

بررسی حساسیت و ویژگی CMT در تشخیص اورام پستان تحت بالینی در گاو شیری

• فرامرز قراگوزلو، • محمود بلورچی، • عبدالمحمد حسنی طباطبایی،
• حمید قاسم‌زاده، • مهدی وجگانی

اعضای هیات علمی گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی
دانشگاه تهران، تهران ایران

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۸۰ تاریخ پذیرش: مردادماه ۱۳۸۲

چکیده

ورم پستان به عنوان زيانبار ترين بيماری در بين انواع بيماریهای گاو شیری شناخته شده است. با توجه به اهميت اين بيماری، مطالعه حاضر برای اطلاع از میزان حساسیت و ویژگی تست ورم پستان کالیفرنیا (CMT) در تشخیص کارتیه مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و تفکیک آن از کارتیه های سالم انجام شد. در این مطالعه تعداد ۲۶۸ کارتیه از ۱۲۸ رأس گاو در ۶ دامپرووری اطراف تهران مورد بررسی قرار گرفت و نمونه شیر جهت انجام آزمایش CMT، کشت و شمارش سلولهای غیر جنسی (SCC) اخذ گردید. در نتیجه گیری نهایی حساسیت CMT در مقایسه با کشت و SCC به ترتیب ۸۴/۱ درصد و ۹۷/۵ درصد تعیین شد. همچنین ویژگی CMT در مقایسه با کشت و SCC به ترتیب ۶۱/۲ درصد و ۷۹/۶ درصد به دست آمد.

کلمات کلیدی: ورم پستان، تست ورم پستان کالیفرنیا، حساسیت، ویژگی، گاو شیری.

Pajouhesh & Sazandegi, No: 59 pp: 59-62.

Sensitivity and specificity of CMT to detect sub clinical mastitis in dairy cows

F. Gharagozloo, M. Blourchi, A. M. Tabatabaee, H. Ghasemzadeh Nava, M. Vojgani. Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran.

Mastitis is one of the most costly and troublesome diseases among other diseases of dairy cows. Diagnosis of the disease in the subclinical form is very important since in such cases the qualitative as well as the quantitative value of the milk is reduced. In addition, in the sub clinical form a major part of the cow's udder has already been affected. Therefore, it should be diagnosed and treated as soon as possible. Among the wide variety of diagnostic tests, the california mastitis test is of special important diagnosis of the subclinical mastitis at the dairy farm. In view of the easiness with which this test is carried out, it is today widely applied as a screening test in industrial cattle farms for searching and identifying subclinical mastitis. Study of the sensitivity and specificity of CMT for diagnosis of subclinical mastitis and also how far this test matches the bacterial culture and somatic cell count was the aim of this study. In order to achieve these goals, 268 milk specimens were obtained in an absolutely hygienic manner prior to milking of the cows in sterile universal tubes for bacteriological culture and the same number in small plastic bottles to be sent for cellular count. Plastic bottles contained little potassium dichromate which protect cells found in milk up to their count time. The number of positive culture specimens was 143 for positive CMT's and 27 for negative CMT's. The number of negative specimens was 38 for positive CMT's and 6 for negative CMT's. The separated bacteria existing in the samples included *E. coli*, β and non-hemolytic Staphylococci, β and non-haemolytic Streptococci Bacillus and Klebsiella. Based on the results obtained from SCC in comparison with +3, +2, +1 and negative CMT's has an SCC on average equal to 7190000, 1930000, 1240000 and 154000 respectively. As a final conclusion, sensitivity and specificity of CMT compared with culture and SCC, was 84.1 per cent and 97.5 per cent, 61.22 per cent and 79.6 per cent respectively.

Key words : California Mastitis Test, Mastitis, Dairy cow, Sensitivity, Specificity.

مقدمه

بیماری ورم پستان به عنوان ضایعه بارترین و پرهزینه ترین بیماری در مراکز پرورش گاو شیری در جهان شناخته شده است (۴، ۷). خسارات ناشی از آن شامل کاهش تولید شیر، دورریختن شیر، کاهش کیفیت شیر، هزینه های دارو، دامپزشک و آزمایشگاه که تولیدکنندگان را به طور مستقیم (۱۱، ۱۲) و مصرف کنندگان فرآورده های لبنی را به طور غیرمستقیم (۶) تحت تأثیر قرار میدهد. از میان اشکال مختلف ورم پستان، فرم تحت بالینی آن به علت نداشتن علائم بالینی قابل رؤیت در شیر غالباً از نظر مخفی میماند، لذا بسیار حائز اهمیت است (۱۶، ۱۸). کاهش تولید شیر یکی از خسارات ورم پستان و از جمله اصلی ترین آن میباشد (۱۴)، به طوری که در ورم پستان تحت بالینی این کاهش در حدود ۲۶-۱۰ درصد محاسبه شده است (۹). از ۱۰۰ درصد خساراتی که در ورم پستان تحت بالینی متوجه دامدار میشود حدود ۷۵ درصد آن مربوط به کاهش تولید شیر است که عمدتاً این مقدار از نظر دور میماند. هدف از انجام این تحقیق بررسی CMT از جنبه های حساسیت و ویژگی آن در تشخیص ورم پستان تحت بالینی است و اینکه این آزمون تا چه اندازه با کشت باکتریایی و شمارش سلولهای سوماتیک توافقی و همخوانی دارد.

مواد و روش کار

وسایلی که جهت انجام آزمون CMT مورد نیاز هستند عبارتند از: ۱- پلیت مخصوص آزمون CMT، ۲- معرف شیرآزما، ۳- بطریهای کوچک شیشه ای یونیورسال درب پیچی استریل، ۴- قوطیهای پلاستیکی دربدار، ۵- دیکرومات پتاسیم، ۶- برچسب جهت ثبت اطلاعات، ۷- پنبه و الکل ۷۰ درصد. در این بررسی از تعداد ۲۶۸ کارتیه مربوط به ۱۲۸ رأس گاو شیری در شش دامپروری مختلف اطراف تهران نمونه گیری انجام شد. در زمان نمونه برداری، پس از شستشوی کامل هر کارتیه چند قطره اول شیر را دور ریخته و از دوششهای بعدی جهت انجام آزمون CMT داخل گوده های پلیت تخلیه می گردید. سپس هم حجم شیر داخل هر گوده از معرف CMT حاوی ماده آکیل آریل سولفونات (شیرآزما، شرکت نور دارو ایران) به آن اضافه شده که پس از مدت کوتاهی حرکت دورانی مخلوط شیر و شیرآزما، نتیجه CMT قرائت می گردید. در این مرحله از هر کدام از کارتیه ها با توجه به آزمون CMT آنها بر روی پلیت، از شیر همان کارتیه نمونه برداری جهت شمارش سلولی و کشت باکتریولوژیکی به عمل می آمد. نمونه های ارسالی شیر جهت کشت باکتریولوژیکی در بطریهای یونیورسال استریل تخلیه می گردید و نمونه هایی که می بایست شمارش سلولی توسط دستگاه شمارشگر الکترونیکی فوزوماتیک ۹۰ (Foss electric Hilleord, Denmark) روی آنها صورت بگیرد توسط قوطی های پلاستیکی که حاوی مقدار کمی دیکرومات پتاسیم (جهت ممانعت از کاهش سلولها در اثر هضم آنزیمی شیر) ارسال می شد. این دستگاه سلولها را با یک نوع رنگ فلورسنت رنگ آمیزی می کند و سپس این ذرات فلورسنت را می شمارد (۸). در این بررسی از ۲۶۸ کارتیه، مربوط به ۶ گله گاو شیری، نمونه شیر جهت شمارش سلولی و کشت باکتریولوژیکی اخذ گردید و به آزمایشگاه ارسال شد. نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون آماری مربع کای مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

نتایج به دست آمده از CMT در محل دامداری، کشت و SCC نمونه های شیر در آزمایشگاه در جداول ۱ الی ۳ آورده شده است. از ۱۴۵ مورد CMT+، تعداد ۱۱۳ مورد (۷۸ درصد) میکروب جدا شد و ۳۲ مورد (۲۲ درصد) میکروبی رشد نکرد و از ۳۶ مورد CMT+، تعداد ۳۰ مورد (۸۳/۳ درصد) میکروارگانیزم جدا شد و ۶ مورد (۱۶/۷ درصد) میکروبی رشد نکرد و از موارد CMT+، نیز از ۸ مورد فقط ۲ مورد (۲۵ درصد) میکروب جدا شد (جدول ۳).

میکروارگانیزمی که بیش از همه کشتهای جدا شد استافیلوکوک غیر همولیتیک است که در CMT+ و ۲+ و ۱+ به ترتیب ۳۷/۲ درصد (۵۴/۱۵۴)، ۳۳/۳ درصد (۱۲/۳۶)، ۲۵ درصد (۲/۸) بود.

بر اساس جدول ۴ حساسیت و ویژگی CMT در تشخیص ورم پستان تحت بالینی در مقایسه با کشت به ترتیب ۸۴/۱ درصد و ۶۱/۲ درصد به دست آمد. از آنجایی که غالباً گاوهایی که درجه CMT آنها ۲+ و ۳+ است نمونه شیر آنها جهت کشت باکتریولوژی ارسال شدند و اغلب این موارد در محیط کشت مثبت میشوند (۱۷) و از طرف دیگر نتایج حاصل از این مطالعه در جدول ۱ نیز آمده، نشان میدهد که بیشتر باید روی CMT با درجه ۲+ و ۳+ تأکید کرد. به همین دلیل CMT های ۲+ و ۳+ را به عنوان CMT های مثبت فرض کرده و در یک خانه قرار گرفته و CMT های ۱+ و منفی در خانه دیگر قرار داده شده و به عنوان CMT های منفی در نظر گرفته شده است. ۸۴/۱ درصد (۱۴۳/۱۷) $Se =$ و ۶۱/۲ درصد $Sp = ۶۰/۹۸ =$. بر اساس منابع، SCC های بالاتر از ۲۰۰۰۰ مثبت فرض شده اند (۱۵). با توجه به نتایج مثبت کاذب در اوایل و اواخر دوره شیردهی گاوهایی که بالاتر از یک هفته از زایمان آنها گذشته و کمتر از ۶/۵ ماه آبستن بوده اند در جدول ۱ لحاظ شده اند (۱۳). بر طبق این جدول حساسیت یا Se (Sensitivity) و ویژگی یا Sp (Specificity) ارزش پیشگویی مثبت (PPV) و ارزش پیشگویی منفی (NPV) عبارتند از: $Se = (۸۰/۸۲) = ۹۷/۵$ درصد، $Sp = (۷۸/۹۸) = ۷۹/۶$ درصد، $NPV = (۷۸/۱۰) = ۹۷/۵$ درصد، $PPV = (۸۰/۱۰۰) = ۸۰$ درصد.

بحث و نتیجه گیری

با توجه به جدول ۱ حساسیت و ویژگی CMT این چنین برآورد شده است: Se (۹۷/۵ درصد) و Sp (۷۹/۶ درصد) در حالی که همین فاکتورها بر طبق جدول ۳ این چنین می باشد: Se (۸۴/۱۲ درصد) و Sp (۶۱/۲۲ درصد) علل مختلفی را در رابطه با اینکه چرا حساسیت و ویژگی CMT در رابطه با SCC قدری از ۱۰۰ درصد پایین تر است میتوان ذکر کرد مثلاً تعداد بالای شکمهای زایش، سن بالای دام و استرس می توانند به طور جزئی SCC را افزایش دهند و همچنین منجر به نتیجه مثبت کاذب در رابطه با ورم پستان خواهد شد که نتیجه نهایی آن افت ویژگی CMT میباشد (۱۵) و یا اینکه زمانی که پاتوژن در پستان توسط سیستم دفاعی پستان از بین رفته باشد و کمی بعد از آن نمونه شیر برای آزمایش تشخیص ورم پستان گرفته شود چون هنوز میزان SCC در این شیر بالاست لذا افزایش کاذبی را بدون اینکه جرمی در شیر باشد خواهیم داشت که نتیجه آن باز هم افت ویژگی CMT است (۲) و یا یکی

استافیلوکوکها شوند نمونه شیر را ابتدا منجمد کرده تا سلولهای موجود در شیر پاره شده و ۲۴ ساعت بعد کشت را انجام میدهند تا اگر احتمالاً جرمی درون سلولها بوده است، بیرون بریزد و رشد کند (۲). از جمله دلایل دیگری که می‌توان برای افت میزان ویژگی CMT در رابطه با کشت آورد این است که ممکن است عامل پاتوژن مسبب ورم پستان در نمونه شیر، ویروس، قارچ یا مایکوپلاسما باشد و چون جداسازی این عوامل مدنظر این بررسی نبوده است لذا مواردی ملاحظه شده که مثلاً CMT عدد +۳ را نشان میداد، در حالی که در کشت جرمی رشد نکرد.

با وجود اینکه حساسیت و ویژگی CMT در رابطه با SCC بالاست و همین فاکتورها در رابطه با کشت قدری پایین تر است ولی جهت اتخاذ روشهای پیشگیری، درمان یا حذف گاوهای مبتلا به ورم پستان نمی‌توان تنها به نتایج حاصل از CMT یا SCC اتکا کرد و انجام کشت باکتریایی ضرورت دارد (۱۰،۲). زیرا در کشت اولاً نوع عامل مولد ورم پستان مشخص میگردد، لذا می‌توان اجرام پاتوژن را از اجرام غیرپاتوژن تفريق نمود و نکته دیگر اینکه آیا ورم پستان از نوع مسری است یا محیطی که در هر مورد در روشهای برخورد با بیماری از جنبه‌های درمانی و کنترل و پیشگیری تفاوت دارند (۱، ۵،۳).

از دلایل افت حساسیت این است که ممکن است جرم یا پاتوژن در همان مراحل اولیه حضورش در پستان بوده و هنوز سیستم دفاعی پستان آنقدرها فعال نشده است که میزان افزایش SCC یک عدد واقعی را نشان دهد و اگر در این موقع از شیر نمونه‌برداری شود در چنین حالتی میزان SCC کمتر از حد واقعی خود است و حساسیت CMT کمتر از میزان واقعی خودنمایی می‌کند (۲). از علل دیگر افت حساسیت و ویژگی CMT در مقایسه با کشت یکی خطای نمونه برداری می‌باشد که اگر نمونه‌گیری کاملاً بهداشتی نبوده و فردی که نمونه‌گیری می‌کند نمونه‌ها را آلوده اخذ کند نتیجه کشت مثبت خواهد شد و دیگر اینکه اگر در آزمایشگاه باکتری‌شناسی نمونه‌ها به هر دلیلی آلودگی‌های ثانویه پیدا کنند باز نتیجه، مثبت کاذب خواهد شد و حساسیت CMT افت خواهد کرد. زمانی که جرم موجود در پستان از نوع استافیلوکوک باشد و چون این باکتری قادر به نفوذ درون سلولها می‌باشد، همچنان SCC بالاتر می‌ماند لذا هنگام آزمایش، CMT عدد بالایی را نشان می‌دهد ولیکن در کشت جرمی رشد نمی‌کند، از طرف دیگر ماهیت دوره‌های (Cyclic) الگوی دفع این پاتوژن نیز جزء مواردی است که حالت منفی کاذب در کشت ایجاد می‌کند (۱۷) که معمولاً برای این قبیل موارد که تکنسین آزمایشگاه و دامپزشک مربوطه مشکوک به

جدول ۱- مقایسه رابطه بین CMT و مقادیر عددی SCC و کشت باکتریولوژیک

CMT	نتیجه کشت		جمع کل	میانگین عددی SCC
	مثبت	منفی		
+۳	۷۰	۵	۷۵	۷۱۹۰۰۰۰
+۲	۱۰	۱۵	۲۵	۱۹۳۰۰۰۰
+۱	۲	۷	۹	۱۲۴۰۰۰۰
منفی	—	۷۱	۷۱	۱۵۴۰۰۰
جمع کل	۸۲	۹۸	۱۸۰	

جدول ۲- نتایج کشت نمونه شیر کارتیه‌ها در درجات مختلف CMT

CMT	کشت	ایبی کولای	استافیلو بتاهمولتیک	استافیلو غیرهمولتیک	استرپتو بتاهمولتیک	استرپتو غیرهمولتیک	باسیلوس	کلبسیلا	استافیلو آرتوس	عدم رشد	جمع کل کارتیه‌ها از نظر کشت
+۳	۹	۹	۹	۵۴	۴	۳	۱	۱	۲۲	۲۲	۱۵۴
+۲	۵	۶	۶	۱۲	۴	—	—	—	۳	۶	۳۶
+۱	—	—	—	۲	—	—	—	—	—	۶	۸
منفی	۹	۹	۱	۱۱	—	۱	۲	—	۱	۵۴	۷۹

جدول ۳- ارتباط بین نمونه‌های شیر CMT مثبت و منفی با کشت‌های مثبت و منفی

CMT	کشت	مثبت	منفی	جمع
+۳	۱۱۳	۳۲	۱۴۵	
+۲	۳۰	۶	۳۶	
+۱	۲	۶	۸	
منفی	۲۵	۵۴	۷۹	
جمع کل	۱۷۰	۹۸	۲۶۸	

Health written by Radostis, O.M., 3rd ed., W.B. Saunders Company, PP: 397-433.

9- Hoblet, K.H., Schnitkey, G.D. and Arbaugh, D. 1991; Economics of clinical mastitis. Proceeding of 30th Annual Meeting of National Mastitis Council/Reno/Nevada/USA, PP: 24-30.

10- Leigh, J.A. 1999; *Streptococcus uberis*: A permanent barrier to the control of bovine mastitis. The Veterinary Journal, 157/225-238.

11- Moore, D.A., Cullor, J.S., Bondurant, R.H. and Sischo, W.M. 1991; Preliminary field evidence for the association of clinical mastitis with interestrus Theriogenology, Vol. 36, No. 2, PP: 257-265.

12- Philpot, W.N. and Nickerson, S.C. 1980; Mastitis counter attack. American Vet. Publication: 2-50.

13- Radostis, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. and Hinchcliff, K.W. 2000; Veterinary Medicine 9th Ed. W.B. Saunders Co. PP: 615.

14- Rice, D. 1980; Mastitis control. Neb Guide, 80-506.

Rice, D.N. 1981; Using the california mastitis test (CMT) to detect sub clinical mastitis. Neb Guide G, 81-556.

16- Schalm, O.W., Jain, N.C. and Carrol, E.J. 1971; Bovine Mastitis/Lea and Febiger/Philadelphia, PP: 128-136.

17- Vestweber, J.G. 1994; *Staphylococcus aureus* mastitis. Part II. Diagnostic Aids, Therapy, and Control. The Compendium. Vol. 16, No. 2, PP: 217-225.

18- Wood, J.D., Chalmers, G.A., Fenton, R.A., Pritchard, J., Schoon, der woerd, M. and Lichten Berger, W. 1991; Persistent shedding of *Salmonella enteritidis* from the udder of a cow, Can. Vet. J. Vol. 32 P, 738-741.

براساس نتایج این مطالعه با توجه به همخوانی نزدیک CMT با نتایج SCC و کشت، می‌توان برای شناسایی اولیه ورم پستان تحت بالینی از CMT به جای SCC با ضریب اعتماد قابل قبولی بهره جست ولی تأکید می‌گردد جهت شناسایی عوامل پاتوژن مولد ورم پستان و اتخاذ سیاستهای کنترل و پیشگیری و درمان در سطح گله، کشت باکتریولوژیک نمونه‌های شیر الزامی است.

منابع مورد استفاده

1-Anderson, K.L. 1989; Therapy for acute coliform mastitis. The Compendium Food Animal Vol. 11, No. 9, PP: 12-25.

2-Anderson, K.L. 1993; The veterinary clinics of north America. W.B. Saunders Co. London, PP: 475-499.

3-Blowey, R.W. and Colis, K. 1992; Effect of premilking the disinfection on mastitis incidence/total bacterial count/cell count and milk yield in three dairy herds. The Vet. Rec. 29: 175-177.

4-Blowey, R. and Edmondson, P. 1995; Mastitis control in dairy herds/an Illustrated and Practical Guide. Farming Press Books. London, PP: 5-17.

5-Britten, A.M. 1991; Defining and diagnosing clinical mastitis. Proceeding of 30th Annual Meeting of National Mastitis Council/Reno/Nevada USA, PP: 17-23.

6-Cullor, J.S. 1995; Milk antibiotic residue tests in veterinary practice. The compendium/Food Animal, Vol. 17, No. 6, PP: 863-871.

7-Eberhart, R.J. 1987; Current concepts of bovine mastitis/N.M.C./Arlington. Lea and Febiger, PP: 125-152.

8-Erskine, R.J. 2001; Mastitis control in dairy herds. In Herd