بررسی مقایسه‌ای سرم آمیلوئید A در خون گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی ناشی از عفونت *ایشیریشیا کلی، استرپتوکوکوس اوبریس و استافیلوکوکوس اورئوس*

مهراد بیرگانی [۱]، سیده ام البنین قاسمیان [۲*] سیده زینب پیغمبر زاده [۱]

۱- گروه دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران.

۲- گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران. *

نویسنده مسئول : Ghasemian1249@yahoo.com

(دریافت مقاله: 1403/۱۱/۲۸ پذیرش نهایی: ۱۴۰۴/۲/۶)

چکیده

زمینه و هدف: این مطالعه با هدف بررسی ارزش تشخیصی سرم آمیلوئید A (SAA) در تشخیص زودهنگام ورم پستان تحت بالینی در گاوهای آلوده به *اشریشیا کلی* (*E.coli*) و عفونت های استافیلوکوکوس انجام شد.

مواد و روش ها: این مطالعه تحلیلی مقطعی در سال ۱۴۰۳ در شهرستان بهبهان انجام شد و سرم آمیلوئید A را در خون ۷۹ راس گاو شیری مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی مورد ارزیابی قرار داد. گاوها به سه گروه گاوهای سالم (۳۰ راس)، گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی (۳۰ راس) و گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی(۱۰ راس) تقسیم شدند. سپس این گروه ها از نظر سرم آمیلوئید A بررسی شدند. ارزش تشخیصی سرم آمیلوئید A با محاسبه مناطق زیر منحنی (AUCs) منحنی‌های ROC تعیین شد.

نتایج: به طور کلی، در بین بیماران با آزمایش کشت مثبت ۵۷٪(۴۵ مورد)، ۱۹٪(۱۵ مورد) به *E. coli*، ۲۲/۸٪(۱۸ مورد) به *استرپتوکوکوس اوبریس* و ۱۵/۲٪(۱۲ مورد) به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند. همبستگی قوی بین میانگین SCC و مقادیر SAA مشاهده شد ($P<0.005$). حساسیت و ویژگی سلول های سوماتیک در شیر (۹۸٪) و سرم آمیلوئید A (۹۰٪) برای تشخیص ورم پستان در گاوها بالا بود.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد که ورم پستان در گاوهای شیری با افزایش سرم آمیلوئید A است. این مطالعه نشان می دهد که تغییرات در این نشانگر زیستی می تواند برای تشخیص بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: *اشریشیا کلی*، سرم آمیلوئید A، ورم پستان، *استافیلوکوکوس اورئوس*

مقدمه

ورم پستان در گاوها به طور گسترده به عنوان یکی از شایع ترین و از نظر اقتصادی مضر ترین بیماری هایی شناخته می شود که مزارع شیری را در سراسر جهان تحت تاثیر قرار می دهد (Ghafoori *et al*., 2022; Maity & Ambatipudi, 2019).

بار مالی این بیماری معمولاً از کاهش تولید شیر، افزایش هزینه های مراقبت های دامپزشکی و حذف زود هنگام دام های مبتلا از گله ناشی می شود. میزان بروز سالانه ورم پستان۳۷٪ گزارش شده است (Neculai-Valeanu & Ariton, 2022).

علت اصلی ورم پستان در گاو عفونت باکتریایی است، اگرچه سایر عوامل عفونی مانند مایکوپلاسما و قارچ ها نیز می توانند نقش داشته باشند. *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشیریشیا کلی* به طور جهانی به عنوان علل اولیه ورم پستان گاوی شناخته شده اند (Dillon & Jackson-Smith, 2021).

هنگامی که عفونت با *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد می‌شود، ریشه‌کن کردن آن بسیار دشوار است. علاوه بر این، گاو آلوده ممکن است به عنوان ناقل بالقوه برای انتقال عفونت عمل کند. ورم پستان گاوی، که می‌تواند از طریق شیر یا کارگران آلوده به مصرف کنندگان منتقل شود، به عنوان یک مشکل بهداشتی جدی مطرح است و خطر بیماری‌های مشترک بین انسان و دام را افزایش می‌دهد (Abd El-Hamid *et al*., 2023).

در حالی که استفاده از عوامل ضد میکروبی برای ریشه کنی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *E.coli* در گاوداری ها اغلب می تواند مفید باشد، ایجاد مقاومت ضد میکروبی ممکن است نتیجه استفاده بیش از حد از این عوامل در مدیریت یا پیشگیری از ورم پستان باشد (Neculai-Valeanu & Ariton, 2022).

علاوه بر این، وجود باقی مانده های ضد میکروبی می تواند منجر به کاهش کیفیت شیر شود (Feng *et al*., 2021).

ورم پستان گاوی را می توان به دو نوع تقسیم کرد: ورم پستان بالینی و تحت بالینی. ورم پستان بالینی با علائم قابل مشاهده التهاب در پستان و اختلالات سلامت عمومی مشخص می شود. از سوی دیگر، ورم پستان تحت بالینی که شیوع بیشتری نسبت به ورم پستان بالینی دارد، به دلیل عدم وجود علائم قابل مشاهده، تشخیص فوری آن دشوارتر است (Bochniarz *et al*., 2024; Farkaš *et al*., 2024; Yadav *et al*., 2024).

در پستان سالم، بیشترین سلول‌ها ماکروفاژها هستند، اما در مراحل اولیه ورم پستان، نوتروفیل ها جایگزین آنها می شوند. وجود سلول‌های سوماتیک شامل ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و تعداد کمی سلول‌های اپیتلیال پستانی در شیر می‌تواند به عنوان شاخصی برای تشخیص ورم پستان تحت بالینی باشد (Sadat *et al*., 2023).

فعل و انفعالات بین میزبان و پاتوژن باعث ایجاد پاسخ ایمنی ذاتی می شود که یا میکروارگانیسم های آلوده را شناسایی می کند یا اجزای سیستم ایمنی را تنظیم می کند. این روند منجر به افزایش تعداد ماکروفاژها و آزاد شدن سیتوکین ها می شود. این سیتوکین ها لکوسیت ها را به محل عفونت می کشانند و پاسخ فاز حاد موضعی و سیستمیک را آغاز می کنند (Agregán *et al*., 2021).

در طی عفونت، پروتئین‌های فاز حاد از جمله سرم آمیلوئید A آ افزایش می یابد، این پروتئین نقش مهمی در سیستم ایمنی بدن دارد و در شرایط التهابی به شدت افزایش می‌یابد (Rešetar Maslov *et al*., 2023; Yang *et al*., 2023).

برای شناسایی موثر علائم اولیه عفونت‌های باکتریایی پستان در گاو، درک پاتوژنز و پاسخ ایمنی گاو بسیار مهم است. این درک ما را قادر می سازد نشانگرهای زیستی قابل اعتمادی را شناسایی کنیم که می توانند در مراحل اولیه عفونت شناسایی شوند. بررسی غلظت

سرمی آمیلوئید A، در طول دوره‌های ورم پستان بالینی و تحت بالینی ارزش قابل توجهی دارد. این بیومارکر به عنوان سیگنال های مهم التهاب و پاسخ ایمنی عمل می کنند (Yang *et al*., 2023).

تغییرات در سطوح آن‌ها می تواند بینش های مهمی را در مورد شروع و توسعه ورم پستان ارائه دهد. در این مطالعه، ما مارکر التهابی را به دقت اندازه گیری کرده تا تغییرات مرتبط با تهاجم باکتریایی را شناسایی کنیم. هدف از این مطالعه بررسی این است که آیا غلظت SAA، در سرم گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی ناشی *از E.coli* ، *استرپتوکوکوس اوبریس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* افزایش می یابد.

مواد و روش ها

نحوه انتخاب حیوانات و روش تهیه نمونه ها:

نمونه ها از یک گاوداری صنعتی واقع در شهرستان بهبهان جمع آوری گردید. جامعه هدف این تحقیق براساس فرمول کوکرال و پیشینه تحقیق ۶۰ نمونه در کل و برای هر گروه ۲۰ نمونه تعیین شد. با توجه به ریزش نمونه در طول مطالعه تعداد نمونه هر گروه ۳۰ در نظر گرفته شد تا در پایان مطالعه به حجم نمونه مورد نظر دست یابیم.

$$n = \frac{\frac{z^2 pq}{d^2}}{1 + \frac{1}{N}\left[\frac{z^2 pq}{d^2} - 1\right]}$$

بنابراین این مطالعه شامل ۷۹ گاو شیری بود: ۳۰ گاو سالم، ۳۰ گاو مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و ۱۹ گاو مبتلا به ورم پستان بالینی. گاوها همگی هلشتاین بوده و بیش از سه سال سن داشتند و حداقل سه ماه از شروع شیردهی آنها گذشته بود. گاوهای مبتلا به ورم پستان که حداقل ۲ ماه قبل آنتی‌بیوتیک‌های سیستمیک یا داخل پستانی دریافت کرده بودند، از مطالعه حذف شدند. مزرعه از استراتژی‌های مدیریتی پیشرفته استفاده کرده است و پروتکل‌های بهداشتی دقیق را رعایت می‌کند و منحصراً از ماشین‌های شیردوشی خودکار بهره می‌برده است. به‌طور کلی، ۷۹ راس گاو هلشتاین از گاوداری صنعتی بهبهان به‌طور تصادفی انتخاب و در پژوهش حاضر وارد شدند. اطلاعات با استفاده از فرم‌های پرسشنامه‌ی طراحی شده ویژه جمع‌آوری شد. نتایج اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی نیز در بخش‌های مربوطه این فرم‌های پرسشنامه ثبت گردید. یک معاینه‌ی بالینی جامع بر روی تمامی گاوهای تحت بررسی انجام شد. گاوهایی که یک یا چند مورد از علائم زیر را نشان می‌دادند، دارای ورم پستان بالینی تشخیص داده شدند: علائم واکنش سیستمیک (شامل تب، بی‌اشتهایی، شوک، کاهش تولید شیر، التهاب و تورم پستان و تغییر در ظاهر شیر)، ویژگی‌های فیزیکی غیرمعمول شیر، و همچنین شاخص‌های التهاب در یک یا چند کارتیه‌ی پستان.

۷۹ گاو شیری به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول که به عنوان گروه شاهد شناخته می‌شود، شامل ۳۰ راس گاو کاملاً سالم بودند. این گاوها هیچ

علائم عمومی بیماری مانند تب، پرخونی یا کم خونی غشاهای مخاطی، و افسردگی نداشتند. پستان این گاوها نیز سالم بود و هیچ نشانه‌ای از درد، تورم، آبسه، گرمی و قرمزی در آن‌ها دیده نمی‌شد. علاوه بر این، تست ورم پستان کالیفرنیایی (CMT) و کشت باکتریایی از نمونه‌های شیر هر چهار کارتیه گاوهای گروه کنترل منفی و آزمایش کشت میکروبی آنها منفی بود. گروه دوم که به عنوان گروه ورم پستان تحت بالینی شناخته می شود، شامل ۳۰ گاو بود که ظاهراً سالم بودند و علائم عمومی بیماری را نداشتند. پستان این گاوها هم سالم بود. گاوهایی که در CMT مثبت بودند اما علائم بالینی را نداشتند، به نظر می‌رسید که از ورم پستان تحت بالینی رنج می‌برند.

گروه سوم که به عنوان گروه ورم پستان بالینی شناخته می شود، شامل ۱۹ گاو بیمار بود که حداقل یک علامت ورم پستان شامل درد، تورم، آبسه، گرمی و قرمزی همراه با رسوبات یا لخته در شیر خود را نشان می دادند. علاوه بر این، آزمایش CMT و کشت میکروبی گاوهای این گروه مثبت بود.

نمونه خون از هر گاو از طریق ورید وداج در شرایط استریل گرفته شد. تمامی نمونه ها با مشخصات مربوطه برچسب گذاری شد و با رعایت شرایط سرما به سرعت به آزمایشگاه سد آرین اصفهان جهت انجام آزمایشات مربوطه منتقل گردید.

تست ورم پستان کالیفرنیایی (CMT)

CMT به شرح زیر انجام شد: یک ظرف پلاستیکی چهار چاهی برای جمع آوری حدود ۲ میلی لیتر شیر از هر کارتیه پستان استفاده شد، که سپس با مقدار مساوی از معرف قلیایی مخلوط شد. آزمایش‌های شمارش سلول‌های سوماتیک برای هر نمونه شیر با استفاده از Nucleo Counter® SCC-100™ انجام شد (Jiménez-Velásquez *et al.*, 2024).

جمع آوری نمونه شیر و خون

برای جمع‌آوری نمونه‌های شیر، در زمان شیردوشی از گاوداری‌ها بازدید شد. نمونه‌ها قبل از شیردوشی در سالن شیردوشی جمع‌آوری شدند. قبل از فرآیند نمونه‌برداری، پستان‌های گاو دقیقاً با استفاده از الکل استریل و سپس خشک می‌شدند. تمام نمونه‌ها در ویال‌هایی که کاملاً استریل شده بودند جمع‌آوری می‌شدند. پس از ضدعفونی کردن سرپستانک‌ها، چند قطره اولیه دور انداخته می‌شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر شیر از هر کارتیه در لوله‌های استریل جمع‌آوری می‌شد. این نمونه‌ها با اطمینان از حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه ارسال می‌شدند.

همچنین یک نمونه خون حاوی ماده ضد انعقاد هپارین برای شمارش کامل خون جمع‌آوری می‌شد. نمونه خون هپارینه جمع‌آوری شده به سرعت در ۱۵۰۰ × گرم به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا پلاسمای خون جدا شود. سپس پلاسمای فریز شده

در کنار یخ برای اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی خون به آزمایشگاه پاتولوژی بالینی ارسال شد.

شناسایی باکتری

نمونه های شیر جمع آوری شده تحت یک فرآیند سانتریفیوژ ۱۰ دقیقه ای قرار گرفتند. سپس یک قطره از رسوب حاصل روی انواع مختلف آگار رشد داده می شود. این کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و بین ٢٤ تا ٤٨ ساعت انجام می شود. کلنی های باکتریایی تشکیل شده بر اساس صفات فنوتیپی مشاهده شده در محیط کشت شناسایی می شوند. باکتری های جدا شده به طور آزمایشی بر اساس خواص رنگ آمیزی گرم و ویژگی های بیوشیمیایی آنها شناسایی می شوند (Tegegne et al., 2021).

تایید مولکولی جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اوبریس* و *E. coli*

استخراج DNA: برای استخراج DNA از تمام ایزوله‌های احتمالی، از روش جوش استفاده شد. چند گروه از جدایه‌های مشکوک شامل *استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اوبریس* و *اشریشیا کلی* با ۲۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مواد رویی به عنوان نمونه DNA در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Lee *et al.*, 2024).

PCR نمونه ها

تمام جدایه‌هایی که به صورت بیوشیمیایی تایپ شده بودند و مشکوک به استافیلوکوک بودند، با تقویت ژن nuc خاص گونه تایید شدند. این کار با استفاده از پرایمر فوروارد nuc (5'-GCT TGC TAT GAT TGT GGT AGC C-3') و پرایمر ریورس (5'-TCT CTA GCA AGT CCC TTT TCC A-3') از طریق روش تقویت PCRانجام شد (Ibraheim *et al.*, 2023). یک مخلوط واکنش PCR ۲۵ میکرولیتری ایجاد شد (جدول ۱). شرایطPCR در پنج مرحله انجام شد که مراحل آن در جدول ۲ نشان داده شده است. این سری از واکنش‌ها با استفاده از یک سیکلر حرارتی ۹٦ چاه کاربردی ۲۷۲۰ انجام شد.

جدول ۱. محتویات مخلوط واکنش PCR

ماده	مقدار
DNA الگو	۵ میکرولیتر
مستر میکس ۲x	۱۲/۵ میکرولیتر
آب دیونیزه بدون نوکلئاز	٦/۵ میکرولیتر
پرایمر	۱ میکرولیتر

جدول ۲. مراحل انجام PCR

مرحله	دما	مدت زمان
دناتوراسیون اولیه	۹٤ درجه سانتیگراد	۲ دقیقه
گسترش	٦۸ درجه سانتیگراد	۷ دقیقه

علاوه بر این، تمام ایزوله‌های *E. coli* که از نظر بیوشیمیایی شناسایی شدند، برای کدگذاری ژن ۱٦ S-rRNAبا پرایمر اختصاصی جنس-16S) rRNA-F-GCGGACGGGTGAGTAATGT و S-۱٦ rRNA-R-TCATGCCTCTACAG)تحت تکثیر PCR قرار گرفتند. محصولات PCR برای سه ایزوله به نام‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اوبریس* و *اشریشیا کلی* بر روی ژل آگارز ۱٪ با استفاده از یک ترانس‌ایلومیناتور UV و یک سیستم مستندسازی ژل مشاهده شدند (Sadat, Ramadan, *et al*., 2022; Sadat, Shata, *et al*., 2022)

اندازه گیری سطوح سرمی آمیلوئید A

سطوح سرمی آمیلوئید A با استفاده از کیت‌های تجاری تخصصی ELISA گاوی ایالات متحده آمریکا) اندازه گیری شد (Otsuka *et al*., 2021). این کیت ها ایمونواسی آنزیمی ساندویچی برای اندازه گیری کمی در شرایط آزمایشگاهی SAA، در سرم گاو هستند. تمام اندازه‌گیری‌ها با استفاده از دستگاه میکروپلیت خوان Labomed EMR-500 (ایالات متحده آمریکا) انجام شد (شکل ۱).

شکل ۱. کیت تجاری تخصصی ELISA گاوی

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده ها با نرم افزار SPSS انجام شد. شاخص‌های مرکزی و پراکندگی برای توصیف نتایج مورد استفاده قرار گرفتند. برای مقایسه داده های کیفی از آزمون کای اسکوئر استفاده شد، در حالی که آزمون تی مقایسه داده های کمی قبل و بعد را تسهیل می کند. مقایسه‌های گروهی از طریق ANOVA انجام شد و آزمایش‌هایی مانند سطح زیر منحنی ROC معیارهایی از حساسیت و ویژگی را ارائه می کنند . ارزش تشخیصی نشانگرهای التهابی با محاسبه مناطق زیر منحنی (AUCs) منحنی‌های ROC تعیین شد. سطح معنی داری ۰/۰۵ >p در نظر گرفته شد.

نتای‌ج

توصیف و تحلیل آماری یافته ها:

به طور کلی، ۳۸٪ از گاوهای سالم (۳۰ گاو) در آزمون CMT منفی و ۳۷/۳٪ (۲٤ مورد) از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و ۳۱/۷٪ (۲۵ مورد) تحت بالینی مثبت بودند. در بین بیماران با آزمایش کشت مثبت (۵۷٪، ٤۵ مورد)، ۱۹٪ (۱۵ مورد) دارای *E. coli*، ۲۲/۸٪ (۱۸ مورد) دارای *S. uberis* و ۱۵/۲٪ (۱۲ مورد) با *S. aureus* آلوده بودند. در اکثریت قابل توجهی از نمونه‌های شیر ورم پستان، به ویژه در ۹۲ درصد (٤۵ از ٤۹ مورد) آنها، عوامل باکتریایی شناسایی شدند. SCC و SAA در گاوهایی که در CMTمنفی یا مثبت بودند، مقایسه شدند (جدول ۳). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، تفاوت معنی‌داری از نظر SCC، SAA، بین گاوهایی که در CMT منفی و مثبت بودند، وجود داشت ($P < 0.005$).

جدول ۳. مقایسه گاوهای دارای نتایج تست ورم پستان کالیفرنیا مثبت و منفی از نظر تعداد سلول های سوماتیک، آمیلوئید A سرم

متغیرها	CMT	میانگین	انحراف معیار	آماره آزمون	P-value
سلول های سوماتیک (x1000/mL)	منفی	٤٢/٧٩	١٨/١٦	-٧/٢٤٤	<٠/٠٠٥
	مثبت	٣٠٤١/٥٧	٢٢٦١/٦٣		
آمیلوئید A سرم (mg/L)	منفی	١٢/٩٨	٥/٩٨	-١٤/١١٢	<٠/٠٠٥
	مثبت	١٦٧/٧٠	٥٩/٧٣		

مقایسه میانگین سطوح SCC، SAA، در سه گروه: کنترل سالم، ورم پستان تحت بالینی و ورم پستان بالینی نشان داده شده است (جدول ٤). نتایج نشان دهنده تفاوت معنی داری از نظر SCC، SAA، در بین سه گروه بود ($P < 0.005$).

جدول ٤. مقایسه مقادیر میانگین تعداد سلول های سوماتیک، آمیلوئید A سرم در سه گروه

متغیر	گروه ها	میانگین	انحراف معیار	فاصله اطمینان ٩٥٪		آماره آزمون*	P-value
				حد پایینی	حد بالایی		
سلول های سوماتیک (x1000/mL)	گاوهای سالم	٤٢/٧٩	١٨/١٦	٣٦/٠٠	٤٩/٥٧	/٦٩	<٠/٠٠٥
	ورم پستان تحت بالینی	١٦٣٧/٤٨	١١٥٨/٦٩	١٢٠٤/٨٢	٢٠٧٠/١٤	١٣٠	
	ورم پستان بالینی	٥٢٥٨/٥٦	١٧٣٢/٩٤	٤٤٢٣/٣٠	٦٠٩٣/٨١		
آمیلوئید A سرم (mg/L)	گاوهای سالم	١٢/٩٨	٥/٧٣	١٠/٨٤	١٥/١٣	/٢٠٤	<٠/٠٠٥
	ورم پستان تحت بالینی	١٤٠/٦٢	٤١/١١	١٢٥/٢٦	١٥٥/٩٧	١٩	
	ورم پستان بالینی	٢١٠/٤	٦٠/٣١	١٨١/٣٩	٢٣٩/٥٤		

* One-way ANOVA

مقایسه میانگین SCC، SAA، در گاوهای آلوده به انواع مختلف باکتری نشان دهنده تفاوت معنی داری از نظر SCC، SAA، در بین گاوهای آلوده به انواع مختلف باکتری است ($P < 0.005$) (جدول ٥).

جدول ۵. مقایسه میانگین مقادیر تعداد سلول های سوماتیک، آمیلوئید A سرم در گاوهای آلوده به انواع مختلف باکتری

متغیر	کشت	میانگین	انحراف معیار	فاصله اطمینان ۹۵٪		آماره آزمون *	P-value
				حد پایینی	حد بالایی		
سلول های سوماتیک (x1000/mL)	منفی	٦٧/٣٠	٦٠/٨٣	٤٧/٠١	٨٧/٥٨	٧٠/٩٥	<٠/٠٠٥
	E. coli	٢٥٠٨/٦٨	١٥٣٤/٦٦	١٦٥٨/٨٢	٣٣٥٨/٥٥		
	S. uberis	٢٩٨٧/٨٦	١٥٣٥/٢١	٢١٦٩/٨٠	٣٨٠٥/٩٢		
	S. aureus	٥٦٧٢/٢٢	١٩٧٧/٦٢	٤٣٤٣/٦٤	٧٠٠٠/٨١		
آمیلوئید A سرم (mg/L)	منفی	٢٥/٣٠	٢٩/٩٢	١٥/٣٣	٣٥/٢٨	/١٦٠ ٥٥	<٠/٠٠٥
	E. coli	١٦٢/٣٧	٤٥/٠٤	١٣٧/٤٢	١٨٧/٣١		
	S. uberis	١٦٣/٥٩	١٤/٢٢	١٥٦/٠١	١٧١/١٧		
	S. aureus	٢٣٧/٩٧	٤٦/٢٦	٢٠٦/٨٨	٢٦٩/٠٥		

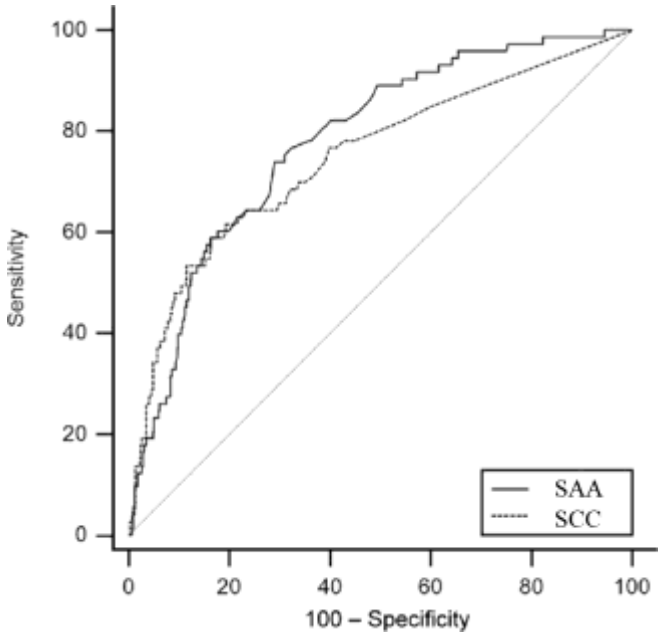
* One-way ANOVA

مقایسه دوتایی گاوهای آلوده به انواع مختلف باکتری از نظر SCC، SAA، تفاوت معنی داری را در سطوحSCC ، SAA، بین گاوهایی با آزمایش کشت منفی نشان می دهد. افراد مبتلا به *E. coli*، *S. aureus* و *S. uberis* ($P < 0.005$). علاوه بر این، گاوهای آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* تفاوت معنی داری در سطوح SCC، SAA، در

منحنی راک

دقت تشخیصی SCC، SAA، در تشخیص ورم پستان در گاوها مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس مقایسه با گاوهای آلوده به *E. coli* و *S. uberis* نشان دادند ($P < 0.005$). با این حال، تفاوت معنی داری بین *E. coli* و *S. uberis* از نظر SCC ($P=0.68$)، SAA ($P<0.99$)، مشاهده نشد. نتایج بیشتر نشان داد که همبستگی قوی بین میانگین SCC ($P<0.005$ و $r=0.91$) و SAA ($P<0.005$ و $r=0.84$) وجود داشت.

نتایج، حساسیت و ویژگی برای SCC (٪۹۸)، SAA (٪۹۰)، در تشخیص ورم پستان در گاوها بالا بود (شکل ۲).



شکل ۲. منحنی راک برای تعیین دقت تشخیصی SCC، SAA، در تشخیص ورم پستان در گاوها

بحث

این مطالعه به منظور بررسی نقش تشخیصی نشانگرهای التهابی در گاوهای ماستیتیک تحت بالینی انجام شد. به طور خلاصه، نتایج ما نشان داد که *E. coli* و *S. aureus* پاتوژن های اولیه ایجاد کننده ورم پستان بودند. غلظت سرمی مقادیر SAA به طور معنی داری با ورم پستان تحت بالینی ناشی از *E.coli* و استافیلوکوکوس مرتبط بود.

ورم پستان یک بیماری عفونی با علل مختلف از جمله باکتریهای واگیردار و فرصت طلب محیطی است (Stanek *et al.*, 2024). در مطالعه حاضر، عوامل باکتریایی در نسبت قابل توجهی، ۹۲ درصد از کل نمونه های شیر ورم پستان شناسایی شد. در مطالعه‌ای که توسط سادات و همکارانش انجام شد، این میزان ۷۳/۷۵ درصد برآورد شد (Sadat *et al.*, 2023). این مشاهدات با مطالعات قبلی که ورم پستان باکتریایی را به عنوان شایع‌ترین علت ورم پستان مشخص کرده بودند، مطابقت دارد. مطالعات نشان داده‌اند که باکتری‌های مختلفی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اوبریس* و *اشریشیا کلی* می‌توانند باعث عفونت پستان شوند و عوامل باکتریایی به طور قابل توجهی در بروز ورم پستان نقش دارند. این بیماری نه تنها می‌تواند به کاهش کیفیت و کمیت شیر منجر شود، بلکه تأثیرات منفی بر سلامت گاوها نیز دارد. استفاده از روش‌های دقیق تشخیصی و درمان مؤثر از اهمیت بسیاری برخوردار است و این مطالعات به روشن شدن عوامل مهم در بروز ورم پستان و راه‌های مقابله با آن کمک کرده‌اند (Ashraf & Imran, 2020; Rustas *et al.*, 2024).

علاوه بر این، ما دریافتیم که *اشرشیا کلی* و *استافیلولوکوکوس اورئوس* پاتوژن های اولیه ایجاد کننده ورم پستان هستند، که مطالعات قبلی را تایید می کند که این دو باکتری را به عنوان شایع ترین و مهم ترین عوامل ورم پستان شناسایی کرده اند (Sadat et al., 2023; Yin *et al*., 2022).

در مطالعه حاضر، شیوع کمی کمتر (حدود ۳۳/۳٪) از موارد ورم پستان بالینی در مواردی که *E. coli* پاتوژن بود، مشاهده شد، در حالی که *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس اوبریس* مسئول ورم پستان بالینی و تحت بالینی در ٦٦/٧٪ موارد بودند. این یافته‌ها مشابه با نتایج مطالعه قبلی اشرف و همکاران (۲۰۲۰) هستند که در آن شیوع ورم پستان بالینی به میزان کمی کمتر، حدود ۳۱٪ گزارش شده بود و مشخص شد که *E. coli* به عنوان پاتوژن عمده در این موارد نقش داشته است (Ashraf & Imran, 2020). این مطالعات نشان می‌دهند که باکتری *E. coli* به طور قابل توجهی در ایجاد ورم پستان دخالت دارد و یکی از عوامل اصلی بروز این بیماری است. این نتایج تأیید می‌کنند که ورم پستان باکتریایی، به ویژه در حضور *E. coli*، می‌تواند به شیوع بالا و مشکلات جدی در تولید شیر و سلامت گاوها منجر شود. استفاده از روش‌های دقیق تشخیصی و درمان‌های مؤثر برای مدیریت این بیماری ضروری است تا تأثیرات منفی آن به حداقل برسد (Ibrahim *et al*., 2018). با این حال، در مطالعه سادات و همکاران، استافیلوکوکوس اورئوس در ٧٦ درصد موارد تحت بالینی جدا شد که با سایر مطالعات انجام شده در مصر مطابقت دارد (Algammal *et al*., 2020; Elsayed & Dawoud, 2015; Sadat *et al*., 2023; Younis *et al*., 2018). در حالی که یافته های مطالعه حاضر با این نتایج مطابقت نداشت، این میزان در مطالعه ما به طور قابل توجهی کمتر برآورد شد. این اختلاف می تواند به دلیل تغییرات مقاومت باکتریایی در مکان های مختلف جغرافیایی باشد.

تشخیص آزمایشگاهی در تشخیص گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بسیار مهم است. مدیریت ورم پستان در درجه اول به SCC و CMT بستگی دارد که هر دو تعداد سلول ها را در نمونه های شیر کمیت می کنند. با این حال، هر یک از این روش های تشخیصی محدودیت های خود را دارند که نیاز به نشانگرهای زیستی جدید برای ورم پستان تحت بالینی را برجسته می کند.

نشانگرهای حساس، مانند سیتوکین ها و پروتئین فاز حاد، به طور بالقوه می توانند به عنوان ابزار تشخیصی اولیه ورم پستان و همچنین در اقدامات پیشگیرانه کمک کننده باشند. بررسی‌های قبلی نشان داد که تعیین کمیت پروتئین‌های فاز حاد (APPs)، مانند آمیلوئید A، در پلاسمای خون یا سرم می‌تواند به تشخیص بیماری، تشخیص پیش آگهی و تعیین میزان التهاب کمک کند (González *et al*., 2019).

یافته های این مطالعه ویژگی و حساسیت بالایی را برای تشخیص ورم پستان ناشی از ***E.coli*** و *استافیلوکوک* نشان داد. به همین ترتیب، تحقیقات سادات و همکاران دریافتند که گاوهایی که از بیماری رنج می‌برند، سطوح آمیلوئید A را در حیوانات ورم پستان تحت بالینی و بالینی در مقایسه با همتایان سالم خود به طور قابل‌توجهی افزایش دادند (Sadat *et al.*, 2023).

مطالعات مختلف تایید کرده اند که غلظت آمیلوئید A در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان در مقایسه با گاوهای سالم بیشتر است (Nielsen *et al.*, 2024; Turk *et al.*, 2021). در این زمینه، مطالعه بوچنیارز و همکاران. دریافتند که مقدار آمیلوئید A در شیر گاوهایی که مشکلات سلامتی دارند در مقایسه با گاوهای بدون بیماری به طور قابل توجهی بالاتر است. اما تفاوتی در سطح آمیلوئید A در سرم بین آنها مشاهده نشد (Bochniarz *et al.*, 2017).

تحقیقات بیشتری برای کشف این اختلافات مورد نیاز است. با این حال، عدم وجود همبستگی قابل توجه بین غلظت آمیلوئید A سرم و آمیلوئید A شیر در طول ورم پستان تحت بالینی نشان می دهد که آمیلوئید A ممکن است به صورت موضعی در پستان به عنوان پاسخ به عفونت تولید شود. سطح آمیلوئید Aدر شیر معمولاً با افزایش SCC در شیر افزایش می یابد (Bochniarz *et al.*, 2017).

شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد در موارد خاصی، سطح بالایی از آمیلوئید A در شیر گاوهایی که هیچ علامتی از ورم پستان نداشتند و SCC کمتر از ۲۰۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر شیر داشتند، شناسایی شد. این گاوها ممکن است قبلاً تحت یک فرآیند التهابی قرار گرفته باشند، همان طور که با افزایش سطح آمیلوئید A در شیر قبل از ظهور علائم نشان داده شده است (O'Reilly *et al.*, 2024). از این رو، SAA به طور بالقوه می تواند نشانگر حساس تر و اولیه التهاب در غده پستانی باشد. ظرفیت شناسایی یک فرم تحت بالینی التهاب بسیار مهم است، زیرا گاوهایی که علائم آشکاری از خود نشان نمی دهند اغلب درمان نشده می مانند (Wollowski *et al.*, 2021).

علاوه بر این، آنها نشان دادند که ***E. coli***، بر خلاف *استافیلوکوکوس اورئوس*، می تواند باعث فعال شدن NF-B (Nuclear factor kappa B) در سلول های اپیتلیال پستان گاو شود. تا آنجا که می دانیم، زیرواحد NF-B p65 از پروتئین بازدارنده جدا می شود و از سیتوپلاسم به سمت هسته حرکت می کند. در هسته، رونویسی ژن های هدف خاص مانند TNF-α، IL-1B و IL-6 را آغاز می کند. تولید سیتوکین ها و کموکاین های پیش التهابی برای مکانیسم های دفاعی میزبان و بقای آن بسیار مهم است. تولید این سیتوکین ها می تواند منجر به علائم بالینی سیستمیک شود. IL-6 نقش مهمی در فاز حاد التهاب دارد و IL-8 یک کموکاین مهم است که نوتروفیل ها را به محل عفونت جذب می کند (Fu *et al.*, 2013; Johnzon *et al.*, 2018). کشف شده است که ***E. coli*** سطح بالاتری از بیان

سیتوکین را در سلول های اپیتلیال پستان گاو در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس تحریک می کند. این تنوع در تولید سیتوکین می تواند عاملی کمک کننده باشد که چرا *E. coli* اغلب منجر به ورم پستان بالینی می شود، در حالی که استافیلوکوکوس اورئوس تمایل به ایجاد ورم پستان تحت بالینی مزمن و پایدار دارد (Johnzon *et al*., 2018; Liu *et al*., 2022).

این مطالعه اطلاعات ارزشمندی در مورد نقش تشخیصی نشانگرهای التهابی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی در گاوهای شیری ارائه می دهد. با این حال، توجه به این نکته مهم است که این مطالعه دارای محدودیت‌های خاصی است که باید مورد توجه قرار گیرد. التهاب ناشی از ورم پستان به طور بالقوه می تواند ناشی از عواملی غیر از عفونت باکتریایی باشد. این عفونت باکتریایی می تواند سیستم ایمنی بدن را تضعیف نموده، به عوامل ثانویه اجازه ورود داده، یا اشتهای دام را کاهش داده، که منجر به علائم کمبود ناشی از تغذیه می شود. در واقع باید مطالعات آینده در این زمینه انجام شود. این مطالعات باید تعداد زیادی از گاوهای مبتلا به ورم پستان را از نظر اختلالات مختلف میکروبیولوژیکی، محیطی و تغذیه ای بررسی کنند. علاوه بر این، این تحقیق اهمیت بررسی بیشتر سیتوکین ها را فراتر از مواردی که قبلا مورد مطالعه قرار گرفته است، برجسته می کند.

نتی‌جه گی‌ری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آزمون CMT و شاخص‌های SCC و SAAابزارهای مفیدی برای تشخیص ورم پستان بالینی و تحت بالینی در گاوهای شیری هستند. آزمون CMTتوانست ۳۸ درصد از گاوهای سالم و ٦٢ درصد از گاوهای مبتلا به ورم پستان را به درستی شناسایی کند. همچنین، تفاوت معنی‌داری در میانگین SCCو SAA بین گاوهای سالم و گاوهای مبتلا به ورم پستان مشاهده شد، که این نشان‌دهنده افزایش میزان سلول‌های سوماتیک و آمیلوئید A سرم در گاوهای مبتلا به ورم پستان است. نتایج نشان دادند که ۵۷ درصد از نمونه‌های کشت مثبت، شامل باکتری‌های *E. coli*، *S. uberis* و *S. aureus* بودند که از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده ورم پستان به‌شمار می‌روند. همچنین، همبستگی قوی بین میانگین SCC و SAA تأیید کننده این است که این دو شاخص می‌توانند به عنوان ابزارهای دقیق برای تشخیص ورم پستان استفاده شوند. بنابراین الگوهای مختلف سایتوکاین های التهابی در گاوهای شیری مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و بالینی می تواند به عنوان شاخص وضعیت ایمنی گاو عمل کند. این نه تنها به پیش‌بینی آسیب‌پذیرترین دوره‌ها برای شروع بیماری کمک می‌کند، بلکه به ایجاد پروتکل‌های مدیریتی مؤثر برای ارتقای سلامت از طریق برنامه‌های پرورش مناسب و واکسیناسیون کمک می‌کند.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از بخشی از پایان نامه دانشجویی دکتری عمومی دامپزشکی شوشتر است. بدین وسیله از تملمی دست اندرکاران بهبهان، شوشتر و اصفهان سپاسگزاری به عمل می اید.

منابع

۱- Abd El-Hamid, M. I., El-Tarabili, R. M., Bahnass, M. M., Alshahrani, M. A., Saif, A., Alwutayd, K. M., Safhi, F. A., Mansour, A. T., Alblwi, N. A. N., & Ghoneim, M. M. (2023). Partnering essential oils with antibiotics: proven therapies against bovine Staphylococcus aureus mastitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*, 1265027 .

۲- Agregán, R., Echegaray, N., López-Pedrouso, M., Kharabsheh, R., Franco, D., & Lorenzo, J. M. (2021). Proteomic advances in milk and dairy products. *Molecules*, *26* ,(۱۳) ۳۸۳۲.

۳- Algammal, A. M., Enany, M. E., El-Tarabili, R. M., Ghobashy, M. O., & Helmy, Y. A. (2020). Prevalence, antimicrobial resistance profiles, virulence and enterotoxins-determinant genes of MRSA isolated from subclinical bovine mastitis in Egypt . *Pathogens*, *9*(5), 362 .

۴- Ashraf, A., & Imran, M. (2020). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal health research reviews*, *21*(1), 36-49 .

۵- Bochniarz ,M., Zdzisińska, B., Wawron, W., Szczubiał, M., & Dąbrowski, R. (2017). Milk and serum IL-4, IL-6, IL-10, and amyloid A concentrations in cows with subclinical mastitis caused by coagulase-negative staphylococci. *Journal of dairy science*, *100*(12), 9674-9 .۶۸۰

۶- Bochniarz, M., Ziomek, M., Szczubiał, M., Dąbrowski, R., Wochnik, M., Kurek, Ł., Kosior-Korzecka, U., & Nowakiewicz, A. (2024). Interleukin-6 as a Milk Marker of Clinical and Subclinical Intramammary Infections (IMI) in Cows Caused by Streptococcus spp. *Animals*, *14*(7), 1100 .

۷- Dillon, M. E., & Jackson-Smith, D. (2021). Impact of the veterinary feed directive on Ohio cattle operations. *PloS one*, *16*(8), e0255911 .

۸- Elsayed, M. S., & Dawoud, M. A. (2015). Phenotypic and genotypic detection of virulence factors of Staphylococcus aureus isolated from clinical and subclinical mastitis in cattle and water buffaloes from different farms of Sadat City in Egypt. *Veterinary world*, *8*(9), 1051 .

۹- Farkaš, V., Beletić, A., Kuleš, J., Thomas, F. C., Rešetar Maslov, D ,.Rubić, I., Benić, M., Bačić, G., Mačešić, N., & Jović, I. (2024). Biomarkers for subclinical bovine mastitis: a high throughput TMT-based proteomic investigation. *Veterinary research communications*, *48*(4), 2069-2082 .

۱۰- Feng, L., Yuxia, C., Zichen, W., Zipeng, L., Ahmad, M. J., Ming, L., Tengyun, G., & Shenhe, L. (2021). The effect of exogenous melatonin on milk somatic cell count in buffalo. *Pak Vet J*, *41*, 152-155 .

۱۱- Fu, Y., Zhou, E., Liu, Z., Li, F., Liang, D., Liu, B., Song, X., Zhao, F., Fen, X., & Li ,D. (2013). Staphylococcus aureus and Escherichia coli elicit different innate immune

responses from bovine mammary epithelial cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, *155*(4), 245-252 .

۱۲- Ghafoori, Z., Tehrani, T., Pont, L., & Benavente, F .(۲۰۲۲) .Separation and characterization of bovine milk proteins by capillary electrophoresis- mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, *45*(18), 3614-3623 .

۱۳- González, M. D., Arnold, C. F., Rodríguez, M. F., Checa, R., Montoya, A., Fuentes, M. P., Noguer, C .R., Subiela, S. M., Cerón, J., & Miró, G. (2019). Effect of two treatments on changes in serum acute phase protein concentrations in dogs with clinical leishmaniosis. *The Veterinary Journal*, *245*, 22-28 .

۱۴- Ibraheim, H. K., Fayez, R. A., Jasim, A. S., & Gharban, H. A. (2023). Role of nuc gene in Staphylococcus aureus to phagocytic activity in different cattle infections. *Open Veterinary Journal*, *13*(8), 1021-1026 .

۱۵- Ibrahim, E. S. F., El-Wahab, A., Khalil, S., & Torky, H. (2018). Prevalence of ESBL producing Enterobacteriacae isolated from bovine mastitis milk. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, *58*(1), 102-108 .

۱۶- Jiménez-Velásquez, S., Pacheco-Montealegre, M., Torres-Higuera, L., Uribe-Gutiérrez, L., Burbano-David, D., Dávila-Mora, L., Renjifo-Ibáñez ,C., & Caro-Quintero, A. (2024). Genus-targeted markers for the taxonomic identification and monitoring of coagulase-positive and coagulase-negative Staphylococcus species. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *40*(11), 333 .

۱۷- Johnzon, C.-F., Dahlberg, J., Gustafson, A.-M., Waern, I., Moazzami, A. A., Östensson, K., & Pejler, G. (2018). The effect of lipopolysaccharide-induced experimental bovine mastitis on clinical parameters, inflammatory markers, and the metabolome: a kinetic approach. *Frontiers in immunology*, *9*, 1487 .

۱۸- Lee, S., Reo, S. H., Kim, S., Kim, S., Lee, E. S., Cha, B. S., Shin, J., Han, J., Ahn, S. M., & - Shin, H.-S. (2024). Colorimetric detection of Staphylococcus aureus based on direct loop-mediated isothermal amplification in combination with lateral flow assay. *BioChip Journal*, *18*(1), 85-92 .

۱۹- Liu, T.-W., Chen, C.-M., & Chang, K.-H. (2022). Biomarker of neuroinflammation in Parkinson's disease. *International journal of molecular sciences*, *23*(8), 4148 .

۲۰- Maity, S., & Ambatipudi, K .(۲۰۱۹) .Quantitative proteomics of milk whey reveals breed and season specific variation in protein abundance in Holstein Friesian cow and Murrah buffalo. *Research in veterinary science*, *125*, 244-252 .

۲۱- Neculai-Valeanu, A.-S., & Ariton, A.-M. (2022). Udder health monitoring for prevention of bovine mastitis and improvement of milk quality. *Bioengineering*, *9*(11), 608 .

۲۲- Nielsen, L. N., Petersen, M. B., Capion, N., Lundsgaard, J. F. H., & Jensen, A. L. (2024). Performance of an automated immunoturbidimetric assay for bovine serum amyloid A. *Veterinary Clinical Pathology*, *53*(2), 229-233 .

۲۳- O'Reilly, E. L., Viora, L., Malcata, F., Pepler, P. T., Zadoks, R., Brady, N., Hanh, H. Q., McLaughlin, M., Horvatic, A., & Gelemanovic, A. (2024). Biomarker and proteome analysis of milk from dairy cows with clinical mastitis: Determining the effect of different bacterial pathogens on the response to infection. *Research in veterinary science*, *172*, 105240 .

۲۴- Otsuka, M., Sugiyama, M., Ito, T., Tsukano, K., Oikawa, S., & Suzuki ,K. (2021). Diagnostic utility of measuring serum amyloid A with a latex agglutination turbidimetric immunoassay in bovine mastitis: Comparison with haptoglobin and alpha 1 acid glycoprotein. *Journal of Veterinary Medical Science*, *83*(2), 329-332 .

۲۵- Rešetar Maslov, D., Thomas, F. C., Beletić, A., Kuleš, J., Rubić, I., Benić, M., Bačić, G., Maćešić, N., Eraghi, V., & Farkaš, V. (2023). Distinguishing natural infections of the

bovine mammary gland by Staphylococcus from Streptococcus spp. using quantitative milk proteomics. *Animals*, *13*(11), 1829 .

۲۶- Rustas, B. O., Persson, Y., Ternman, E., Kristensen, A. R., Stygar, A. H., & Emanuelson, U. (2024). The evolutionary operation framework as a tool for herd-specific control of mastitis in dairy cows. *Livestock Science*, *279*, 105390 .

۲۷- Sadat, A., Farag, A. M., Elhanafi, D., Awad, A., Elmahallawy, E. K., Alsowayeh, N., El-Khadragy, M. F., & Elshopakey, G. E. (2023). Immunological and oxidative biomarkers in bovine serum from healthy, clinical, and sub-clinical mastitis caused by Escherichia coli and Staphylococcus aureus infection. *Animals*, *13*(5), 892 .

۲۸- Sadat, A., Ramadan, H., Elkady, M. A., Hammad, A. M., Soliman, M. M., Aboelenin, S. M., Al-Harthi, H. F., Abugomaa, A., Elbadawy, M., & Awad, A. (2022). Phylotypic Profiling, Distribution of Pathogenicity Island Markers, and Antimicrobial Susceptibility of Escherichia coli Isolated from Retail Chicken Meat and Humans. *Antibiotics*, *11*(9), 1197 .

۲۹- Sadat, A., Shata, R. R., Farag, A. M., Ramadan, H., Alkhedaide, A., Soliman ,M. M., Elbadawy, M., Abugomaa, A., & Awad, A. (2022). Prevalence and characterization of PVL-positive Staphylococcus aureus isolated from raw cow's milk. *Toxins*, *14*(2), 97 .

۳۰- Stanek, P., Żółkiewski, P., & Januś, E. (2024). A Review on mastitis in dairy cows research: Current status and future perspectives. *Agriculture*, *14*(8), 1292 .

۳۱- Tegegne, H. A., Koláčková, I., Florianová, M., Gelbíčová, T., Madec, J.-Y., Haenni, M., & Karpíšková, R. (2021). Detection and molecular characterisation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from raw meat in the retail market. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *26*, 233-238 .

۳۲- Turk, R., Rošić, N., Kuleš, J., Horvatić, A., Gelemanovic, A., Galen, A., Ljubić, B. B., Benić, M., Stevanović, V., & Mrljak, V .(۲۰۲۱) .Milk and serum proteomes in subclinical and clinical mastitis in Simmental cows. *Journal of Proteomics*, *244*, 104277 .

۳۳- Wollowski, L., Heuwieser, W., Kossatz, A., Addis, M., Puggioni, G., Meriaux, L., & Bertulat, S. (2021). The value of the biomarkers cathelicidin, milk amyloid A, and haptoglobin to diagnose and classify clinical and subclinical mastitis. *Journal of dairy science*, *104*(2), 2106-2122 .

۳۴- Yadav, R., Prakash, A., Kumar, P., & Bhanot, V. (2024). Antimicrobial profiling of mastitis causing bacteria in buffalo milk. *The Indian Journal of Animal Sciences*, *94*(4), 301-307 .

۳۵- Yang, B., He, F., Huan, C., Hu, R., Li, J., Yi, K., Kong, Z., & Luo, Y. (2023). Bovine milk proteome: Milk fat globule membrane protein is the most sensitive fraction in response to high somatic cell count. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *71*(42), 15884-15893 .

۳۶- Yin, Y., Liu, X., Meng, Q., Han, X., Zhang, H., & Lv, Y. (2022). Idiopathic granulomatous mastitis: etiology, clinical manifestation, diagnosis and treatment. *Journal of Investigative Surgery*, *35*(3), 709-720 .

۳۷- Younis, G., Sadat, A., & Maghawry, M. (2018). Characterization of coa gene and antimicrobial profiles of staphylococcus aureus isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. *Adv. Anim. Vet .Sci*, *6*(4), 161-168 .

Comparative study of Serum Amyloid A in Blood Cows Affected by Subclinical Mastitis due to *E. coli, Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus*

Mehrad birgani [1], Seyedeh Ommolbanin Ghasemian [2], Seyedeh Zeinab Peighambarzadeh [1]

1. Department of Veterinary, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran.

2.*Department of Veterinary, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran.

*Corresponding Author: Email: Ghasemian1249@yahoo.com

Abstract

Background & Purpose: This study aimed to evaluate the diagnostic value of Serum Amyloid A (SAA), For early detection of subclinical mastitis in cows infected by *Escherichia coli (E. coli*) and *staphylococcus aureus* infections.

Materials & Methods: This cross-sectional analytical study, conducted in 2024 in Behbahan, Iran,evaluated inflammatory markers in 79 dairy cows with clinical and subclinical mastitis. The cows divided into three groups: Healthy group (30), Subclinical mastitis group (30), and the clinical mastitis group (10). Then, SAA concentrations were evaluated for further analyses. The diagnostic value of serum amyloid A was determined by calculating the areas under the curve (AUCs) of the ROC curves.

Results: Overall, among the patients with positive culture tests, 57% (45 cases) were infected with E. coli, 19% (15 cases) with Streptococcus obris, and 15.2% (12 cases) with Staphylococcus aureus. A strong correlation was observed between the mean SCC and SAA values ($P<0.005$). The sensitivity and specificity of somatic cells in milk (98%) and serum amyloid A (90%) for diagnosing mastitis in cows were high. **Conclusion:** The present study showed that mastitis in dairy cows is associated with increased serum amyloid A. This study suggests that changes in this biomarker can be used for diagnosing the disease.

Keywords: *Escherichia coli*, Serum Amyloid A, Mastitis, *Staphylococcus aureus*