalprocedures for the diagnosis of bovine udder infection.3rd Ed. National Mastitis Council, Inc. Arlington,VA.

25- Oliszewski, R., Nunez, D., Kairuz M.S., Gonzalez D. E., Oliver G. (2002) Assessment of βglucuronidase level in goat,s milk as an indicator of mastitis:Comparison with other mastitis detection methods. Journal of Food Protection. 65:864-866.

26- Peltola H.O. (1982) C-reactive protein for rapid monitoring of the central nervous system. Lancet. 1 (1) 980-982.

27- Pyörälä, S. (2003) Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis.Veterinary Research 34 (5) 565-578.

28- 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 (4) 471-476.

29- Schepers, A.J., Lam, T., Schukken, Y.H., Wilmink JBM., Hanekamp, WJA. (1997) Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. Journal Dairy Sci. 80 (8) 1833-1840.

30- Schrick, K.N., Hockert, M.E., Saxton, A.M., Lewis, M.J., Dowlen, H.H., Oliver, S. (2001) Influence of sub clinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. J. Dairy Sci. 84 (6) 1407-

1412.

31- Seegers, H., Fourichon, C., Beaudeau, F. (2003) Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Vet Res. 34 (5) 475-491.

32- 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 (2) 569-576.

33- Skinner J.G. (2001) International standardization of acute phase proteins. Vet Clin Pathol. 30 (1) 1-6.

34- 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 (4) 1221-32.

35- Symons, D.B., Wright, L.J. (1974) Changes in bovine mammary gland permeability after intramammary exotoxin infusion. Journal of Comparative Pathology 84 (1) 9–17.

36- Yang, F.L., Xiao, S., Bao, X.H., Yang, X.L., Gong, H.L., Ping, L.,Qin, H., Xi, M., Jin L. (2011) Malondialdehyde level and some enzymatic activities insubclinical mastitis milk. African Journal of Biotechnology 10 (28) 5534-5538.

37- Yang, D., Yao, X., Cao, S., Yu, S., Liu, C. (2009) Enzymes in cow milk as diagnostic indicator of subclinical mastitis. Journal of Northwest A & F University Natural Science 37 (10) 43-46.