بسم الله الرحمن الرحيم

بررسی مقایسه ای نشانگرهای التهابی در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی ناشی از عفونت E.coli و استافیلوکوکوس

استاد راهنما:

دکتر قاسمیان

استاد مشاور:

دکتر پیغمبر زاده

دانشجو:

مهراد بیرگانی

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. میزان بروز سالانه ورم پستان ۳۷٪ گزارش شده است.

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 (S. aureus) و Escherichia coli (E.coli) به طور جهانی به عنوان علل اولیه ورم پستان گاوی شناخته شد.

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.

بیان مسئله

برای شناسایی موثر علائم اولیه عفونت های 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 (SAA)، IL-6و IL-8در سرم در طول دوره های ورم پستان بالینی و تحت بالینی ارزش قابل توجهی دارد. این بیومارکرها به عنوان سیگنال های مهم التهاب و پاسخ ایمنی عمل می کنند.
تغییرات در سطوح آنها می تواند بینش های مهمی را در مورد شروع و توسعه ورم پستان ارائه دهد. در این مطالعه، ما مارکرهای 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، IL-6 و IL-8 در سرم در طی موارد ورم پستان بالینی و تحت بالینی در گاوهای آلوده به عفونت های E.coliو Staphylococcus افزایش می یابد.

ضرورت و اهمیت تحقیق

این مطالعه به منظور بررسی نقش تشخیصی نشانگرهای التهابی در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و بالینی انجام می شود. بررسی میزان فعالیت سیتوکین های التهابی در بیماری تورم پستان، به علت‌های مختلف جنبه عملی پیدا نکرده، که از آن جمله می‌توان در دسترس نبودن کیت‌های آزمایشگاهی برای دامپزشکان، گرانی مواد مصرفی و طولانی بودن زمان انجام آزمایش را نام برد.

در این تحقیق نمونه‌های شیر در گاوهای سالم و مبتلا به تورم پستان تحت بالینی از لحاظ میزان SCCبررسی و مقایسه می‌گردد. این مطالعه با هدف بررسی ارزش تشخیصی سرم آمیلوئید(SAA) A، IL-6 و IL-8 سرم در تشخیص زودرس ورم پستان تحت بالینی در گاوهای آلوده به اشریشیا کلی (E.coli) و عفونت های استافیلوکوکوس انجام می شود.

مواد و وسایل مورد نیاز

- ✓لوله آزمایش،
- ✓لوله فالکون،
- ✓پنبه،
- ✓الکل اتانول ۷۰٪ ،
- ✓میکروتیوب،
- ✓سر سمپلر،
- ✓دستگاه اسپکتروفتومتر،
- ✓دستگاه شمارشگر سلول های سوماتیک،
- ✓سانتریفیوژ یخچال دار،
- ✓جا لوله ای،
- ✓کیت اندازه گیری اینترلوکین ۸ ،
- ✓کیت اندازه گیری اینترلوکین ٦
- ✓سانتریفیوژ.

نحوه انتخاب حیوانات و روش تهیه نمونه ها

نمونه ها از یک کارخانه تولید دام در مزرعه صنعتی واقع در شهرستان اصفهان جمع آوری می شود. 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 هستند و بیش از سه سال سن دارند و حداقل سه ماه از شروع شیردهی گذشته است. گاوهای مبتلا به ورم پستان که حداقل ۲ ماه قبل آنتی بیوتیک های سیستمیک یا داخل پستانی دریافت کرده بودند از مطالعه حذف می شوند. مزرعه از استراتژی‌های مدیریتی پیشرفته استفاده می‌کند و پروتکل‌های بهداشتی دقیق را رعایت می‌کند و منحصراً از ماشین‌های شیردوشی خودکار استفاده می‌کند. به طور کلی ۷۹ راس گاو هلشتاین از مزارع صنعتی اصفهان به طور تصادفی انتخاب و در پژوهش حاضر وارد می شوند. اطلاعات با استفاده از فرم های پرسشنامه طراحی شده ویژه جمع آوری می شود. نتایج اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی نیز در بخش‌های مربوطه این فرم‌های پرسشنامه ثبت می شود.

هفتاد و نه گاو شیری به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول که به گروه شاهد معروف بودند شامل ۳۰ راس گاو است که کاملاً سالم هستند و علائم عمومی بیماری از جمله تب، پرخونی یا کم خونی غشاهای مخاطی و افسردگی را ندارند. پستان این گاوها نیز سالم می باشد و هیچ نشانه ای از درد، تورم، آبسه، گرمی و قرمزی در آنها دیده نمی شود. علاوه بر این، تست ورم پستان کالیفرنیایی CMTاز نمونه‌های شیر هر چهار کارتیه گاوهای گروه کنترل منفی می باشد. 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 CMTمثبت بودند اما علائم بالینی نشان ندادند، به نظر می‌رسید که از ورم پستان تحت بالینی رنج می‌بردند.

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 CMTگاوهای این گروه مثبت بود.

نمونه خون از هر گاو در شرایط استریل گرفته می شود. تمامی نمونه ها با مشخصات مربوطه برچسب گذاری شده و به سرعت به آزمایشگاه سد آرین اصفهان جهت انجام آزمایشات مربوطه منتقل می شوند.

جامعه آماری، روش نمونه‌گیری و حجم نمونه

این مطالعه تحلیلی مقطعی در سال ۱۴۰۲-۱۴۰۳ به منظور بررسی نشانگرهای التهابی در گاوهای شیری مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی در شهر اصفهان انجام می شود

روش محاسبه حجم نمونه

در این تحقیق برای محاسبه حجم نمونه از فرمول کوکران Bاستفاده شده است. با در نظر گرفتن سطح خطای ۵ درصد و با در نظر گرفتن مقدار z 1.96و مقدار Z2 3.8416، حجم نمونه ۷۹ گاو تعیین شد. محاسبه به شرح زیر است:

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

همچنین جهت تعیین نقطه برش ظرفیت سیتوکین های پیش التهابی و سلولهای سوماتیک در شیر از منحنی ROCاستفاده شد. این آنالیزها در بسته نرم افزاری SPSS جهت بررسی داده ها موجود می باشد.

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 می شود

جمع آوری نمونه شیر

برای جمع آوری نمونه های شیر در زمان شیردوشی از گاوداری ها بازدید شد. نمونه ها قبل از شیردوشی در سالن شیردوشی جمع آوری شد. قبل از فرآیند نمونه‌برداری، پستان‌های گاو دقیقاً با استفاده از الکل استریل و سپس خشک می شدند. تمام نمونه ها در ویال هایی که کاملاً استریل شده بودند جمع آوری می شدند. پس از ضدعفونی کردن سرپستانک ها، چند قطره اولیه دور انداخته می شد. سپس ۱۰ میلی لیتر شیر از هر کارتیه در لوله های استریل جمع آوری می شد. سپس این نمونه ها با اطمینان از حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه اصفهان ارسال می شد. یک نمونه خون با داروی ضد انعقاد برای شمارش کامل خون جمع آوری می شد. نمونه خون در یک لوله هپارینیزه شده جمع آوری می شد که به سرعت در ۱۵۰۰ × گرم به مدت ۵ دقیقه برای جداسازی پلاسمای خون سانتریفیوژ می شود. سپس پلاسما برای اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی خون به آزمایشگاه پاتولوژی بالینی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه ارسال می شود.

تایید مولکولی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس E. coli وguberis

استخراج DNA:

از روش جوش برای استخراج DNAاز تمام ایزوله‌های احتمالی ۱۵ استفاده می شود. چند گروه از جدایه‌های مشکوک استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اوبریس و اشریشیاکلی با ۲۰۰ میکرو لیتر آب دیونیزه مخلوط می شوند به دنبال آن یک سانتریفیوژ ۱۰ دقیقه ای انجام می شود. مواد رویی به عنوان نمونه DNAدر دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری می شوند.

PCR

تمام جدایه هایی که به صورت بیوشیمیایی تایپ شده بودند و مشکوک به استافیلوکوک بودند با تقویت ژن nucخاص گونه تایید می شوند. این کار با استفاده از پرایمرهای nuc-Fو nuc-Rاز طریق روش تقویت PCRانجام می شود. یک مخلوط واکنش PCR 25میکرولیتری ایجاد شد که شامل ۵ میکرولیتر الگوی DNA، 12.5 میکرولیتر از مخلوط اصلی ۲X PCR، 6.5میکرولیتر آب بدون نوکلئاز دیونیزه و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر بود. شرایط PCRدر پنج مرحله انجام می شود که با دناتوراسیون اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه شروع می شود و در مرحله نهایی گسترش در دمای ٦٨ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه به اوج خود رسید. این سری از واکنش ها با استفاده از یک سیکلر حرارتی ۹٦ چاه کاربردی، ۲۷۲۰ انجام می شود.

تمام ایزوله‌های E. coli که از نظر بیوشیمیایی شناسایی شدند، برای کدگذاری ژن ۱۶ S-rRNA پرایمر اختصاصی جنس (۱۶ S-rRNA-F-GCGGACGGGTGAGTAATGT و ۱۶ S-rRNA-R-TCATGCCTCTACAG) تحت تکثیر PCR قرار گرفتند. واکنش در حجم کل ۲۵ میکرولیتر تنظیم می شود که شامل ۵ میکرولیتر الگوی DNA، 12.5 میکرولیتر از مخلوط اصلی ۲X PCR، 6.5 میکرولیتر آب بدون نوکلئاز دیونیزه و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر بود. فرآیند تقویت PCR با مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه آغاز شد و با فاز اکستنشن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه به پایان می رسد. محصولات PCR برای سه ایزوله به نام‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اوبریس و اشریشیا کولی بر روی ژل آگارز ۱٪ با استفاده از یک transilluminator UV و یک سیستم مستندسازی ژل مشاهده می شوند.

آنالیز آماری

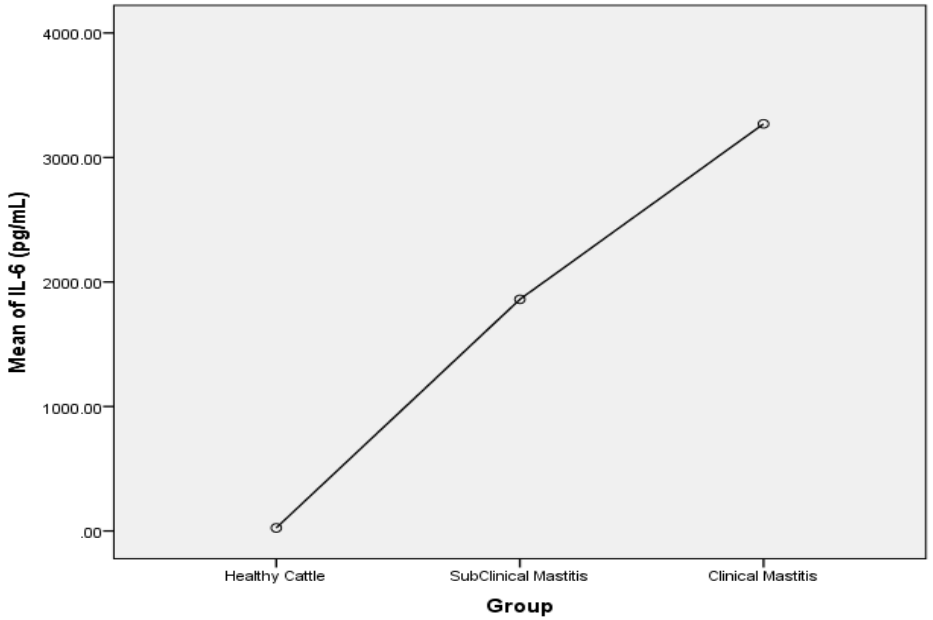
تجزیه و تحلیل داده ها با نرم افزار SPSSانجام شد. شاخص‌های مرکزی و پراکندگی برای توصیف نتایج مورد استفاده قرار گرفتند. برای مقایسه داده های کیفی از آزمون کای اسکوئر استفاده شد، در حالی که آزمون تی مقایسه داده های کمی قبل و بعد را تسهیل می کند. مقایسه‌های گروهی از طریق ANOVAانجام شد و آزمایش‌هایی مانند سطح زیر منحنی ROCمعیارهایی از حساسیت و ویژگی را ارائه می کنند . ارزش تشخیصی نشانگرهای التهابی با محاسبه مناطق زیر منحنی AUCs منحنی‌های ROCتعیین شد. سطح معنی داری $p< ۰.۰۵$ در نظر گرفته شد.

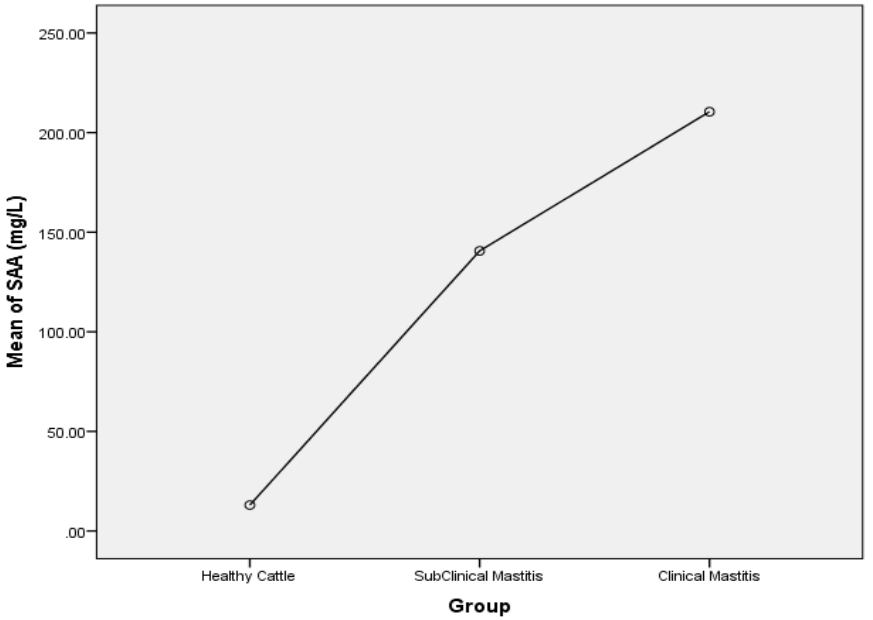
توصیف و تحلیل آماری یافته ها

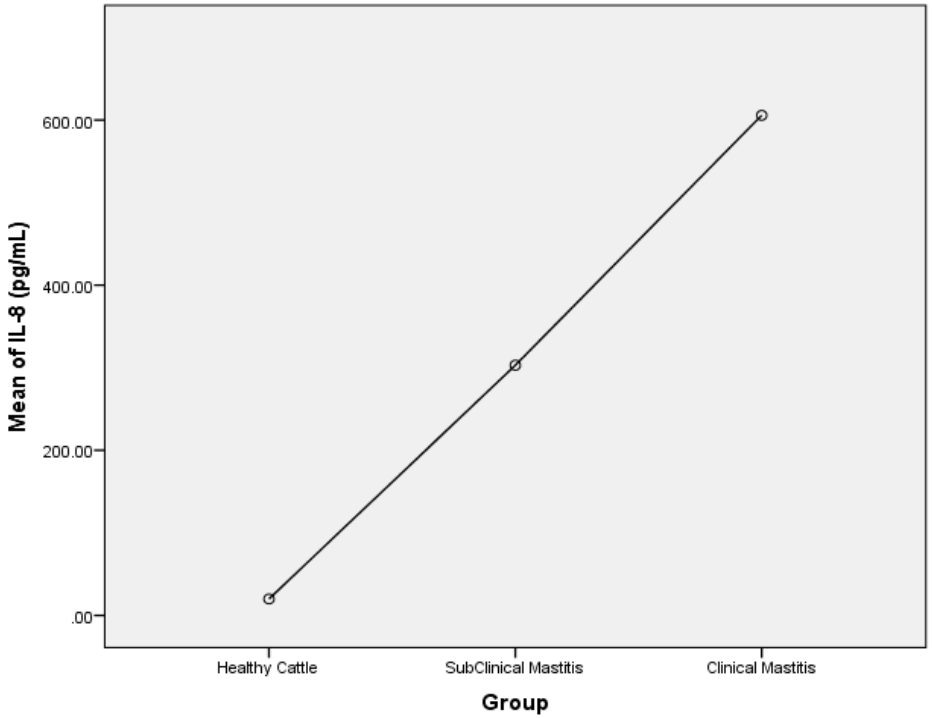
به طور کلی CMTدر ۳۸٪ (۳۰ مورد) منفی و در ۶۲٪ (۴۹ مورد) از گاوها مثبت بود. در بین بیماران با آزمایش کشت مثبت (۵۷٪ : ۴۵ مورد)، ۱۹٪ (۱۵ مورد) دارای E. coli، 22.8% (۱۸مورد) دارای S. uberisو ۱۵.۲٪ (۱۲ مورد) آلوده بودند. با S. aureusدر اکثریت قابل توجهی از نمونه های شیر ماستیت، به ویژه در ۹۲ درصد (۴۹/۴۵) آنها، عوامل باکتریایی شناسایی شد. SCC، SAA، IL-6و IL-8در گاوهایی که در CMTمنفی یا مثبت بودند، مقایسه می شوند (جدول ۱). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، تفاوت معنی‌داری از نظر SCC، SAA، IL-6و IL-8بین گاوهایی که در CMTمنفی و مثبت بودند، وجود داشت (P<۰.۰۰۵)

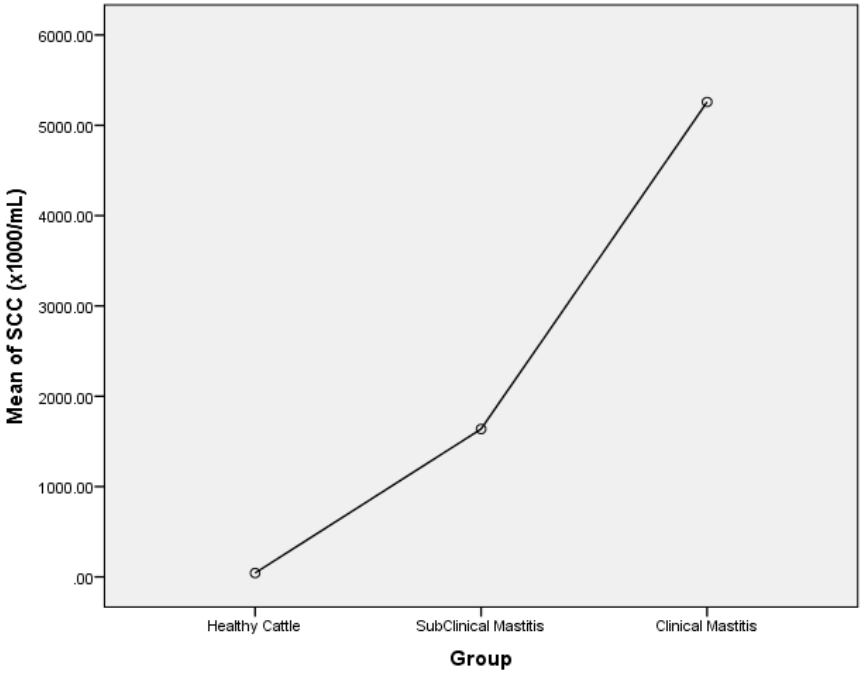
جدول ۱. مقایسه گاوهای دارای نتایج تست ورم پستان کالیفرنیا مثبت و منفی از نظر تعداد سلول های سوماتیک، آمیلوئید Aسرم، اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۸

متغیرها	CMT	Mean	SD	t-test	P-value
سلول های سوماتیک (x1000/mL)	منفی	42.79	18.164	-7.244	<0.005
	مثبت	3041.57	2261.63		
اینترلوکین-٦ (pg/mL)	منفی	24.67	10.49	-5.411	<0.005
	مثبت	2407.33	2405.93		
اینترلوکین-٨ (pg/mL)	منفی	19.95	8.37	-10.211	<0.005
	مثبت	420.408	214.15		
آمیلوئید A سرم (mg/L)	منفی	12.98	5.73	-14.112	<0.005
	مثبت	167.706	59.73		


4000.00
3000.00
2000.00
1000.00
.00
Mean of IL-6 (pg/mL)
Healthy Cattle
SubClinical Mastitis
Clinical Mastitis
Group


250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
.00
Mean of SAA (mg/L)
Healthy Cattle
SubClinical Mastitis
Clinical Mastitis
Group


600.00
400.00
200.00
.00
Mean of IL-8 (pg/mL)
Healthy Cattle
SubClinical Mastitis
Clinical Mastitis
Group


6000.00
5000.00
4000.00
3000.00
2000.00
1000.00
.00
Mean of SCC (x1000/mL)
Healthy Cattle
SubClinical Mastitis
Clinical Mastitis
Group

مقایسه میانگین سطوح SCC، SAA، IL-6و IL-8در سه گروه: کنترل سالم، ورم پستان تحت بالینی و ورم پستان بالینی نشان داده شده است (جدول ۲). نتایج نشان دهنده تفاوت معنی داری از نظر SCC، SAA، IL-6و IL-8در بین سه گروه بود (P<.۰.۰۰۵)

جدول ۲. مقایسه مقادیر میانگین تعداد سلول های سوماتیک، آمیلوئید Aسرم، اینترلوکین–۶ و اینترلوکین–۸ در سه گروه

متغیرها	گروه ها	Mean	SD	95% Confidence Interval for Mean		F*	P-value
				حد پایینی	حد بالایی		
سلول های سوماتیک (x1000/mL)	گاوهای سالم	42.79	18.16	36.008	49.57	130.69	<0.005
	ورم پستان تحت بالینی	1637.48	1158.69	1204.82	2070.14		
	ورم پستان بالینی	5258.56	1732.94	4423.308	6093.81		
آمیلوئید A سرم (mg/L)	گاوهای سالم	12.98	5.736	10.84	15.13	19.204	<0.005
	ورم پستان تحت بالینی	140.62	41.11	125.26	155.97		
	ورم پستان بالینی	210.4	60.31	181.39	239.54		
اینترلوکین-٦ (pg/mL)	گاوهای سالم	24.67	10.49	20.75	28.59	135.25	<0.005
	ورم پستان تحت بالینی	1860.87	2554.30	907.08	2814.67		
	ورم پستان بالینی	3270.14	1908.11	2350.46	4189.82		
اینترلوکین-٨ (pg/mL)	گاوهای سالم	19.95	8.37	16.82	23.08	165.27	<0.005
	ورم پستان تحت بالینی	303.04	98.209	266.3	339.71		
	ورم پستان بالینی	605.72	218.07	500.61	710.83		

* One-way ANOVA

جدول ۳. مقایسه زوجی گروه ها از نظر تعداد سلول های سوماتیک، آمیلوئید Aسرم، اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۸

متغیرهای وابسته	گروه ها		Mean Difference	Std. Error	P-value	فاصله اطمینان برای 95% میانگین
سلول های سوماتیک (x1000/mL)	گاوهای سالم	ورم پستان تحت بالینی	-1594.69	285.62	<0.005	-2277.46
		ورم پستان بالینی	-5215.77	324.33	<0.005	-5991.09
	ورم پستان تحت بالینی	ورم پستان بالینی	-3621.08	324.33	<0.005	-4396.39
اینترلوکین-٦ (pg/mL)	گاوهای سالم	ورم پستان تحت بالینی	-1836.208	472.71	0.001	-2966.23
		ورم پستان بالینی	-3245.47	536.79	<0.005	-4528.67
	ورم پستان تحت بالینی	ورم پستان بالینی	-1409.26	536.79	0.02	-2692.46
اینترلوکین-۸(pg/mL)	گاوهای سالم	ورم پستان تحت بالینی	-283.08	31.59	<0.005	-358.607
		ورم پستان بالینی	-585.76	35.87	<0.005	-671.52
	ورم پستان تحت بالینی	ورم پستان بالینی	-302.68	35.87	<0.005	-388.43
آمیلوئید A سرم(mg/L)	گاوهای سالم	ورم پستان تحت بالینی	-127.63	10.06	<0.005	-151.68
		ورم پستان بالینی	-197.48	11.42	<0.005	-224.8
	ورم پستان تحت بالینی	ورم پستان بالینی	-69.85	11.42	<0.005	-97.16

جدول ۴. مقایسه میانگین مقادیر تعداد سلول های سوماتیک، آمیلوئید Aسرم، اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۸ در گاوهای آلوده به انواع مختلف باکتری

متغیرها	گروه ها	Mean	SD	95%فاصله اطمینان برای میانگین		F	P-value
				حد پایینی	حد بالایی		
سلول های سوماتیک (x1000/mL)	منفی	67.303	60.83	47.01	87.58	70.95	<0.005
	E. coli	2508.68	1534.66	1658.82	3358.55		
	S. uberis	2987.86	1535.21	2169.80	3805.92		
	S.aureus	5672.22	1977.62	4343.64	7000.81		
آمیلوئید A سرم (mg/L)	Negative	25.309	29.92	15.33	35.28	55.16	<0.005
	E. coli	162.37	45.045	137.42	187.31		
	S. uberis	163.59	14.22	156.01	171.17		
	S.aureus	237.97	46.26	206.88	269.05		
اینترلوکین-۶(pg/mL)	منفی	99.42	254.19	14.67	184.17	124.28	<0.005
	E. coli	1633.32	1088.61	1030.47	2236.18		
	S. uberis	1769.86	443.61	1533.47	2006.24		
	S.aureus	5654.81	3126.01	3554.72	7754.904		
اینترلوکین-۸(pg/mL)	منفی	49.52	64.06	28.16	70.88	156.47	<0.005
	E. coli	325.72	69.63	287.16	364.28		
	S. uberis	417.001	126.35	349.67	484.33		
	S.aureus	709.84	203.37	573.21	846.47		

مقایسه دوتایی گاوهای آلوده به انواع مختلف باکتری از نظر SCC، SAA، IL-6و IL-8تفاوت معنی داری را در سطوح SCC، SAA، IL-6و IL-8بین گاوهایی با آزمایش کشت منفی نشان می دهد. افراد مبتلا به E. coli، S. aureusو S. uberis (P<0.005). علاوه بر این، گاوهای آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس تفاوت معنی داری در سطوح SCC، SAA، IL-6و IL-8در مقایسه با گاوهای آلوده به E. coliو S. uberisنشان دادند (.(P<0.005با این حال، تفاوت معنی داری بین E. coliو S. uberisاز نظر SCC (P=0.68)، SAA (P<0.99)، IL-6 (P=0.99)و IL-8 (P=0.09)مشاهده نشد. (جدول ۵)

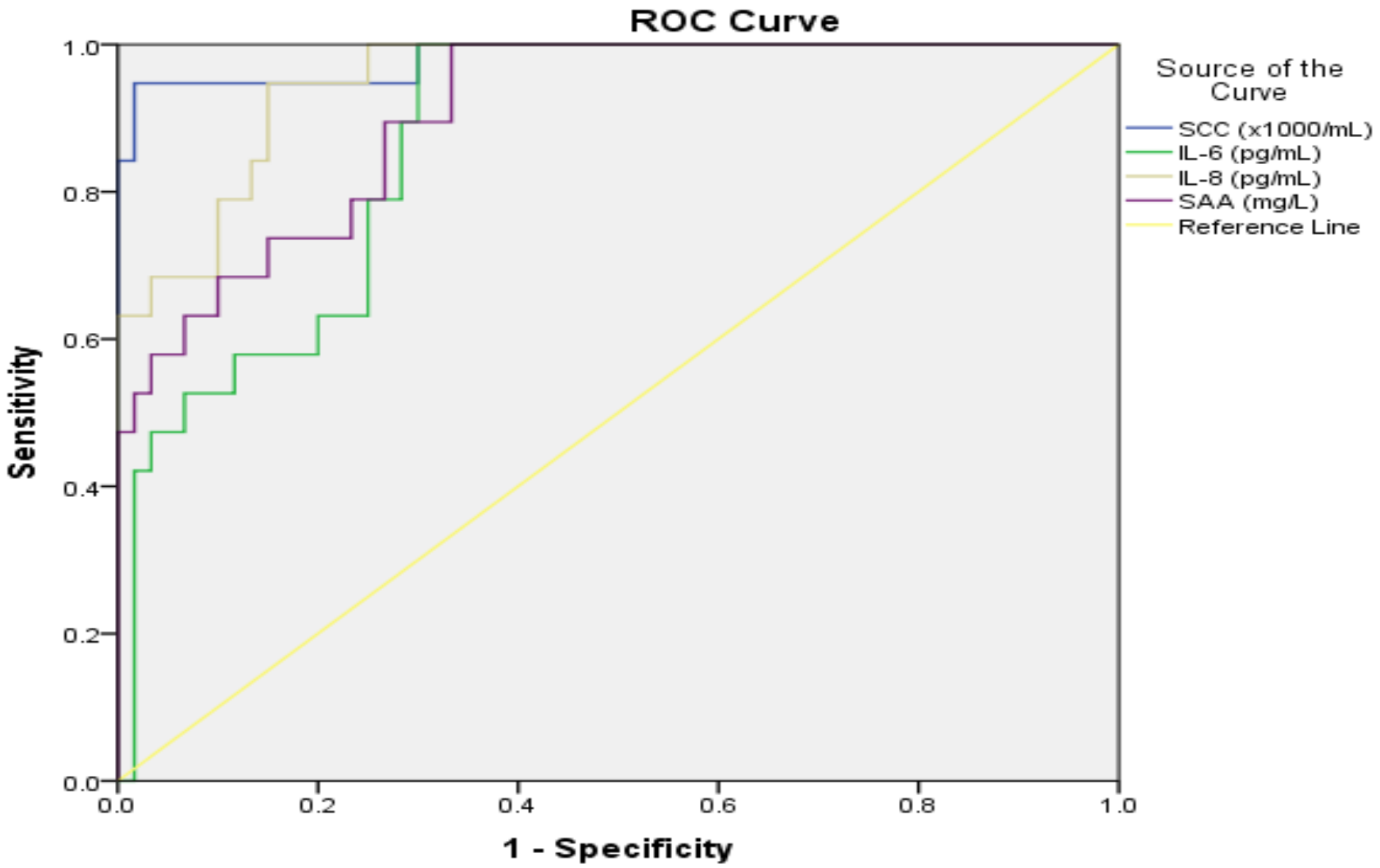
جدول ۵. مقایسه دوتایی گاوهای آلوده به انواع مختلف باکتری از نظر تعداد سلولهای سوماتیک ، آمیلوئید Aسرم، اینترلوکین–۶ و اینترلوکین–۸

متغیرهای وابسته	(I)کشت	(J)کشت	اختلاف میانگین (I-J)	SE	P-value	95%سطح اطمینان	
						حد پایینی	حد بالایی
سلول های سوماتیک (x1000/mL)	منفی	E. coli	-2441.38	366.57	<0.005	-3404.6	-1478.16
		S. uberis	-2920.56	358.33	<0.005	-3862.11	-1979.006
		S.aureus	-5604.92	411.27	<0.005	-6685.59	-4524.25
	E.coli	S. uberis	-479.17	430.41	0.68	-1610.12	651.77
		S.aureus	-3163.53	475.39	<0.005	-4412.68	-1914.39
	S.uberis	S.aureus	-2684.36	469.07	<0.005	-3916.88	-1451.83
اینترلوکین-6 (pg/mL)	منفی	E.coli	-1533.9	386.51	0.001	-2549.51	-518.29
		S. uberis	-1670.44	377.82	<0.005	-2663.21	-677.67
		S.aureus	-5555.39	433.64	<0.005	-6694.84	-4415.94
	E.coli	S.uberis	-136.53	453.82	0.99	-1329.0	1055.93
		S.aureus	-4021.48	501.25	<0.005	-5338.57	-2704.39
	S. uberis	S.aureus	-3884.95	494.58	<0.005	-5184.51	-2585.39
اینترلوکین-8(pg/mL)	منفی	E. coli	-276.202	32.94	<0.005	-362.761	-189.64
		S.uberis	-367.47	32.201	<0.005	-452.08	-282.86
		S.aureus	-660.32	36.95	<0.005	-757.43	-563.207
	E.coli	S. uberis	-91.27	38.67	0.09	-192.907	10.35
		S.aureus	-384.119	42.72	<0.005	-496.37	-271.86
	S.uberis	S.aureus	-292.84	42.15	<0.005	-403.605	-182.08
آمیلوئید A سرم(mg/L)	منفی	E. coli	-137.06	10.309	<0.005	-164.15	-109.97
		S. uberis	-138.28	10.07	<0.005	-164.77	-111.808
		S.aureus	-212.66	11.56	<0.005	-243.05	-182.26
	E. coli	S. uberis	-1.22	12.105	>0.99	-33.03	30.57
		S.aureus	-75.6	13.37	<0.005	-110.73	-40.46
	S.uberis	S.aureus	-74.37	13.19	<0.005	-109.03	-39.707

جدول ۶. همبستگی پیرسون بین متغیرهای وابسته

		سلول های سوماتیک (x1000/mL)	اینترلوکین-۶ (pg/mL)	اینترلوکین-۸ (pg/mL)	آمیلوئید Aسرم (mg/L)
سلول های سوماتیک (x1000/mL)	همبستگی پیرسون	1	.709**	.941**	.846**
	معنی داری		۰۰۰/۰	۰۰۰/۰	۰۰۰/۰
	کل	۷۹	۷۹	۷۹	۷۹
اینترلوکین-۶ (pg/mL)	همبستگی پیرسون	.709**	1	.734**	.691**
	معنی داری	۰۰۰/۰		۰۰۰/۰	۰۰۰/۰
	کل	۷۹	۷۹	۷۹	79
اینترلوکین-۸(pg/mL)	همبستگی پیرسون	.941**	.734**	1	.914**
	معنی داری	۰۰۰/۰	۰۰۰/۰		۰۰۰/۰
	کل	۷۹	۷۹	۷۹	۷۹
آمیلوئید Aسرم(mg/L)	همبستگی پیرسون	.846**	.691**	.914**	1
	معنی داری	۰۰۰/۰	۰۰۰/۰	۰۰۰/۰	
	کل	۷۹	۷۹	۷۹	۷۹

شکل ۱. حساسیت و ویژگی SCC، SAA، IL-6و IL-8در تشخیص ورم پستان در گاو



بحث و نتیجه‌گیری

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 IL6 و IL8 همراه با مقادیر SSA به طور معنی داری با ورم پستان تحت بالینی ناشی از E.coli و Staphylococcus مرتبط بود. ویژگی و حساسیت IL6، IL8 و SSA برای تشخیص ورم پستان ناشی از E.coli و استافیلوکوک بالا بود.

ورم پستان یک بیماری چندوجهی با علل مختلف از جمله باکتری های مسری، عوامل محیطی و موجودات فرصت طلب است. در مطالعه حاضر، عوامل باکتریایی در نسبت قابل توجهی، ۹۲ درصد از کل نمونه های شیر ورم پستان شناسایی شد. در مطالعه دیگری که توسط سادات و همکارانش انجام شد، این میزان ۷۳.۷۵ درصد برآورد شد. این مشاهدات با مطالعات قبلی که ورم پستان باکتریایی را به عنوان شایع ترین علت ورم پستان مشخص کرده بودند مطابقت دارد.

در مطالعه حاضر، شیوع کمی کمتر (حدود ۳۳.۳٪) از موارد ورم پستان بالینی در مواردی که E. coliپاتوژن بود، مشاهده شد، در حالی که استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوک اوبریس مسئول ورم پستان بالینی و تحت بالینی در ۶۶.۷٪ موارد بودند. این مشابه یک مطالعه قبلی است که شیوع کمی کمتر (حدود ۳۱٪) از موارد ورم پستان بالینی را گزارش کرده بود که E. coliپاتوژن بود. با این حال، در مطالعه سادات و همکاران، استافیلوکوکوس اورئوس در ۷۶ درصد موارد تحت بالینی جدا شد که با سایر مطالعات انجام شده در مصر مطابقت دارد. 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.

یافته های این مطالعه ویژگی و حساسیت بالایی را برای IL6، IL8و SSAدر تشخیص ورم پستان ناشی از E.coliو استافیلوکوک نشان داد. به همین ترتیب، تحقیقات سادات و همکاران دریافتند که گاوهایی که از بیماری رنج می‌برند، سطوح آمیلوئید Aرا در حیوانات ورم پستان تحت بالینی و بالینی در مقایسه با همتایان سالم خود به طور قابل‌توجهی افزایش دادند.

مطالعات مختلف تایید کرده اند که غلظت آمیلوئید Aدر شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان در مقایسه با گاوهای سالم بیشتر است. در این زمینه، مطالعه بوچنیارز و همکاران. دریافتند که مقدار آمیلوئید Aدر شیر گاوهایی که مشکلات سلامتی دارند در مقایسه با گاوهای بدون بیماری به طور قابل توجهی بالاتر است. اما تفاوتی در سطح آمیلوئید Aدر سرم بین آنها مشاهده نشد .

نتایج این مطالعه سطوح بالای IL-6و IL-8را در گاوهای مبتلا به ورم پستان و ورم پستان تحت بالینی در مقایسه با افراد سالم نشان داد. این یافته ها با سایر شواهد موجود در ادبیات همسو هستند به همین ترتیب، تحقیقات سادات و همکاران. سطوح بالاتری از TNF-α، IL-1βو IL-6را در گاوهای مبتلا به ورم پستان و ورم پستان تحت بالینی در مقایسه با گاوهای بدون بیماری نشان داد. یک مطالعه نشان داد که در روز اول بیماری، میانگین غلظت IL-6در نمونه های شیر ۲۵ برابر و در نمونه های سرم گاوهایی که از ورم پستان حاد رنج می برند، ۵ برابر بیشتر از گاوهای سالم بود . سایر یافته ها وجود سطوح بالای IL-6را در مرحله اولیه عفونت تایید کرده اند. این با یافته های قبلی که سایتوکین های پیش التهابی نقش مهمی در مبارزه با عفونت اولیه ایفا می کنند، مطابقت دارد. سطوح بالا TNF-αو IL-1βمشاهده شده در ورم پستان تحت بالینی نشان می دهد که این عوامل ممکن است در مراحل اولیه توسعه ورم پستان نقش داشته باشند. به نظر می رسد این افزایش در غلظت های پیش التهابی با شروع علائم بیماری همزمان است.

تحقیقات انجام شده توسط سافاک و تیمش (۲۰۲۲) نشان داد که سطح TNF-αو اینترفرون گاما به طور قابل توجهی در گروه مرتبط با E. coliافزایش یافته است. به طور مشابه، مطالعه ای توسط Yunheaو همکاران. مشاهده کردند که سطح بیان TNF، IL-6و IL-8در سلول های اپیتلیال پستان گاو در مواجهه با E.coliغیرفعال شده با گرما در مقایسه با زمانی که این سلول ها در معرض استافیلوکوکوس اورئوس غیرفعال شده با گرما قرار گرفتند به طور قابل توجهی بالاتر و سریعتر افزایش یافت.

Karthikeyanو همکاران، نشان دادند که سطح بیان TLR-2و IL-8در سلول های سوماتیک شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در مقایسه با گاوهای سالم به طور قابل توجهی افزایش یافته است. هنگامی که گیرنده IL-8با لیگاند خود متصل می شود، یک مسیر سیگنال دهی درون سلولی را راه اندازی می کند. این فعال سازی به نوتروفیل ها اجازه می دهد تا فعالیت، بقا و مهاجرت طولانی مدت را حفظ کنند. افزایش بیان گیرنده IL-8در سلول های سوماتیک شیر در مواردی که به طور تجربی با استافیلوکوک کروموژنز آلوده شده بودند مشاهده شد.

مطالعه توسط Karthikeyanافزایش قابل توجهی در بیان گیرنده IL-8در سلول های سوماتیک شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با تغییرات تا ۱۲.۹٤ برابر در مقایسه با گاوهای سالم مشاهده کرد.

سیتوکین های آزاد شده توسط سلول های ایمنی پس از عفونت می تواند منجر به افزایش بیان گیرنده IL-8شود. این نقش مهمی در هدایت نوتروفیل ها به محل التهاب ایفا می کند و در نتیجه تعداد سلول های سوماتیک در طی ورم پستان تحت بالینی افزایش می یابد. علاوه بر این، گیرنده IL-8با بقا و مهاجرت سلول های اپیتلیال آلوئولی مرتبط است، که نشان دهنده نقش مفیدی برای بیان IL-8 Rدر طول ورم پستان تحت بالینی است.

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. چنین عفونت باکتریایی می تواند سیستم ایمنی را تضعیف کند، به مهاجمان ثانویه اجازه ورود می دهد، یا مصرف غذای گاو را کاهش می دهد، که منجر به علائم کمبود 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

مطالعه حاضر نشان می دهد که ورم پستان در گاوهای شیری با افزایش سیتوکین های التهابی مانند آمیلوئید A، IL-6و IL-8همراه است. این مطالعه نشان می دهد که تغییرات در این نشانگرهای زیستی می تواند برای تشخیص بیماری مورد استفاده قرار گیرد. 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.

پیشنهادهای برخاسته از پژوهش

نتایج حاصل از این تحقیق، استفاده از بررسی میزان فعالیت سیتوکین های التهابی در خون را به عنوان شاخص زود هنگام هشدار دهنده در تشخیص ورم پستان تحت بالینی که خسارات زیادی به صنعت پرورش گاو شیری وارد می نماید، پیشنهاد می کند. همچنین پیشنهاد می شود که جهت تقویت سیستم انتی اکسیدانی در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی به عنوان جایگزین از ویتامین E، ویتامین C، سلنیوم، مس، روی و یا گیاهان دارویی حاوی آنتی اکسیدان قوی استفاده گردد.

پیشنهادات برای مطالعات آینده

- سنجش شاخص استرس اکسیداتیو (مالون دی آلدئید) و ظرفیت کل آنتی اکسیدانی در خون و شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان و بیماریهای پیرامون زایمان.
- سنجش سایر سیتوکین های التهابی در خون علاوه بر شیر در گاوهای مبتلا به ورم پستان و بیماریهای پیرامون زایمان.
- اندازه گیری و بررسی تأثیر ویتامین E در کنار سلنیوم بر روی ورم پستان و کیفیت شیر.
- با توجه به گسترش گونه های باکتریایی، بررسی جامع و یا سالانه در خصوص باکتریهای عامل تورم پستان ضروری به نظر می رسد.
- بررسی رابطه میان عامل ایجاد کننده ورم پستان و تغییر در آنزیم های آنتی اکسیدان و عناصر کمیاب و سایر پارامترها
- بررسی رابطه میان عامل ایجاد کننده ورم پستان و تغییر در میزان مالون دی آلدئید و ظرفیت کل آنتی اکسیدانی و سایر پارامترها.

با تشکر از استاد راهنما سرکار خانم دکتر قاسمیان

و استاد مشاور سرکار خانم دکتر پیغمبرزاده

و داور محترم سرکار خانم دکتر لیلا درخشان

و دانشجویان و حضار گرامی