

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

عباس کلانتری*

گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

*نویسنده مسئول: drkalantari.abbas@gmail.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۹/۳۰ پذیرش نهایی: ۱۴۰۴/۱/۱۶)

چکیده

ورم پستان شایعترین و پرضررترین مشکل گله‌های گاوهای شیری در سراسر دنیا است. از طرفی استرپتوکوک‌های محیطی نظیر استرپتوکوکوس یوبریس به یکی از مهمترین عوامل ورم پستان در گاوهای شیرده تبدیل شده‌اند. برای شناسایی حیوانات مبتلا نیاز به مارکرهای جدیدی است که مقرون به صرفه بوده و از دقت بالایی برخوردار باشند. برای این منظور 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. نمونه‌های شیر از گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اخذ گردید. سرم خون و شیر چربی گرفته شده جهت اندازه‌گیری فعالیت لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز با استفاده از کیت تجاری استفاده گردید. از مجموع ۲۰ کارتیبه مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با عامل استرپتوکوکوس یوبریس، ۱۲ کارتیبه قطری آن سالم تشخیص داده شد و به عنوان کارتیبه شاهد همان گاو در نظر گرفته شد. حساسیت، ویژگی و نقاط برش هر تست بوسیله منحنی راک تعیین گردید. لاکتات دهیدروژناز شیر در نقطه برش u/l ۱۳۳/۵، واجد حساسیت ۸۵ درصد، ویژگی ۹۱/۷ درصد و درستی بالینی بالا ($>0/9$) در تشخیص کارتیبه‌های آلوده به استرپتوکوکوس یوبریس بود. همچنین آنزیم آلکالین فسفاتاز شیر در نقطه برش u/l ۳۸۶/۵، واجد حساسیت ۷۰ درصد، ویژگی ۷۵ درصد و درستی بالینی متوسط (۰/۸۱۳) در تشخیص کارتیبه‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با عامل استرپتوکوکوس یوبریس بود. نتایج نشان داد که اندازه‌گیری فعالیت لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز شیر، ارزش تشخیصی بالایی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی حاصل از استرپتوکوکوس یوبریس دارد.

واژگان کلیدی: لاکتات دهیدروژناز، آلکالین فسفاتاز، ورم پستان تحت بالینی، استرپتوکوکوس یوبریس

مقدمه

علی رغم پیشرفتهای عظیم در ژنتیک، سیستم تغذیه، جایگاه و شرایط شیردوشی، در بیشتر گله‌های پر تولید افزایش مشخصی در گروهی از بیماری‌های چند عاملی که تحت عنوان: بیماریهای مرتبط با تولید شناخته میشوند، وجود دارد (Batavani, *et al.*, ۲۰۱۷). 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 (Akerstedt, *et al.*, ۲۰۰۸)، تغییر در بهداشت و کیفیت ترکیبات شیر، کاهش زاد و ولد، مرگ و حذف زود هنگام دام میگردد (Schrack, *et al.*, ۲۰۰۱). در واقع ورم پستان معمول ترین و از لحاظ اقتصادی مهمترین بیماری در صنعت پرورش گاو شیری است (Schepers, *et al.*, ۱۹۹۷). ورم پستان در دو فرم مختلف رخ می دهد: ورم پستان بالینی و ورم پستان 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 (Akerstedt, ۲۰۰۸). مشکل در موارد ورم پستان تحت بالینی است که هیچ تغییر ظاهری در پستان یا شیر ندارد و مخفی و درمان نشده باقی می ماند و سبب ضررهای اقتصادی شدیدی در اغلب نژادهای شیری میگردد (Bolourchi, *et al.*, ۲۰۰۸; Pyorala, ۲۰۰۳). بطوریکه ۷۰ – ۸۰ درصد از خسارتهای ناشی از ورم پستان را مربوط به آن می دانند (Hiss, *et al.*, ۲۰۰۷). 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 آن در گله و افزایش هزینه‌های درمانی میگردد (Akerstedt, *et al.*, ۲۰۰۸). بنابراین بکارگیری تکنیک‌های کارآمدی که قادر باشند بیماری را در مراحل ابتدایی آن شناسایی نمایند از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Babaei, *et al.*, ۲۰۰۷). اگر چه برای تشخیص ورم پستان تحت بالینی آزمایشات مختلفی در شیر نظیر: شمارش سلولهای پیکری، آزمایش ورم پستان کالیفرنایی، آزمایشات باکتریولوژیک، اندازه‌گیری هدایت الکتریکی، اندازه‌گیری لاکتوز و پلاسمین، اندازه‌گیری پروتئین‌های فاز حاد و سنجش فعالیت آنزیم‌های شیر پیشنهاد شده است، واکنش هاب التهابی که بوسیله عفونت‌ها در بافت پستان ایجاد میشوند، غالباً بوسیله سنجش سلولهای پیکری در شیر سنجیده میشوند (Oliszewski, *et al.*, ۲۰۰۲). باید به این نکته توجه نمود 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 (Akerstedt, ۲۰۱۱). از سوی دیگر برای اینکه این آزمایش به عنوان یک تست غربالگر در تشخیص کارتی‌های آلوده در گله گاوهای شیری استفاده شود حساسیت کافی ندارد (Akerstedt, ۲۰۱۱; Safi, *et al.*, ۲۰۰۹). همچنین روش استاندارد برای شمارش سلولهای پیکری روش الکترواپتیکال فوزوماتیک است که در بسیاری از کشورهای در حال توسعه فقط محدود به آزمایشگاه‌های مرجع است (Akerstedt, *et al.*, ۲۰۰۷). امروزه شمار سلول‌های سوماتیک شیر به همراه کشت باکتریایی به

سلولهای آسیب دیده اپیتلیوم پستان و سلولهای بینابینی، فرآورده هایی ترشح می کنند که در بردارنده آنزیم های هیدرولیتیک می باشند. برخی از این آنزیم ها همچون لاکتات دهیدروژناز جز آنزیم های غیر لیزوزومی اند و برخی دیگر لیزوزومی اند (Babaei, et al., ۲۰۰۷). لاکتات دهیدروژناز آنزیم سیتوپلاسمی است که به عنوان بیومارکری جهت بررسی سلامت پستان پیشنهاد شده است. تحقیقات نشان داده که فعالیت این آنزیم بطور معنی داری در شیرهای اخذ شده از کارتیه های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی افزایش می یابد (Chagunda, et al., ۲۰۰۶) و میزان فعالیت این آنزیم در شیر همبستگی زیادی با سلولهای سوماتیک به خصوص در کارتیه های مبتلا به ورم پستان دارد (Chagunda, et al., ۲۰۰۷; Hiss, et al., ۲۰۰۶). همچنین تحقیقات نشان داده که فعالیت آلکالین فسفاتاز بطور معنی داری در شیر کارتیه های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی نسبت به کارتیه های سالم افزایش می یابد و میزان فعالیت آن با سلولهای سوماتیک همبستگی مثبت دارد (Anirban, et al., ۲۰۱۲). منشا فعالیت لاکتات دهیدروژناز افزایش یافته ناشی از لکوسیتیهایی است که در شیر ورم پستانی یافت می شوند (Hiss, et al., ۲۰۰۷) و همچنین سلولهای اپیتلیوم پستانی و بینابینی که در طی روند التهابی آسیب دیده اند (Babaei, et al., ۲۰۰۷). اگرچه اهمیت سلولهای اپیتلیال آسیب دیده برای فعالیت لاکتات دهیدروژناز در شیر مشخص نیست (Hiss, et al., ۲۰۰۷)، 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 (Katsoulos, et

عنوان استاندارد طلایی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته می شود (Pyörala, ۲۰۰۳). اما آزمایش های باکتریولوژیک نیز به دلیل پرهزینه و وقت گیر بودن به عنوان یک تست روتین در تشخیص ورم پستان تحت بالینی مناسب نیستند (Safi, et al., ۲۰۰۹) 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 تکنیک های روتین به آسانی و سریع تعیین گردند (Safi, et al., ۲۰۰۹). اخیراً کاربرد پروتئینهای فاز حاد در بررسی و مدیریت سلامت حیوان مورد توجه فراوان قرار گرفته است (Kaneko, et al., ۲۰۰۸). تحقیقات زیادی نیز در زمینه تشخیص پروتئین های فاز حاد در شیر انجام شده و مشخص گردیده که اندازه گیری این پروتئین ها در شیر ارزش تشخیصی دارد ولی به دلیل پرهزینه بودن کیت های تشخیصی این پروتئین ها، استفاده از آنها به عنوان روش های رایج نیاز به زمان دارد (Hulten, et al., ۱۹۹۷). سالهاست که به استفاده از آنزیم های مختلف در شیر به عنوان بیومارکرها برای جهت شناسایی ورم پستان توجه شده است و مشخص گردیده که تعیین میزان فعالیت آنزیم های شیر دارای پتانسیل تشخیصی برای ورم پستان است (Bogin and ziv, ۱۹۷۳). چرا که برخی از آنزیم های 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 (Babaei, et al., ۲۰۰۷; Hiss, et al., ۲۰۰۷). هجوم لکوسیت های چند هسته ای و ماکروفاژها یکی از دفاع های ضروری بدن در برابر التهاب پستان است. در طی روند التهابی این سلولها و

۲۰۱۰، *al.*). 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 میشوند چندان موثر نیستند. نتایج این

مواد و روشها

تعداد ۱۴۵ راس گاو نژاد هلشتاین به طور تصادفی از ۷ گاوداری صنعتی در استانهای تهران و مازندران انتخاب شدند. گاوهای مورد مطالعه در دوره شیرواری به سر می بردند و سه مرتبه در روز با استفاده از ماشین شیر دوشی 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 لمس پستان و مشاهده شیر هیچ گونه اختلالی را نشان ندادند. به علاوه گاوهایی که در اواخر دوره آبستنی و با 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 نمونه گیری قبل از دوشش ظهر ابتدا کارتیه های هر گاو با آب ولرم بطور کامل شستشو و خشک گردیدند. سپس انتهای سرپستانکها با الکل اتانول ۷۰ درصد ضد عفونی و خشک گردیدند. سپس پس از دور ریختن سه دوشش اول نمونه های شیر در سه قسمت اخذ گردید. یک قسمت جهت آنالیز شمارش سلولهای سوماتیک ارسال گردید. قسمتی از شیر جهت سنجش فعالیت آنزیم ها در کنار یخ به آزمایشگاه کلینیکال پاتولوژی پلی کلینیک

تحقیق نشان داد که اندازه گیری فعالیت آنزیم های شیر میتواند به عنوان یک روش تشخیصی با حساسیت و ویژگی قابل قبول جهت شناسایی زود هنگام کارتیه های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی مورد استفاده قرار گیرد.

تخصصی حیوانات خانگی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران منتقل و بلافاصله چربی آن بطور کامل گرفته شد و تا مشخص شدن نتایج کشت میکروبی و شمارش سلولهای پیکری، شیر چربی گرفته در منفی ۲۰ درجه سانتی گراد فریز گردید. نمونه های شیر جهت آزمایشات باکتریولوژی در فالكونهای 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 اندازه گیری فعالیت آنزیم ها در سرم بطور همزمان یک نمونه خون از ورید و داج هر گاو توسط لوله های خلاء گرفته شد و بلافاصله به آزمایشگاه ارسال گردید تا سرم جدا گردد. نمونه های سرم بدون همولیز تا زمان آنالیز در منفی ۲۰ درجه سانتی گراد فریز گردید.

در این مطالعه، گاوهایی که حداقل شیر یکی از کارتیه های آنها دارای شمار سلولهای پیکری بالاتر از $100,000 \text{ cells/ml}$ و نتیجه کشت باکتریایی آنها نیز مثبت بود به عنوان مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته شد. همچنین گاوهایی که شمار سلولهای پیکری هر چهار کارتیه آنها پایین تر از نقطه برش و نتایج کشت باکتریایی آنها نیز منفی بود به عنوان گاوهای سالم

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. جهت بررسی همبستگی بین پارامترهای مورد نظر از ضریب همبستگی اسپیرمن استفاده گردید. نقطه برش مطلوب برای فعالیت آنزیم های 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 $0/7 - 0/5$ بیانگر درستی بالینی پایین سطح زیر منحنی بین $0/9 - 0/7$ بیانگر درستی بالینی متوسط و سطح زیر منحنی بالاتر از $0/9$ نشان دهنده درستی بالینی بالا برای هر تست تشخیصی در نظر گرفته شد (Gardner, et al., ۲۰۰۶). 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 معنی داری مورد مقایسه قرار گرفت.

در نظر گرفته شدند. در گاوهای سالم شیر هر چهار کارتیبه با هم مخلوط و به عنوان یک نمونه جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم ها در نظر گرفته شد.

شمارش سلولهای پیکری در نمونه های شیر با استفاده از دستگاه شمارشگر سلولی فوزوماتیک (Fossomatic 5000; Foss Electric, Hillerød, Denmark) انجام پذیرفت. کشت باکتریایی نمونه های شیر در محیط آگار خون دار، مک کانکی آگار و محیط های کروم آگار (CHROM agarTM Mastitis; GP & GN) انجام شد. جهت تایید تشخیص از محیط های کشت افتراقی بر طبق استانداردهای موسسه ملی ورم پستان استفاده گردید.

چربی نمونه های شیر بوسیله سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه جدا گردید. سرم خون و شیر چربی گرفته جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم، مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم های لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز با استفاده از روش DGKC بوسیله دستگاه اتوآنالایزر (autoanalyzer BT, ۱۵۰۰ roma, Italy) و با استفاده از کیت شرکت فراسامد - ایران اندازه گیری گردید.

نتایج

سلولهای پیکری پایین تر از $100,000 \text{ cells/ml}$ و نتایج کشت باکتریایی منفی در نمونه های شیر گرفته شده از هر ۴ کارتیبه، سالم در نظر گرفته شدند. استرپتوکوکوس یوبریس از ۲۰ نمونه جدا شد. نتایج به دست آمده در گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با در نظر

از ۱۴۵ راس گاو انتخاب شده در این مطالعه ۷۷ گاو بر اساس شمارش سلولهای پیکری بالاتر از نقطه برش و نتیجه کشت باکتریایی مثبت در نمونه شیر حداقل یکی از کارتیبه ها، مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته شدند. همچنین ۶۸ گاو بر اساس شمارش

گرفتن نقطه برش ۱۰۰,۰۰۰ cells/ml برای سلولهای سوماتیک و بدون در نظر گرفتن نوع پاتوژن نشان داد که میانگین و میانه فعالیت لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز شیر و شمار سلولهای پیکری گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی به طور بسیار معنی داری نسبت به گاوهای سالم بالاتر بود ($P < 0/001$). در حالیکه میانگین فعالیت لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز در سرم گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی تفاوت معنی داری با گاوهای سالم نداشت. همچنین میان فعالیت آنزیم های لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز در شیر و شمار سلولهای پیکری بطور بسیار معنی داری همبستگی مثبت وجود داشت.

از مجموعه ۲۰ کارتیه مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با عامل استرپتوکوکوس یوبریس، ۱۲ کارتیه قطری، سالم تشخیص داده شد و به عنوان کارتیه شاهد همان گاو (شاهد داخل حیوانی) در نظر گرفته شد. آزمون من-ویتی نشان داد که میانگین فعالیت لاکتات دهیدروژناز شیر و تعداد سلولهای پیکری کارتیه های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با عامل استرپتوکوکوس یوبریس بطور بسیار معنی داری نسبت به کارتیه های قطری سالم بالاتر بود ($p < 0/001$). همچنین میانگین فعالیت

آلکالین فسفاتاز شیر کارتیه های مبتلا بطور معنی داری نسبت به کارتیه های سالم بالاتر بود ($p = 0/004$). جدول ۱.

نقطه برش، حساسیت، ویژگی، مثبت و منفی کاذب و درستی بالینی (سطح زیر منحنی) فعالیت آنزیم های لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز در تشخیص ورم پستان تحت بالینی با عامل استرپتوکوکوس یوبریس در جدول ۲ آورده شده است.

نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت لاکتات دهیدروژناز شیر در نقطه برش ۱۳۳/۵ u/l، واجد حساسیت ۸۵ درصد و ویژگی ۹۱/۷ درصد و درستی بالینی بالا ($> 0/9$) و فعالیت آلکالین فسفاتاز شیر در نقطه برش پیشنهادی u/l ۳۸۶/۵، با حساسیت ۷۰ درصد و ویژگی ۹۱/۷ درصد و درستی بالینی بالا ($0/993$) و فعالیت آلکالین فسفاتاز شیر در نقطه برش پیشنهادی ۵۴۲/۵ درصد، با حساسیت ۸۸/۹ درصد و ویژگی ۷۵ درصد واجد درستی بالینی متوسط (سطح زیر منحنی ۰/۸۱۳) در تشخیص ورم پستان تحت بالینی با عامل استرپتوکوکوس یوبریس بودند. آزمون مک نمار نشان داد که این دو نقطه برش از نظر تشخیصی با یکدیگر توافق دارند.

جدول ۱ - آمار توصیفی برای پارامترهای مورد اندازه گیری در کارتیبه مبتلا و قطری سالم در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی ناشی از استرپتوکوکوس یوبریس با در نظر گرفتن نقطه برش $100,000 \text{ cells/ml}$ برای سلولهای سوماتیک

پارامتر	واحد	گروه	تعداد نمونه	میانگین $\pm$ انحراف از میانگین	میان	پایین ترین و بالاترین مقدار	P-value
لاکتات	u/l	*۱	۱۲	76 ± 11	۶۶/۵	۳۲ - ۱۳۵	<0.001
دهیدروژناز شیر		*۲	۲۰	731 ± 256	۳۱۸/۵	۸۰ - ۴۸۵۵	#
آلکالین	u/l	۱	۱۲	296 ± 59	۲۶۳/۵	۵۸ - ۶۹۸	0.004
فسفاتاز شیر		۲	۲۰	847 ± 191	۵۵۷	۱۷۳ - ۳۹۸۰	#
تعداد سلولهای سوماتیک	$\times 1000 \text{ Cells/ml}$	۱	۱۲	32.08 ± 5.8	۳۲	۵ - ۶۸	<0.001
		۲	۲۰	2729.3 ± 1087.6	۷۸۷/۵	۲۷۸ - ۱۹۷۹۵	#
** گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی # آزمون من - ویتنی							

جدول ۲ - نقاط برش پیشنهادی، حساسیت، ویژگی، مثبت و منفی کاذب و سطح زیر منحنی پارامترهای مورد اندازه گیری در تشخیص ورم پستان تحت بالینی ناشی از استرپتوکوکوس یوبریس بر پایه نتایج شمارش سلولهای سوماتیک کارتیبه قطری سالم با نقطه برش $100,000 \text{ cells/ml}$

پارامتر	نقطه برش ^۱ (u/l)	حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)	منفی کاذب (درصد)	مثبت کاذب (درصد)	درستی بالینی (سطح زیر منحنی)
لاکتات	۱۳۳/۵۰	۸۵	۹۱/۷	۱۵	۸/۳	۰/۹۴۰
دهیدروژناز						
آلکالین فسفاتاز	۳۸۶/۵	۷۰	۷۵	۳۰	۲۵	۰/۸۱۳
شیر						

^۱ این دو نقطه برش از نظر تشخیصی با یکدیگر توافق دارند (آزمون مک نمار)

بحث و نتیجه گیری

لاکتات دهیدروژناز شیر در نقطه برش $133/5 \text{ u/l}$ واجد حساسیت ۸۵ درصد، ویژگی $91/7$ درصد و درستی بالینی بالا ($0/940$) در تشخیص کارتیته‌های آلوده به استرپتوکوکوس یوبریس بود. آلکالین فسفاتاز شیر نیز در نقطه برش $386/5 \text{ u/l}$ واجد حساسیت ۷۰ درصد، ویژگی ۷۵ درصد و درستی بالینی متوسط ($0/813$) در تشخیص کارتیته‌های آلوده به ورم پستان تحت بالینی با عامل استرپتوکوکوس یوبریس بود. سیمونز و رایت در سال ۱۹۷۴ پیشنهاد داده بودند که فعالیت لاکتات دهیدروژناز شیر می‌تواند به عنوان شاخص حساسی از تغییرات التهابی غده پستان در نظر گرفته شود (symons and Wright, ۱۹۷۴). کاتسولوس و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند که فعالیت لاکتات دهیدروژناز در نقطه برش 197 U/L برای گوسفند و نقطه برش 185 u/l برای بز به ترتیب در گوسفند و بز دارای حساسیت $92/8$ درصد و $98/2$ درصد و ویژگی $95/4$ درصد و $96/3$ درصد بود. همچنین اندازه‌گیری فعالیت لاکتات دهیدروژناز در میان سایر آنزیم‌ها روشی حساس و قابل اطمینان در تشخیص ورم پستان تحت بالینی بود (Katsoulos, et al. ۲۰۱۰). شاگاندا و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز همبستگی زیادی با شمار سلولهای پیکری خصوصاً در نمونه‌های شیر کارتیته‌های مبتلا به ورم پستان بالینی داشت. همچنین فعالیت این آنزیم حساسیت بالاتری از آن استیل بتا - گلوکوزامینیداز (NAGase) در شناسایی ورم پستان داشت

(Chagunda, et al. ۲۰۰۶). اگرشتد و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که لاکتات دهیدروژناز در میان تمام بیومارکرهای ورم پستان کمترین اختلاف داشت (Akerstedt, et al. ۲۰۱۱). هیس و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش نمودند لاکتات دهیدروژناز پارامتر مفیدی برای تشخیص ورم پستان تحت بالینی می‌باشد (Hiss, et al. ۲۰۰۷). در تحقیق حاضر لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز سرم در تشخیص ورم پستان تحت بالینی از درستی بالینی پایینی برخوردار بودند و لذا نمی‌توانند به عنوان شاخص مناسبی در بررسی التهاب پستان بکار گرفته شوند.

التهاب پستان به چندین روش می‌تواند بر ترکیبات شیر تاثیر گذارد. بر اثر افزایش نفوذ پذیری سد خون - شیر پروتئین‌های سرم می‌توانند 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 می‌شود کاهش یابند (Akerstedt, ۲۰۰۸). عفونت داخل پستانی نفوذ پذیری عروق خونی کوچک را بوسیله ترشح واسطه‌های شیمیایی مختلف نظیر هیستامین، پروستاگلندین، کینین و رادیکالهای آزاد اکسیژن از سلولهای انتهایی افزایش می‌دهد (Honkanen and Sandhom, ۱۹۸۱). منشا فعالیت لاکتات دهیدروژناز افزایش یافته ناشی از لکوسیت‌هایی است که در شیر ورم پستانی یافت میشوند (Hiss, ۲۰۰۷). همچنین سلولهای اپیتلیوم پستانی و بینایی که در طی روند التهابی آسیب دیده‌اند می‌باشد (Babaei, et al. ۲۰۰۷). منشاء افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز از

تعداد سلولهای سوماتیک افزایش نیافته باشد. (Schepers, et al. ۱۹۹۷). در ضمن تعدادشان در چند روز نخست شیرواری افزایش یافته و ممکن است تا اولین ماه شیرواری بالا بماند (Middleton, et al. ۲۰۰۴). از سویی روش استاندارد برای شمارش سلولهای پیکری روش الکترواپتیکال فوزوماتیک است که در بسیاری از کشورهای در حال توسعه فقط محدود به آزمایشگاههای مرجع است (Pyörälä, ۲۰۰۳). از طرفی آزمایشهای 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 نمی تواند. همه کارتیهای عفونی را نشان دهد. همچنین پرهیز از آلودگی در حین نمونه گیری مشکل بوده و از سویی احتمال نتایج منفی کاذب در کارتیهای که بطور مزمن آلوده اند وجود دارد (Babaei, et al. ۲۰۰۷). لذا در تشخیص زودهنگام ورم پستان تحت بالینی نیاز به شاخصهای التهابی در شیر است که بتوانند با استفاده از تکنیکهای روتین و آسان اندازه گیری گردند. تحقیقات زیادی در زمینه تشخیص پروتئینهای فاز حاد در شیر انجام شده و مشخص گردیده که اندازه گیری این پروتئینها در شیر ارزش تشخیصی دارد. ولی به دلیل پرهزینه بودن کیت های تشخیصی این پروتئینها، استفاده از آنها به عنوان روشهای رایج نیاز به زمان دارد (Akerstedt, ۲۰۰۸). سالهاست که به استفاده از آنزیمهای مختلف در شیر به عنوان بیومارکری 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 (Bogin and Ziv, ۱۹۷۳).

لکوسیتها و سلولهای اپیتلیال پستانی و سلولهای بافت بینابینی آسیب دیده در طی التهاب و خصوصاً ناشی از لکوسیتهای تخریب شده است (Katsoulos, et al. ۲۰۱۰). 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 (Babaei, et al. ۲۰۰۷) در حالی که باتوانی و همکاران نشان دادند سرم خون منبع قابل توجهی از این آنزیمها در شیر نبود بلکه به احتمال زیاد از لکوسیتهای تخریب شده و سلولهای پارانشیمی پستان آزاد می شوند (Batavani, et al. ۲۰۰۷). اگرچه اهمیت سلولهای اپیتلیال آسیب دیده برای فعالیت لاکتات دهیدروژناز در شیر مشخص نیست. تحقیقات ما نیز نشان داد که همبستگی مثبت و بسیار معنی داری میان لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز شیر با سلولهای سوماتیک وجود دارد. امروزه شمار سلولهای سوماتیک شیر به همراه کشت باکتریایی به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته میشوند (Safi, et al. ۲۰۰۹). 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 سلولهای 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 (Akerstedt, et al. ۲۰۰۸). از سوی دیگر برای اینکه این آزمایش به عنوان یک تست غربالگر در تشخیص کارتیهای آلوده در گله گاوهای شیری استفاده شود حساسیت کافی ندارد زیرا در مراحل ابتدایی التهاب پستان ممکن است هنوز

استرپتوکوک‌های محیطی به یکی از مهمترین عوامل ورم پستان در گاوهای شیرده تبدیل شده‌اند و یکی از شایع‌ترین آنها استرپتوکوکوس یوبریس می‌باشد (Radostits, *et al.* ۲۰۰۷). تحقیقات حاضر نشان می‌دهد، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز شیر که هم آسان و هم کم هزینه‌تر از سایر روش‌هاست و 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 روش‌های روتین تشخیصی ورم پستان در ابتدای شیرواری و جهت غربال حیوانات جهت درمان انتخابی دوره خشک نیز مناسب می‌باشد (Babaei, *et al.* ۲۰۰۷). تحقیقات ما

نشان داد که اندازه‌گیری لاکتات دهیدروژناز 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 تحت بالینی گاو مورد استفاده قرار گیرد. لذا اندازه‌گیری لاکتات دهیدروژناز 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.

منابع:

1. Akerstedt, M. (2008). Bovine acute phase proteins in milk haptoglobin and serum amyloid A as potential biomarkers for milk quality. *Natural Resources and Agricultural Sciences*, 16: 1-55.
2. Akerstedt, M., Forsbäck, L., Larsen, T., Svennersten, SK., (2011). Natural variation in biomarkers indicating mastitis in healthy cows. *J Dairy Res*, 78 (1): 88-96
3. Akerstedt, M., Persson, K., Bach Larsen, L., Forsbäck, L., Sternesjö, A., (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. Babaei, H., Mansouri, Najand I., Molaei M.M., Kheradmand, A., Sharifian, M., (2007). Assessment of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase & as patate aminotransferase activities in cow's milk as an indicator of subclinical mastitis. *Veterinary Research Communications*, 31: 419-425.
6. Batavani, R. A., Asri S., Naebzadeh, H., (2007). The effect of subclinical mastitis on milk composition in dairy cows. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 8 (3): 205-211.
7. Batavani, RA., Mortaz, E., Falahian, K., Dawoodi, MA., (2003). Study on frequency etiology and some enzymatic activities of subclinical ovine mastitis in urmia, iran. *Small Ruminant Research*, 50 (1): 45-50.
8. Bogin, E., and Ziv, G., (1973). Enzymes and minerals in normal and mastitic milk. *Cornell Veterinarian*, 63 (4): 666-676.
9. Bolourchi, M., Mokhber Dezfouli, MR., Kasravi, R., Moghimi Esfandabadi, A., Hovareshti, P., (2008). An estimation of national average of milk somaticcell count and production losses due to subclinical mastitis in commercial dairy herds in Iran. *J. Vet. Res*, 63 (4): 263-266.
10. Chagunda, MG., Larsen, T., Bjerring, M., Ingvarsten KI., (2006). 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.
11. Gardner, LA., 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.
12. Hiss, S., Mueller, U., New-Zahren, A., Sauerwein, IH., (2007). Haptoglobin and Lactate dehydrogenase measurements in milk for the identification of subclinically diseased udder quarters. *Veterinarni Medicina*, 52 (6): 245-252.
13. 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.

14. Hulten, C., Sletten, K., Foyen Bruun, C., Marhaug, G., (1997). The acute phase serum amyloid A in the horse isolation and characterization of three isoforms. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 57 (3-4): 215-227.
15. Katsoulos, PD., Christodouloupoulos, A., Minas, MA., Karatzia, K., Pourliotis, SK., (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.
16. Middleton, JR., Hardin, D., Steevens, B., Randle, R., Tyler, JW., (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.
17. Oliszewski, R., Nunez, D., Kairuz MS., Gon- zalez, DE., Oliver, G., (2002). Assessment of B-glucuronidase level in goat,s milk as an indicator of mastitis Comparison with other mastitis detection methods. *Journal of Food Protection*, 65:864-866.
18. Pyörala, S., (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*, 34 (5): 565-578.
19. Radostits, OM., Gay, CC., Hinchcliff, KW., Constable, PD., (2007). *Veterinary Medicine, A Textbook of the diseases of Cattle, Sheep, Goats, Pigs and Horses*. 10th Edition. Saunder-Elsevier, 673-762.
20. Safi, S., Khoshvaghti, A., Jafarzadeh, SR., Bolourchi, M., Nowrouzian, I., (2009). Acute phase proteins in the diagnosis of subclinical mastitis. *Vet. Clin. Pathol.*, 38 (4): 471-476.
21. Schepers, AJ., Lam, T., Schukken, YH., 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.
22. Schrick, KN., Hockert, ME., Saxton, AM., Lewis, M., Dowlen, HH., Oliver, S., (2001). Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.*, 84 (6): 1407.
23. Symons DBA., & Wright, LJ., (1974). Changes in bovine mammary gland permeability after intramammary exotoxin infusion. *Journal of Comparative Pathology*, 84: 9-17.

Determination of the diagnostic value of milk lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase in bovine subclinical mastitis caused by streptococcus uberis

Kalantari, A.*

Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran

*Corresponding author: drkalantari.abbas@gmail.com

Received: Dec. 2024 Accepted: Mar 2025

Abstract:

Mastitis is the most common and damaging problem of dairy herds all over the world. On the other hand, environmental streptococci such as *Streptococcus uberis* have become one of the most important causes of mastitis in dairy cows. To identify infected animals, new markers are needed that are cost-effective and highly accurate. For this purpose, 145 clinically healthy Holstein cows were randomly selected from 7 industrial dairy farms in Tehran and Mazandaran provinces. Milk samples were taken from healthy and subclinical mastitis cows. Blood serum and defatted milk were used to measure the activities of lactate dehydrogenase (LDH) and alkaline phosphatase (ALP) using commercial kits. From a total of 20 cartiers suffering from subclinical mastitis caused by *Streptococcus eubris*, 12 diagonal cartiers were found to be healthy and were considered as control cartiers of the same cow. Sensitivity, specificity and cutoff points of each test were determined by ROC curve. Milk LDH at the cutoff point of 133.5 u/l had 85% sensitivity, 91.7% specificity, and high clinical accuracy (>0.9) in the diagnosis of *Streptococcus uberis*-infected cartiers. Also, the milk ALP at the cutoff point of 386.5 u/l had 70% sensitivity, 75% specificity and moderate clinical accuracy (0.813) in diagnosing Cartiers with subclinical mastitis caused by *Streptococcus uberis*. The results of this research showed that the measurement of milk LDH and ALP activity has a high diagnostic value in the diagnosis of subclinical mastitis caused by *Streptococcus uberis*.

Keywords: lactate dehydrogenase, Alkaline phosphatase, subclinical mastitis, *Streptococcus uberis*