ارتباط بین غلظت آمیلوئید A و هاپتوگلوبین شیر با الگوی الکتروفورتیک پروتئینهای سرم شیر گاو به روش $SDS\text{-}PAGE$ دررورم پستان تحت بالینی ناشی ازعوامل میکروبی شایع در ایران

حمیده اسمعیل‌زاده[۱]، شهاب‌الدین صافی[۲*]، سیدحامد شیرازی بهشتی‌ها[۳]، مهدی سخا[۴]

۱-دانش‌آموخته دکترای دامپزشکی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲-دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۳-استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، تهران، ایران

۴-دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۳/۵/۳ پذیرش نهایی: ۹۳/۶/۱۰)

چکیده

ورم پستان، شایع‌ترین و پرهزینه ترین معضل گله های گاو شیری است به طوری که بر تولید و کیفیت شیر تاثیر سوء می‌گذارد. هدف از این مطالعه مقایسه الگوی الکتروفورتیک پروتئینهای سرم شیردرگاوهای سالم ومبتلابه ورم پستان تحت بالینی ناشی ازعوامل میکروبی شایع درایران به روش SDS-PAGE باهاپتوگلوبین وآمیلوئید A شیر و نیز مقایسه ارزش تشخیصی آمیلوئید A شیر، آلبومین، آلفالاکتالبومین، بتالاکتوگلوبولین و ایمونوگلوبولین سرم شیر با شمارش سلول های سوماتیک در تشخیص ورم پستان تحت بالینی است.پنجاه و نه راس گاو نژاد هلشتاین به طور تصادفی از ۵ گاوداری استان تهران انتخاب شدند. نمونه های شیر از گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اخذ گردید. نمونه های شیر به دو قسمت مجزا تقسیم شد که یک قسمت به منظور شمارش سلول‌های سوماتیک و کشت باکتریولوژیک در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکرب‌شناسی و قسمت دیگر جهت جداسازی سرم شیر و آماده سازی برای الکتروفورز و نیز اندازه گیری پارامترهایی مانند: آمیلوئید A، پروتئین تام، آلبومین، آلفالاکتالبومین، بتالاکتوگلوبولین و ایمونوگلوبولین سرم شیر به آزمایشگاه کلینیکال پاتولوژی ارسال شد. به منظور تفکیک پروتئین‌های سرم شیر از روش الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد. آمیلوئید A شیر در نقطه برش ۰/۵۲ میلی‌گرم در لیتر، صحیح‌ترین تست در بین سایر پارامترها در تشخیص ورم پستان تحت بالینی بود. از طرفی مقایسه بین الگوی الکتروفورتیک سرم شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با گاوهای سالم نشان داد که در سرم شیر گاوهای مبتلا، باندهایی با وزن مولکولی بالا در محدوده ۱۷۰-۷۰ کیلودالتون وجود داشتند که در گاوهای سالم هیچ باندی در این محدوده موجود نبود. نتیجه گیری، به نظر می‌رسد که SDS-PAGE می تواند به عنوان یک آزمون مناسب در تشخیص ورم پستان تحت بالینی کمک نماید.

واژگان کلیدی: ورم پستان تحت بالینی، آمیلوئیدA، پروتئین سرم شیر، الکتروفورز

*- پست الکترونیکی نویسنده مسئول: safishahab@yahoo.com

مقدمه

در گذشته به التهاب غده پستان ورم پستان گفته می‌شد ولی از آنجا که این تعریف بیشتر، موارد دارای علائم التهاب را شامل می‌شود و موارد ورم پستان غیر بالینی یا مخفی را در بر نمی‌گیرد درحال حاضر ورم پستان به بروز پاسخ سیستم دفاعی پستان اطلاق می‌شود که نشانه‌های بالینی آن ممکن است قابل مشاهده و یا غیرقابل مشاهده باشد، حضور عامل بیماری زا در پستان و به دنبال آن پاسخ سیستم ایمنی در نوع بالینی شامل بروز انواع درجات التهاب حاد یا مزمن است و در نوع مخفی یا غیربالینی شامل افزایش تعداد سلولهای سوماتیک و کاهش تولید شیر است. بنابراین بیماری ورم پستان طیفی از حالات بسیار شدید همراه با واکنش عمومی و توکسمی تا حالات خفیفی است که تنها در برخی موارد لخته های چرک در شیر دیده می شود. ورم پستان غیربالینی یا مخفی بدون علائم ظاهری و نشانه های بالینی است و تنها از راه آزمایش های مختلف مشخص می شود (محمد صادق، ۱۳۸۸). گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی به آسانی به وسیله دامدار و دامپزشک تشخیص داده می شوند و تحت درمان مناسب قرار می گیرند. مشکل در موارد ورم پستان تحت بالینی است که علائم بالینی ندارند و مخفی و درمان نشده باقی می‌مانند. ورم پستان تحت بالینی در گاوهای شیری حائز اهمیت است به طوری که ۸۰-۷۰ درصد از خسارت های ناشی از تورم پستان مربوط به ورم پستان تحت بالینی است. ورم پستان تحت بالینی می تواند موجب کاهش ۷۰ درصد در تولید شیر گله شود. ورم پستان تحت بالینی باعث کاهش کمیت و کیفیت شیر می شود و خطر انتقال بیماری به گاوهای سالم نیز وجود دارد که عدم تشخیص به موقع این بیماری منجر به اپیدمی وسیع بیماری در گله و افزایش هزینه درمانی نیز می‌شود. به طوری که در بسیاری از گله‌های شیری به ازای هر یک گاو مبتلا به ورم پستان بالینی ۴۰-۱۵ راس گاو مبتلا به ورم پستان تحت بالینی وجود دارد (Bailey, 2007). برای تشخیص ورم پستان تحت بالینی می‌توان از آزمایش‌های مختلف نظیر شمارش سلول‌های سوماتیک شیر، آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی، آزمایش‌های باکتریولوژیک، اندازه‌گیری هدایت الکتریکی شیر و... استفاده نمود. اخیرا کاربرد پروتئین‌های مرحله حاد در بررسی و مدیریت سلامت حیوان مورد توجه فراوان قرار گرفته است. زیرا شاخص‌های سریع و حساسی بوده و می توانند اطلاعات ارزشمندی را در خصوص وسعت آسیب در حال پیشرفت و ارزیابی درمان بدهند. با استفاده از اطلاعات به دست آمده از بالا بودن غلظت پروتئین‌های مرحله حاد در موارد شیوع عفونت های بالینی و تحت بالینی در حال پیشرفت، بسته به شدت و مدت پاسخ مرحله حاد می توان شدت عفونت را پیش بینی کرد (Kaneko, *et al.*, 2008).

آمیلوئید A جزء پروتئین‌های فاز حاد اصلی در گاو است، به طوری که حساسیت و ویژگی بالایی داشته و در پاسخ به التهاب پستان تا چندین برابر در سرم و شیر افزایش می یابد، آلبومین سرم جزء پروتئین‌های فاز حاد منفی است به طوری که در طی واکنش فاز حاد میزان آن کاهش می‌یابد (Kaneko, *et al.*, 2008) اما در شیر جزء پروتئین های فاز حاد مثبت است به طوری که مشخص شده میزان آن به طور معنی‌داری در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی نسبت به گاوهای سالم افزایش می‌یابد (Urech, *et al.*, 1999). به علاوه مشخص شده که آلبومین، سنتز خارج کبدی نیز دارد به طوری که توسط سلول‌های اپی تلیال غده پستان نیز ساخته می شود و

این سنتز در موارد التهاب غده پستان افزایش می یابد (Shamay, *et al*., 2005). بتالاکتوگلوبولین یک پروتئین اختصاصی در شیر است که میزان آن در شیر در طی ورم پستان کاهش می یابد بنابراین می توان آن را به عنوان یک پروتئین فاز حاد منفی در شیر قلمداد کرد (Batavani, *et al*., 2007). لازم به ذکر است که در مقایسه بین سنجش پروتئین های فاز حاد در سرم و شیر به دلیل این که می توان تعداد زیادی نمونه شیر با استرس کمتر به دست آورد، شیر بر سرم برتری دارد (Horadagoda, *et al*., 1999). الکتروفورز به روش SDS-PAGE یک روش کم هزینه، سریع و تکرار پذیر در مطالعه پروتئین ها است. این روش به طور معمول برای بررسی مراحل خالص‌سازی، محاسبه مقدار نسبی و تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها و پپتیدها بکار می رود.در ضمن، با انجام روش بلاتینگ بعد از آن، امکان شناسایی دقیق پروتئین ها فراهم می‌شود. این روش را می توان به هدف خالص سازی مقادیر کم پروتئین ها بکار برد. بدین لحاظ امروزه SDS-PAGE به عنوان یکی از پر استفاده ترین روش‌ها در میان روش‌های الکتروفورزی مطرح است.

یکی ازمهم‌ترین ترکیبات شیر پروتئینهای آن می‌باشد. که به دوبخش پروتئینهای کازئینی وغیرکازئینی تقسیم میشوند. مطالعات متعددی تا کنون برروی تاثیر ورم پستان بالینی وتحت بالینی برپروتئینهای سرم شیرپرداخته‌اند. ولی برروی بررسی ومقایسه الگوی الکتروفورتیک پروتئینهای سرم شیردرورم پستان تحت بالینی به روش SDS-PAGEپرداخته نشده است. از این رو بر آن شدیم تا با انجام این مطالعه، ضمن تعیین الگوی یاد شده، روشی قابل اعتماد و نسبتا ارزان رابرای ارزیابی پروتئین های مرحله حاد معرفی نماییم.

به طور کلی اهداف این مطالعه، تعیین الگوی الکتروفورتیک پروتئین های سرم شیر در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی ناشی از عوامل میکروبی شایع در ایران به روش SDS-PAGE و نیز مقایسه درستی بالینی روش SDS-PAGE با روش اندازه‌گیری آمیلوئید A در تشخیص ورم پستان تحت بالینی بود.

مواد و روش کار

نمونه های مورد مطالعه در این تحقیق متعلق به ۵ گاوداری صنعتی اطراف تهران بودند. گاوهای مورد مطالعه همگی از نژاد هلشتاین بوده، در دوره شیرواری به سر می بردند و سه مرتبه در روز (٤ صبح، ۱۲ ظهر و ۷ شب) مورد دوشش قرار می گرفتند. نمونه گیری قبل از دوشش ظهر انجام شد. هیچ یک از گاوهای مورد مطالعه در زمان نمونه گیری، آبستنی بالا نداشته و یا تازه زا نبودند.

قبل از دوشش ظهر از هر گاو پس از ضدعفونی کردن سرپستانک ها هفت مرتبه با اتانول ۷۰ درصد و دور ریختن ۳ دوشش اولیه، ٤ نمونه شیر گرفته شده (از هر کارتیه یک نمونه) و تحت آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی CMT (California Mastitis Test) قرار گرفت. گاوهایی که CMT هر ٤ کارتیه آنها منفی بود به عنوان گاوهایی که احتمالا سالم هستند و گاوهایی که CMT حداقل یک کارتیه آنها مثبت بود به عنوان گاوهایی که احتمالا مبتلا به ورم پستان تحت بالینی هستند، در نظر گرفته شدند.

هر یک از نمونه های شیر به دو قسمت تقسیم شد. قسمت اول نمونه های مورد مطالعه، جهت انجام آزمایش شمارش سلول های سوماتیک و کشت میکروبی سریعا و در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب شناسی و سری دوم نمونه ها تحت شرایط ذکر شده به آزمایشگاه کلینیکال پاتولوژی دانشکده

دامپزشکی انتقال داده شد.

در آزمایشگاه میکروب شناسی در وهله اول آزمایش شمارش سلول های سوماتیک و کشت باکتریایی بر روی نمونه های شیر انجام شد. گاوهایی که در نمونه شیر هر ٤ کارتیه آنها تعداد سلول های سوماتیک کمتر از ۱۰۰ هزار سلول در هر میلی لیتر و نتیجه کشت میکروبی آنها منفی بود به عنوان گروه سالم (گروه شاهد) در نظر گرفته شد. در این گاوها نمونه شیر ٤ کارتیه با یکدیگر مخلوط و به صورت یک نمونه در آزمایش های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. شیر کارتیه هایی که تعداد سلول های سوماتیک در آن بیش از ۱۰۰ هزار سلول در هر میلی لیتر و نتیجه کشت میکروبی آنها مثبت بود به عنوان نمونه های مثبت (مبتلا به ورم پستان تحت بالینی) منظور گردید و بر حسب نوع باکتری جدا شده در گروه های مختلف قرار گرفتند. باکتری هایی که در این تحقیق برای ما اهمیت داشتند و پاتوژنهای شایع ورم پستان تحت بالینی در ایران می‌باشند عبارتند از: *استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استرپتوکوکوس یوبریس و کورینه باکتریوم بوویس*. در نهایت ۱۸ راس گاو سالم (نمونه شیر مخلوط ٤ کارتیه) و ٤۱ راس گاو مبتلا به ورم پستان تحت بالینی مورد ارزیابی‌های بعدی قرار گرفتند.شمارش سلول های سوماتیک به روش دستی و بر اساس پروتکل فدراسیون بین المللی شیر(روش رنگ آمیزی متیلن بلو) انجام پذیرفت (اطیابی ناهید ۱۳۸٤).کشت باکتریایی شیر بر طبق پروتکل موسسه ورم پستان انجام پذیرفت (Harmon, *et al.*, 1976).

به منظور کشت باکتریایی شیر، ابتدا از محیط های کشتی نظیر آگار خون دار و مک کانکی استفاده گردید و سپس به منظور تعیین گونه باکتری، کلنی های به دست آمده به محیط های کشت افتراقی منتقل شد. در آزمایشگاه کلینیکال پاتولوژی، بخشی از نمونه های شیر به داخل میکروتیوب منتقل و تا زمان اعلام نتایج آزمایش شمارش سلول های سوماتیک و کشت میکروبی شیر، جهت انجام آزمایش اندازه گیری آمیلوئید A شیر، در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. بخشی دیگر از نمونه ها وارد فرایند جداسازی سرم شیر گردید. اندازه گیری آمیلوئید A شیر به روش الایزا و با استفاده از کیت شرکت تری دلتا، ساخت کشور ایرلند (Tridelta Ltd, Wicklow, Ireland) و اندازه‌گیری پروتئین سرم شیر به روش برادفورد انجام شد. الکتروفورز SDS-PAGE بر طبق پروتکل موسسه ژنتیک ایرانبا اعمال کمی تغییر انجام پذیرفت. سیستم الکتروفورز مورد استفاده ساخت شرکت بیورد امریکا بود.ولتاژ و مدت زمان مورد استفاده به منظور جداسازی باندهای پروتئینی در سرم شیر به ترتیب ۱۲۰ ولت و ٦۰ دقیقه بود. پس از الکتروفورز، باند های پروتئینی جدا شده بر روی ژل با رنگ کوماسی بلو R-250 به مدت ۲٤ ساعت رنگ آمیزی گردید. پس از اتمام مدت زمان رنگ آمیزی، مراحل رنگ زدایی با محلول رنگ بر که متشکل از ۱۰۰ میلی لیتر متانول، ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیداستیک بود، در سه مرحله انجام پذیرفت. بعد از الکتروفورز، ژل‌ها در ظرف حاوی محلول نگهدارنده، نگهداری و با دستگاه دانسیتومتر، اسکن و منحنی‌های به دست آمده از نمونه‌های سالم و بیمار و نیز الگوی الکتروفورتیک و تعداد باندهای موجود در ژل ها با یکدیگر و با مارکر استاندارد پروتئینی ساخت شرکت سیناکلون مقایسه شدند.سپس مقادیر نسبی هر پروتئین (درصد هر باند پروتئینی) به روش دانسیتومتری در طول موج ٥۲٥ نانومتر تعیین گردید. در نهایت غلظت هر پروتئین با ضرب کردن درصد آن

پروتئین در پروتئین تام محاسبه گردید و به صورت میلی گرم در لیتر گزارش شد.تجزیه و تحلیل آماری نتایج تحقیق حاضر با نرم افزار آماری SPSS ویرایش شانزدهم انجام شد. در ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف یک نمونه ای(One Sample Kolmogorov-Smirnov test) توزیع داده ها مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه آن شد که توزیع تمام داده ها به غیر از پروتئین تام نرمال نیستند، بنابراین به منظور مقایسه نتایج تعداد سلول های سوماتیک و غلظت آمیلوئید A شیر، غلظت آلبومین، آلفالاکتالبومین، بتالاکتوگلوبولین و ایمونوگلوبولین سرم شیر بین گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی ناشی از پاتوژن های مختلف از آزمون من ویتنی استفاده شد. همچنین جهت مقایسه نتایج غلظت پروتئین تام سرم شیر بین دو گروه ذکر شده از آزمون T مستقل استفاده شد. به منظور مقایسه نتایج تعداد سلول های سوماتیک و غلظت آمیلوئید A شیر، غلظت آلبومین، آلفالاکتالبومین، بتالاکتوگلوبولین و ایمونوگلوبولین سرم شیر در ۵ گروه مورد مطالعه (گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با *استافیلوکوکوس*، گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با کورینه باکتریوم بوویس، گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با *استرپتوکوکوس یوبریس*، گاوهای سالم) از آزمون Kruskal Wallis و جهت مقایسه نتایج غلظت پروتئین تام و ایمونوگلوبولین‌های سرم شیر در گروه های مورد مطالعه از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه (ANOVA) استفاده شد.آنالیز راک نیز به منظور مقایسه کارایی هر تست با در نظر گرفتن تعداد سلول‌های سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی انجام پذیرفت.نقاط برش برای غلظت آمیلوئید A شیر و ایمونوگلوبولین سرم شیر به منظور حصول حساسیت و ویژگی بالا برای تشخیص گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و جلوگیری از مصرف بی‌رویه آنتی بیوتیک در درمان گاوهای سالم، انتخاب گردید.

نتایج

نتایج این تحقیق نشان می دهد که بین میانگین تعداد سلول های سوماتیک، غلظت آمیلوئید A شیر، پروتئین تام، بتالاکتوگلوبولین و ایمونوگلوبولین سرم شیر و در گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد.(جدول ۱)

بین میانگین تعداد سلول های سوماتیک شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اختلاف آماری به شدت معناداری وجود داشت ($p\leq$۰/۰۰۱).

بین میانگین غلظت آمیلوئید A شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اختلاف آماری به شدت معناداری وجود داشت ($p\leq$۰/۰۰۱) و در نقطه برش ۱۰۰،۰۰۰ سلول در میلی لیتر برای سلول های سوماتیک، حساسیت و ویژگی آمیلوئید A شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی به ترتیب ۱۰۰درصد و ۱۰۰درصد و درستی بالینی آن بر اساس تعریف گاردنر، بالا (۱/۰۰۰) به دست آمد.

بین میانگین غلظت ایمونوگلوبولین سرم شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اختلاف آماری به شدت معناداری وجود داشت (p≤۰/۰۰۱)، در نقطه برش ۱۰۰،۰۰۰ سلول در میلی لیتر برای سلول‌های سوماتیک، حساسیت و ویژگی ایمونوگلوبولین سرم شیر با نقطه برش ۰/۰۵ در تشخیص ورم پستان تحت بالینی به ترتیب ۹٤ درصد و ۳۰ درصد و در نقطه برش ۰/۱۰۵ به ترتیب ۷٤ و ٦۰ و در نقطه برش ۰/۱٦ به ترتیب ٤۳ و ۸۰ و درستی بالینی

آن بر اساس تعریف گاردنر، بالا (۰/۷٤۲) به دست آمد.

بین میانگین غلظت آلفالاکتالبومین سرم شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اختلاف آماری وجود نداشت (p=۱/۰۰۰).

بین میانگین غلظت بتالاکتوگلوبولین در سرم شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و گاوهای سالم اختلاف معناداری وجود داشت(p=۰./۰۱۵) و میانگین غلظت بتالاکتوگلوبولین سرم شیر در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی نسبت به گاو های سالم به طور معناداری بالاتر بود ((p=۰./۰۱۵).

بین میانگین غلظت آلبومین سرم شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اختلاف آماری معناداری وجود نداشت (p=۰./۱۱)، در تحقیق حاضر با در نظر گرفتن نقطه برش ۱۰۰،۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر برای سلول‌های سوماتیک، میانگین غلظت آلبومین سرم شیر در گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی به ترتیب ۰/۰٤ و ۰/۰٦ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد.

بین میانگین غلظت پروتئین تام سرم شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اختلاف آماری معناداری وجود داشت (p=۰./۰۲۱).

جدول۱- آمار توصیفی برای پارامترهای مورد اندازه گیری در گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با در نظر گرفتن نقطه برش ۱۰۰،۰۰۰ سلول در هر میلی لیتر برای سلولهای سوماتیک

پارامتر	واحد	گروه	تعداد نمونه	میانگین± انحراف معیار	میانه	پایین ترین و بالاترین مقدار	p
آمیلوئید A شیر	میلی‌گرم در لیتر	۱*	۱۸	۰/۶۸ ±۰/۱۱	۰/۵۵	۰/۰۸ –۱/۴۹	≤۰/۰۰۱
		۲**	۴۱	۶/۵ ±۰/۹۲	۴/۶	۰/۳ –۲۲/۵	
پروتئین تام سرم شیر	میلی‌گرم در لیتر	۱	۱۸	۰/۶۸ ±۰/۰۴	۰/۷۵	۰/۳۶ –۰/۹۶	۰/۰۲۱
		۲	۴۱	۰/۸۶ –۰/۰۴	۰/۸۹	۰/۳۰ –۱/۸۰	
آلبومین سرم شیر	میلی‌گرم در لیتر	۱	۱۸	۰/۰۴ ±۰/۰۰۶	۰/۰۵	۰/۰۱ –۰/۱۳	۰/۱۱۰
		۲	۴۱	۰/۰۶ ±۰/۰۰۶	۰/۰۶	۰/۰۱ –۰/۱۷	
بتالاکتوگلوبولین سرم شیر	میلی گرم در لیتر	۱	۱۸	۰/۱۴ ±۰/۰۳	۰/۰۵	۰/۰۱ –۰/۴۵	۰/۰۱۵
		۲	۴۱	۰/۲۷ ±۰/۰۳	۰/۲۴	۰/۰۱ –۰/۶۷	
آلفالاکتالبومین سرم شیر	میلی گرم در لیتر	۱	۱۸	۰/۳۴ ±۰/۰۴۵	۰/۲۸	۰/۰۹ –۰/۶۶	۱/۰۰۰
		۲	۴۱	۰/۳۴ ±۰/۰۳۵	۰/۲۷	۰/۰۳ –۱/۰۸	
ایمونوگلوبولین سرم شیر	میلی گرم در لیتر	۱	۱۸	۰/۱۳ ±۰/۰۲۲	۰/۱۱	۰/۰۱ –۰/۴۲	۰/۱۰۱
		۲	۴۱	۰/۱۶±۰/۰۱۴	۰/۱۶	۰/۰۲ –۰/۴۴	
تعداد سلول های سوماتیک	۱۰۰۰ سلول در میلی لیتر	۱	۱۸	۱۰۳/۱۱±۱۳/۹۴	۹۶	۱۶ –۱۹۷	≤۰/۰۰۱
		۲	۴۱	۱۴۶۸/۱±۲۹۸/۰۱	۹۰۰	۵۲ –۱۰۷۸۸	

*گروه سالم

** گروه بیمار

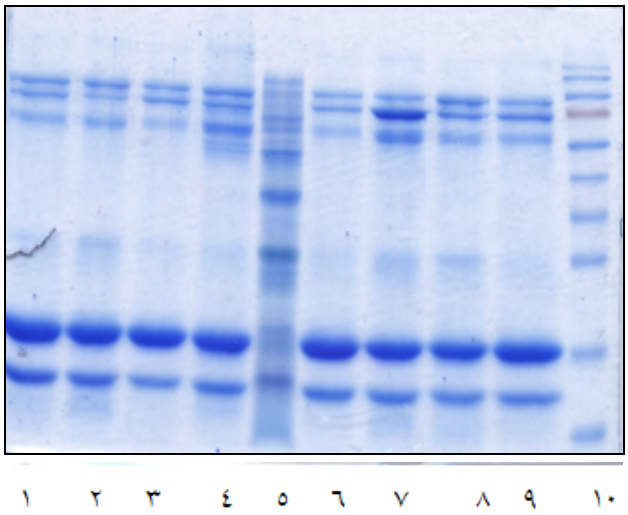
جدول ۲- نقاط برش پیشنهادی، حساسیت، ویژگی، مثبت و منفی کاذب و سطح زیر منحنی پارامترهای مورد اندازه گیری در تشخیص ورم پستان تحت بالینی (بدون توجه به نوع پاتوژن) بر پایه نتایج شمارش سلول های سوماتیک با نقطه برش ۱۰۰،۰۰۰ سلول در هر میلی لیتر

پارامتر	نقطه برش (میلی گرم در لیتر)	حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)	منفی کاذب (درصد)	مثبت کاذب (درصد)	درستی بالینی (سطح زیر منحنی)
آمیلوئید A شیر	۰/۵۲	۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۱/۰۰۰
ایمونوگلوبولین سرم شیر	۰/۰۵	۹۴	۳۰	۶	۷۰	۰/۷۴۲
	۰/۱۰	۷۴	۶۰	۲۶	۴۰	
	۰/۱۶	۴۳	۸۰	۵۷	۲۰	

نقطه برش، حساسیت، ویژگی، مثبت و منفی کاذب و درستی بالینی (سطح زیر منحنی) غلظت آمیلوئید A شیر و ایمونوگلوبولین سرم شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی در جدول ۲ آورده شده است.بر اساس تعداد سلول‌های سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی، بیشترین حساسیت و ویژگی مربوط به اندازه‌گیری غلظت آمیلوئید A شیر و از نظر درستی، بیشترین درستی بالینی، بر پایه سطح زیر منحنی، به ترتیب متعلق به اندازه‌گیری غلظت آمیلوئید A شیر وایمونوگلوبولین سرم شیرمی‌باشد. (جدول ۲).

بر اساس نتایج این تحقیق، اگر نقطه برش سلول‌های سوماتیک در تشخیص ورم پستان تحت بالینی را ۱۰۰،۰۰۰ سلول در میلی لیتر در نظر بگیریم، اندازه گیری غلظت آمیلوئید A شیر دقیق ترین آزمایش در تشخیص ورم پستان تحت بالینی است. به علاوه درستی بالینی ایمونوگلوبولین سرم شیر نیزدر تشخیص ورم پستان تحت بالینی بالا است.

در بررسی الگوی الکتروفورتیک سرم شیر گاوهای مبتلا به ورم‌پستان تحت بالینی به روش SDS-PAGE، باندهایی با وزن مولکولی بالایی در محدوده ۱۷۰-۷۰ کیلودالتون مشاهده شدند که در این رابطه، نمونه‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، حداقل دو باند و حداکثر پنج باند داشتند در حالیکه در گاو های سالم هیچ باندی در این محدوده وجود نداشت (شکل ۱).

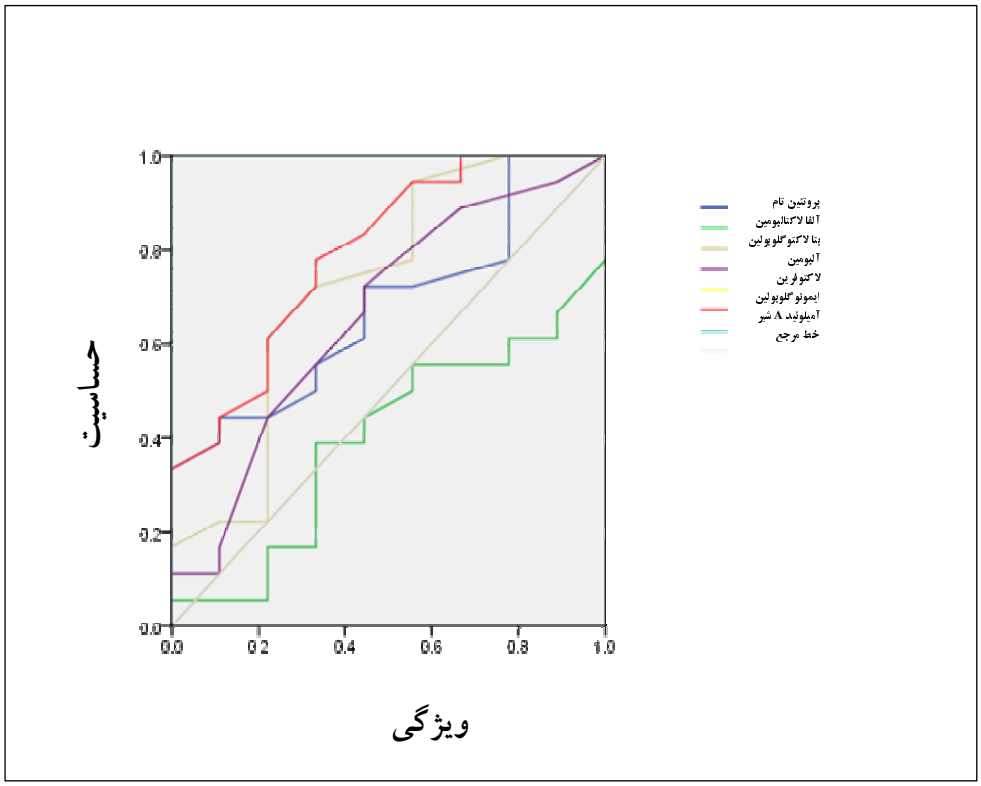


شکل ۱- نمای باندهای مشاهده شده در ژل پس از انجام الکتروفورز به روش SDS-PAGE در سرم شیر گاوهای سالم، بیمار و استاندارد مولکولی (Ladder)

نمونه‌های شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی: باندهای شماره ۱، ۲، ٤، ٦، ۷، ۸، ۹

نمونه شیر گاو سالم: باند ۳

باندهای شماره ۵ و ۱۰: استاندارد/ لدر



نمودار۱- منحنی راک آمیلوئید A شیر، پروتئین تام، آلبومین، آلفالاکتالبومین، بتالاکتوگلوبولین و ایمونوگلوبولین سرم شیر

بحث و نتیجه‌گیری

- شمارش سلول‌های سوماتیک

بر اساس توصیه فدراسیون بین‌المللی شیر، شمارش سلول‌های سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی بیان شده است، بنابراین در این مطالعه از نتایج حاصل از شمارش سلول‌های سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی استفاده شد. در مطالعه‌ای نشان داده شد که در شیر کارتیه‌های گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی تعداد سلول‌های سوماتیک افزایش می‌یابد که این یافته با نتایج تحقیق حاضر هماهنگی دارد (Hogarth, *et al.*, 2001).

در تحقیق دیگری بیان شد که اندازه‌گیری تعداد سلول‌های سوماتیک در شیر می‌تواند به طور رایج جهت تشخیص ورم پستان خفیف استفاده شود ولی در موارد شدید ورم پستان کارایی چندانی ندارد (Eckersall, *et al.*, 2001).

اگر چه سال‌های متمادی است که از شمارش سلول‌های سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی استفاده می‌شود اما باید توجه داشت که بر اساس مطالعات اخیر، تعداد سلول‌های سوماتیک همیشه با عفونت پستان همخوانی ندارد، به علاوه تعداد این سلول‌ها در شیر تحت تاثیر سایر عوامل نظیر تعداد دوره‌های شیرواری، مرحله شیرواری، میزان تولید شیر، استرس، فصل و نژاد گاو نیز قرار دارد (Schepers, *et al.*, 1997).

- اندازه گیری آمیلوئید A شیر

افزایش غلظت آمیلوئید A شیر در مبتلایان به ورم پستان تحت بالینی به دلیل ماهیت التهابی ورم پستان است که منجر به تولید سیتوکین های پیش التهابی نظیر

اینترلوکین‌های ۱ و ٦ و فاکتور نکروز بافتی آلفا (TNF-α) می‌شود. این سیتوکین‌ها موجب افزایش سنتز پروتئین‌های مثبت فاز حاد نظیرآمیلوئید A در کبد می‌شود لذا غلظت سرمی آنها افزایش یافته و به دلیل تخریب سد خونی- شیری، به داخل شیر نشت می‌کنند. به علاوه ثابت شده که آمیلوئید A سنتز داخل پستانی نیز دارد به طوری که این سنتز در پاسخ به التهاب بافت پستان به چندین برابر افزایش می‌یابد (McDonald, *et al*., 2001).

در مطالعه صورت گرفته توسط محققین عنوان شده است که آمیلوئید A ، سنتز داخل پستانی دارد و این سنتز در التهاب غده پستان افزایش می یابد بنابراین افزایش غلظت این پروتئین فاز حاد مثبت در شیر تنها بیانگر حضور یک روند التهابی در غده پستان است لذا از اندازه گیری آن در شیر می توان به عنوان یک شاخص تشخیصی زودهنگام در ورم پستان استفاده نمود (Eckersall, *et al.,* 2001).

همچنین در مطالعه دیگری نشان داده شد که غلظت آمیلوئید A شیر کارتیه های مبتلا به ورم پستان بالینی همزمان یا قبل از افزایش تعداد سلول های سوماتیک افزایش می‌یابد که این یافته با نتایج تحقیق حاضر مطابقت می‌کند (Hogarth, *et al.*, 2001).

در نتیجه می‌توان از اندازه‌گیری غلظت آمیلوئید A شیر به عنوان یکی از بهترین آزمایش ها در تشخیص زودهنگام ورم پستان تحت بالینی استفاده نمود زیرا در تشخیص این بیماری کاهش موارد مثبت کاذب اهمیت زیادی دارد تا از صرف هزینه اضافی و وارد کردن بی‌مورد آنتی بیوتیک به داخل شیر جلوگیری کرد.

- اندازه گیری ایمونوگلوبولین سرم شیر

بین میانگین غلظت ایمونوگلوبولین سرم شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اختلاف آماری به شدت معناداری وجود داشت ($p\leq$۰/۰۰۱) که این یافته با نتایج تحقیق سایر محققین همخوانی دارد به طوری که گزارش شده است که ورم پستان تحت بالینی موجب افزایش معنادار در غلظت ایمونوگلوبولین سرم شیر می‌شود. در این مطالعه، ایمونوگلوبولین‌های سرم شیر به روش الکتروفورز ژل پلی اکریلامید اندازه‌گیری شد (Ishikawa, *et al.*, 1982).

همچنین محققین دیگری متوجه شدند که در گاوهای مبتلا به ورم پستان کلی فرمی غلظت ایمونوگلوبولین سرم شیر در طی فاز حاد بیماری افزایش می‌یابد (Harmon, *et al.*, 1976).

می‌توان از اندازه گیری غلظت ایمونوگلوبولین سرم شیر نیز در تشخیص زودهنگام ورم پستان تحت بالینی استفاده نمود، حساسیت و ویژگی ایمونوگلوبولین برای تشخیص ورم پستان تحت بالینی ناشی از پاتوژن های مورد مطالعه در نقاط برش مختلف، متفاوت است و کلینیسین بسته به اینکه به دنبال آزمونی با حساسیت یا ویزگی بالاتر است، می‌تواند یکی از نقاط برش را انتخاب نماید(جدول ۲).

- اندازه گیری آلفالاکتالبومین سرم شیر

نکته قابل توجه آنکه تغییر غلظت آلفالاکتالبومین سرم شیر در ورم پستان، مقوله‌ای است که در تحقیقات مختلف نتایج ضد و نقیض به همراه داشته است به طوری که بعضی از محققین گزارش کرده اند که ورم پستان تحت بالینی موجب کاهش معنادار در غلظت آلفالاکتالبومین سرم شیر می شود که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد (Ishikawa, *et al*., 1982) و بعضی تاثیر ورم پستان بر پروتئین‌های شیر را با روش الکتروفورز ژل پلی اکریلامید مورد بررسی قرار داده و به این نتیجه رسیدند که تغییر معناداری در درصد آلفالاکتالبومین شیر رخ نمی‌دهد و بین غلظت

آلفالاکتالبومین سرم شیر در گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تفاوت معناداری وجود ندارد که این یافته با نتایج این مطالعه همخوانی دارد (Randolph, *et al.*, 1974).

این تنوع در تغییر غلظت آلفالاکتالبومین سرم شیر در مطالعات مختلف می‌تواند به دلیل تفاوت در روش‌های اندازه‌گیری آلفالاکتالبومین، شدت ورم پستان، نوع پاتوژن مسبب ورم پستان و پاسخ‌های بیولوژیک حیوان باشد.

اندازه گیری آلفالاکتالبومین سرم شیر آزمایش حساس و دقیقی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی نیست. به عبارت دیگر اندازه گیری آلفالاکتالبومین سرم شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی نه تنها هیچ مزیتی نسبت به شمارش سلول های سوماتیک شیر ندارد بلکه ارزش تشخیصی آن پایین تر نیز هست.

– اندازه گیری بتالاکتوگلوبولین سرم شیر

در مطالعه ای تاثیر ورم پستان بر پروتئین های شیر را با روش الکتروفورز ژل پلی اکریلامید مورد بررسی قرار داده و به این نتیجه رسیدند که بتالاکتوگلوبولین سرم شیر در ورم پستان کاهش می‌یابد (Randolph, *et al.*, 1974) همچنین محققین دیگری گزارش کردند که ورم‌پستان تحت بالینی موجب کاهش معنادار در غلظت بتالاکتوگلوبولین سرم شیر می‌شود. در این مطالعه، بتالاکتوگلوبولین سرم شیر به روش الکتروفورز ژل پلی اکریلامید اندازه‌گیری شد (Ishikawa, *et al.*, 1982)، که این یافته ها با نتایج مطالعه حاضر همخوانی ندارد.

گروهی از محققین با روش SDS-PAGE به بررسی تغییرات پروتئین های سرم شیر در ورم پستان تحت بالینی پرداخته و به این نتیجه رسیدند که بتالاکتوگلوبولین سرم شیر در طی این بیماری کاهش می‌یابد. این یافته با نتایج مطالعه حاضر همخوانی ندارد (Urech, *et al.*, 1999)

می توان نتیجه گرفت ارزش تشخیصی اندازه گیری بتالاکتوگلوبولین در تشخیص ورم پستان تحت بالینی پایین است و در نتیجه نمی توان از اندازه گیری آن در تشخیص زودهنگام ورم پستان تحت بالینی استفاده نمود.

– اندازه گیری آلبومین سرم شیر

در مطالعه ای گزارش شده است که ورم پستان تحت بالینی موجب افزایش معنادار در غلظت آلبومین سرم شیر می شود.در این مطالعه، آلبومین سرم شیر به روش الکتروفورز ژل پلی اکریلامید اندازه گیری شد و نیز گزارش شد که ورم پستان تحت بالینی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس موجب افزایش معناداری در غلظت آلبومین سرم شیر می شود که با نتایج این تحقیق همخوانی ندارد (Ishikawa, *et al.*, 1982).

عدم وجود اختلاف معنادار در میزان آلبومین بین گروه های مورد مطالعه در این تحقیق می تواند به دلیل تفاوت در روش اندازه گیری باشد. در مطالعات انجام شده، آلبومین به روش BCG اندازه گیری شده ولی در این مطالعه با محاسبه پروتئین تام و محاسبه سطح زیر منحنی الکتروفورز، میزان آلبومین تخمین زده شد.

– اندازه گیری پروتئین تام سرم شیر

در مطالعه‌ای گزارش کردند که ورم پستان تحت بالینی موجب افزایش معنادار در غلظت پروتئین تام سرم شیر می‌شود. در این مطالعه پروتئین تام سرم شیر به روش لوری اندازه‌گیری شد (Ishikawa, *et al.*, 1982) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد.

در حالیکه در مطالعات دیگری گزارش شده است

که هیچ گونه تفاوت معناداری در غلظت پروتئین تام سرم شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی وجود ندارد (Kitchen, *et al*., 1981; Munro, *et al*., 1984) که این یافته ها با مطالعه حاضر همخوانی ندارد. این عدم همخوانی می تواند به دلیل شدت واکنش التهابی القا شده در ورم پستان یا تفاوت در روش اندازه گیری پروتئین تام باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که SDS-PAGE می‌تواند به عنوان یک آزمون مناسب در تشخیص ورم پستان تحت بالینی کمک نماید.

منابع

- اطیابی، ن. (۱۳۸٤). کلینیکال پاتولوژی دامپزشکی روش های آزمایشگاهی، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ۲۹۷-۲۹۱.
- محمدصادق، م. (۱۳۸۸). ورم پستان در دام های شیری. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، صفحات: ۱۵۰-۱۷، ۲٤٥-۲۱۳.
- Bailey, T., (2007). Negative influence of subclinical mastitis.Virginia Cooperative Extension. Available at: http://www.ext.vt.edu/news/periodicals/dairy/1996-10/subclinmast.html. Accessed August 16.
- 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.
- Eckersall, P.D., Young, F.J., McComb, C., Hogarth, C., Safi, S., Weber, A., McDonald, T., Nolan, AM., Fitzpatrick, JL., (2001). Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. Veterinary Record; 148: 35–41.
- Harmon, R.J., Eberhart, R.J., Jasper, D.E., Langlois, B.E., Wlison, R.A., (1990). Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. Arlington VA.USA: National Mastitis Council Inc.
- Harmon, R.J., Schanbacher, F.L., Ferguson, L.C., Smith, K.L., (1976). Changes in lactoferrin, immunoglobulin G, bovine serum albumin and alphalactalbumin during acute experimental and natural coliform mastitis in cows. Infect Immun; 13: 533.
- Hogarth, C.J., (2001). Acute phase response in bovine mastitis. Second European Colloquiurn on acute phase protein. University of Bonn. Germany.
- Horadagoda, N.U., Knox, K.M., Gibbs, H.A., Reid, S.W.J., Horadagoda, A., Edwards, S.E.R., Eckersall, P.D., (1999). Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. Veterinary Record; 144(16): 437-441.
- Ishikawa, H., Shimizu, T., (1982). Protein composition of whey from subclinical mastitis and effect of treatment levamisole. Journal of Dairy Science; 65: 653-658.
- Kaneko, J., Harwey, J.W., Bruss, M.L., (2008). Clinical biochemistry of domestic animals. 6th Ed. University of California, Davis, America: 117-148.
- Kitchen, B., (1981). Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. Journal of airy Research; 48: 167-188.

- McDonald, T.L., Larson, M.A., Mack, D.R., Weber, A., (2001). Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A3 (M-SAA3) into colostrum. Veterinary Immunology and Immunopathology; 83(3-4):203-211.
- Munro, G.L., Grieve, P.L., Kitchen, B.J., (1984). Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. Aust J Dairy Technol; 39: 7-16
- Randolph, H.E., Erwin, R.E., Richter, R.L., (1974). Influence of mastitis on properties of milk: Distribution of milk proteins. Journal of Dairy Science; 57: 15-18.
- Schepers, A.J., Lam, T.J.G.M., Schukken, Y.H., Wilmink, J.B.M., Hanekamp, W.J.A., (1997). Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. Journal of Dairy Science; 80: 1833.
- Shamay, A., Homans, R., Fuerman, Y., (2005). Expression of albumin in non-hepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland. Journal of Dairy Science; 88: 569-576.
- Urech, E., Puhan, Z., Schallibaum, M., (1999). Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. Journal of Dairy Science; 82: 2402-2411.