

بررسی لکوکرام گاوهای شیری مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی

دکتر مهدی وجگانی^۱، دکتر فرامرز قراکزلو^۱، دکتر زهره خاکی^۱، دکتر آرش خردمندکلور^۲

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۵، شماره ۴، ۳۷-۳۵، (۱۳۷۹)

صورت پذیرفت. لازم به تذکر است که واکنش شیر در آزمایش CMT براساس میزان آلودگی به درجات مختلف Trace، ۱، ۲ و ۳ تقسیم بندی می شود و در درجه ۳ که بالاترین حد آلودگی ورم پستان تحت بالینی ۴ الی ۸ میلیون سلول در هر میلی لیتر شیر وجود دارد.

مواد و روش کار

مطالعه حاضر در پنج مرحله زیر صورت پذیرفت:

۱ - مشخص کردن دامهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و بالینی: بدین منظور با هماهنگی با آزمایشگاه در پنج روز مختلف قبل از شیردوشی ظهر به پنج واحد دامپروری مراجعه و تمام گاوهای دوشای گله را CMT کرده که در مجموع پنج گله، ۸۳۳ رأس گاو CMT شدند.

برای انجام آزمایش CMT دو تا چهار دوشش اولیه هر کارتیه را دور ریخته و از دوششهای بعدی حدود دو میلی لیتر شیر از هر کارتیه به داخل هر فنجانک ظرف CMT ریخته و سپس هم حجم آن، معرف CMT (محلول شیر آزما) اضافه می گردید و مخلوط حاصله را تکان داده و بسته به میزان ژل تشکیل شده درجات مختلف CMT برای آن در نظر گرفته می شد. شایان ذکر است محلول CMT حاوی معرف الکیل آریل سولفونات است که در حضور گلبولهای سفید ژل تشکیل می دهد. بدیهی است هر چه تعداد SCC شیر بیشتر باشد میزان تشکیل ژل بیشتر می شود و CMT درجه ۳ بالاترین حد تشکیل ژل است که با کچ کردن پلیت CMT لخته به طور کامل از گوده جدا و خارج می شود.

۲ - نمونه گیری شیر جهت کشت: از کل کارتیه های مبتلا در گاوهایی که در آزمایش CMT درجه ۳ را نشان داده یا در معاینه ورم پستان بالینی آنها مشخص شد نمونه گیری جهت کشت به شکل زیر به عمل آمد:

نوک پستان کاملاً با پنبه الکل ضدعفونی شده و پس از دور ریختن چند دوشش اولیه بین ۲ الی ۵ میلی لیتر شیر در لوله ای استریل ریخته و تا زمان ارسال به آزمایشگاه در یخچال ۴+ درجه سانتیگراد نگهداری می گردید.

۳ - نمونه گیری خون جهت CBC: به طور تصادفی به طور یک در میان از ۹۴ رأس گاو مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی درجه ۳ (از مجموع ۲۱۰ رأس که در این دسته قرار می گرفتند) و ۲۱ رأس گاو بظاهر سالم (CMT منفی) نمونه گیری خون جهت CBC صورت پذیرفت. نمونه های خون در لوله های حاوی ضدانعقاد EDTA جمع آوری می گردید و پس از مخلوط نمودن با ماده ضدانعقاد در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل می شد.

۴ - شمارش تفریقی سلولهای خون: برای شمارش هر نمونه خون، ابتدا با پیپت ملانژور تا عدد ۵/۵ خون را کشیده و سپس تا عدد ۱۱ از محلول آبی رنگ مارکانول که حاوی اسیداستیک برای تخریب گلبولهای قرمز است کشیده می شد. سپس حداقل ۲ دقیقه در دستگاه تکان دهنده (Shaker) قرار می گرفت تا خوب مخلوط شود. سپس با لام توما شمارش انجام می شد.

۵ - کشت میکروبی: برای کشت میکروبی، ابتدا شیر در دو محیط مک کانکی و بلاگ آگار کشت داده می شد. محیط مک کانکی خاص باکتریهای گرم منفی و محیط بلاگ آگار، محیط کشت عمومی است همچنین مقداری شیر در محیط آبگوشت مغذی (Nutrient brath) کشت داده می شد تا به عنوان تقویت

یکی از عواملی که در ورم پستان تغییر پیدا می کند، تابلوی خونی و به عبارت بهتر لکوکرام است (۵، ۴، ۳، ۲). براساس مطالعات این پژوهشگران که ورم پستان را به صورت تجربی (Experimental) و با تلقیح مقادیر مختلف از باکتریهای متفاوت ایجاد کرده اند، تابلوی خونی برحسب زمانهای متفاوت از لحظه تلقیح باکتری، تغییرات مختلفی پیدا می کند. براساس مطالعه جین و همکاران (۲) تغییرات در لکوکرام گاوهای مبتلا به ورم پستان را می توان به ۴ مرحله تقسیم کرد: مرحله I کاهش تعداد نوتروفیلهای خون در طی ۶-۴ ساعت اول پس از تلقیح به دلیل مهاجرت این سلولها از خون به بافت پستان آلوده. مرحله II افزایش تعداد نوتروفیلهای خون بعد ۶-۴ ساعت به دلیل تخلیه نوتروفیل از مغز استخوان به داخل خون. مرحله III کاهش ثانویه نوتروفیلهای خون بین ساعات ۲۴-۷۲، به دلیل انتشار مجدد این سلولها به سیستم عروق و پرشدن مجدد مخزن حاشیه ای. مرحله IV افزایش ثانویه در تعداد نوتروفیلهای خون بعد از ۷۲ ساعت که به دلیل تولید مداوم این سلولها از مغز استخوان می باشد. همچنین تعداد کل لکوسیت های خون، همزمان با نوتروپنی اولیه کاهش یافته و بعد از آن با هجوم نوتروفیلها از مغز استخوان به داخل خون، به حد طبیعی بازگشته و بندرت از حد نرمال تجاوز می نماید (۵). حال هدف از انجام تحقیق این بود که آیا می توانیم تغییرات چهارگانه فوق در لکوکرام را در سطح فارم به گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی که از زمان آغاز آلودگی و ایجاد ورم پستان آنها اطلاعی نداریم، تعمیم دهیم و یا با داشتن تغییر در لکوکرام آن را به ورم پستان نسبت دهیم و یا حتی بتوانیم زمان آغاز آلودگی و ایجاد بیماری را تخمین بزنیم. در این مطالعه به پنج دامپروری بزرگ اطراف تهران مراجعه شد و ۸۳۳ رأس دام دوشا در این گله ها CMT شدند و از موارد ۳ مثبت CMT و بالینی نمونه گیری جهت کشت صورت گرفت و به طور تصادفی نیز از ۱۱۵ رأس دام (۹۴ رأس گاو مبتلا و ۲۱ رأس گروه بظاهر سالم که CMT آنها نیز منفی بود) نمونه گیری خون جهت تعیین CBC به عمل آمد. تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) نشان داد که اختلاف معنی داری بین تعداد کل گلبولهای سفید (WBC) و نوتروفیل خون گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و گروه شاهد وجود ندارد. شایان ذکر است که تعداد ائوزینوفیلها و بازوفیلها نیز شمارش شدند که چون در سایر مطالعات بیشترین ارزش را به نوتروفیل داده ما نیز در این مقاله به این موضوع پرداختیم.

واژه های کلیدی: لکوکرام، ورم پستان، گاو شیری.

برای تولید هر لیتر شیر حدود ۴۰۰ لیتر خون باید در پستان جریان پیدا کند (۱) و در موارد ورم پستان، حجم وسیعی از گلبولهای سفید خون به پستان حمله برده تا عفونت را مهار کنند یا از بین ببرند. به همین خاطر در ورم پستان حاصل از اشریشیاکلی ابتدا نوتروپنی و بعداً نوتروفیلی جبران شونده که در اثر فراخوانی گلبولهای سفید از مغز استخوان است رخ می دهد (۲) و در خصوص ورم پستانهای مایکوپلاسمایی، استریتوکوکی و سالمونلایی (۴) نیز گزارشاتی مبنی بر تغییر تابلوی خونی وجود دارد ولی در خصوص ورم پستان بالینی که به شکل طبیعی به وجود آمده و یا ورم پستان تحت بالینی شدید (درجه ۳ CMT) هیچ گزارشی دیده نشد و لذا مطالعه حاضر که از نوع مقطعی (Cross sectional) است

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.



پس از تلقیح، این کاهش به ۹۳ درصد رسید (۵). گزارش دیگری در ایجاد تجربی ورم پستان فوق حاد ناشی از اشیشیاکلی، به علت مهاجرت تعداد زیادی از نوتروفیل، به کاروتیدهای مبتلا، لکوپنی، نوتروپنی و انحراف به چپ جبران‌ناپذیر مشاهده می‌شود حاصل نگردید. ولی در این مطالعه چنین نتایجی که به نظر می‌رسد به علت زمان نمونه‌گیری بود که با ایجاد ورم پستان تجربی تفاوت دارد. در تجربه‌ای که صورت گرفت تعداد گلبولهای سفید و نوتروفیلها در ورم پستان تحت‌بالینی اشیشیاکلی بیشتر از سایر گروهها ولی نه تنها در محدوده طبیعی قرار داشت بلکه این تفاوت نیز از لحاظ آماری معنی‌دار نبوده که نشان می‌دهد در حالت تحت‌بالینی که معمولاً در این ورم پستان به دنبال حالت بالینی رخ داده مسئله کمبود گلبولهای سفید و نوتروفیلها با فراخوانی از مغز استخوان جبران شده و حتی این فراخوانی به حدی بالاتر از هجوم به پستان بوده که تعداد را نسبت به سایر گروهها در حد بالاتر قرار داده است.

در تجربه دیگری که ۵۰ میکروگرم آندوتوکسین سالمونلاتیفی موریوم به پستان یک رأس گاو تلقیح شده بود میزان نوتروفیلها، به طور معنی‌داری از ۲۸ درصد در زمان صفر، به ترتیب به ۴۱، ۵۴ و ۶۲ درصد در ساعات ۱۲، ۲۴ و ۳۱ پس از تلقیح افزایش یافت. اما درصد لنفوسیتها از ۴۴ درصد در زمان صفر به ترتیب به ۲۱، ۲۸ و ۳۸ درصد در ساعات ۱۲، ۲۴ و ۳۱ پس از تلقیح کاهش یافت ولی درصد نوتروفیلها و لنفوسیتها در مابقی دوره نمونه‌گیری (از ساعت ۳-۱۰) تفاوت چندانی با مرحله قبل از تلقیح نداشت همچنین در این تجربه تغییر معنی‌داری در نسبت مونوسیتها و ائوزینوفیلها پس از تلقیح آندوتوکسین مشاهده نشده است (۷). بنابراین در غالب موارد نشان داده شده که در ورم پستان بالینی در مراحل اول نوتروپنی رخ داده که بعد جبران می‌شود.

در تجربه دیگری که کارتیه‌ها با استریتوکوکوس آگالاکتیه آلوده شده بودند میزان نوتروفیلها ۳ ساعت پس از کاهش آنها در مغز استخوان و خون در شیر یافت شدند (۴). در مطالعه حاضر، در موارد تحت بالینی این باکتری تغییر معنی‌داری در تابلوی خونی مشاهده نشده است و برخلاف ایکولای که یک افزایش نسبی مشاهده شد در این ورم پستان تحت بالینی که به طور مستقل قبل از ورم پستان بالینی ممکن است ایجاد شود افزایش نسبی نیز مشاهده نمی‌شود.

همچنین گزارشی وجود دارد که در ورم پستان مایکوپلاسما، زمانی که علایم بالینی بروز می‌کند، لکوپنی مشخصی تا حد ۲۵۰۰-۱۸۰۰ عدد در هر میکرولیتر ایجاد می‌شود که برای بیش از دو هفته در این حد باقی می‌ماند (۳) که خوشبختانه در نمونه‌های مورد آزمایش مایکوپلاسما جدا نشد.

لذا همان‌طور که توسط سایرین گزارش شده همزمان با فروکش کردن علایم بالینی، تعداد لکوسیتها، در طی چند روز و یا یک هفته به حد طبیعی باز می‌گردد و حیواناتی که دوره بهبودی آنها آهسته‌تر است، انحراف به چپ برای مدت طولانی‌تری باقی می‌ماند (۶ و ۲). در مطالعه صورت گرفته روی ورم پستان بالینی و تحت‌بالینی تغییرات تابلوی خونی به دلایل زیر مشاهده نشد. ۱. در ورم پستان تجربی زمان بروز مشخص است و تغییرات تابلوی خونی در چند ساعت اول ایجاد شده ولی در کار صورت گرفته چون زمان ایجاد مشخص نبوده است عمدتاً تابلوهایی خونی در حد طبیعی بوده‌اند.

۲. در بسیاری از عوامل ورم پستان تحت‌بالینی مانند استافیلوکوکوس اورئوس، استریتوکوکوس آگالاکتیه که در این مطالعه نیز به آنها برخورد شد ممکن است این چهره تنها چهره بروز ورم پستان باشد و به دنبال حالت بالینی رخ نداده باشد لذا کاهش در تعداد گلبولهای سفید و نوتروفیل رخ نداده که بعداً در حالت تحت‌بالینی بخواهد جبران شود.

۳. در خصوص وضعیت تابلوی خونی در ورم پستان تحت‌بالینی اشیشیاکلی نیز چون معمولاً به دنبال چهره بالینی این نوع ورم پستان رخ می‌دهد. بنابراین بدن در حال جبران کردن کاهش گلبولهای سفید و نوتروفیل بوده که به همین علت یک مقدار بیشتر از میانگین حد طبیعی نیز دیده می‌شود.

در رشد باکتریهای شیر عمل کند. پس از ۲۴ ساعت که کشت در اتو قرار داده شد. نتایج کشت قرائت و اگر در دو محیط بلاد آگار و مک‌کانگی باکتری رشد نکرده بود مجدداً از محیط آبگوشت مغذی در دو محیط فوق‌الذکر کشت داده می‌شد.

نتایج

در جدول ۱ وضعیت تابلوی خونی دامهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی استافیلوکوکوس اورئوس، اشیشیاکلی، استریتوکوکوس آگالاکتیه و دامهای سالم نشان داده شده است که البته تعداد لنفوسیت، بازوفیل و ائوزینوفیل نیز در کارهای انجام‌شده به دست آمده ولی به خاطر اینکه جزو موارد مطالعه نبود آورده نشده است.

جدول ۱ - مقایسه لکوگرام خون گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی و بالینی با گروه شاهد

تعداد	نوع پارامتر مورد سنجش		گروه‌های آزمایش
	نوتروفیل	گلبولهای سفید	
	خطای معیار ± میانگین	خطای معیار ± میانگین	
۲۲	۲۳۰۷/۴ ± ۲۱۳/۵	۶۴۳۲/۲ ± ۲۸۲/۳	ورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس
۷	۲۵۲۲/۱ ± ۵۳۳/۷	۷۳۷۵/۱ ± ۱۳۰۸/۷	ورم پستان ناشی از اشیشیاکلی
۲۳	۲۴۶۳/۰ ± ۲۰۰/۶	۷۱۷۶/۷ ± ۶۳۲/۵	ورم پستان ناشی از استریتوکوکوس آگالاکتیه
۲۱	۲۱۲۹/۵ ± ۱۳۶/۸	۷۳۲۷/۶ ± ۳۵۵/۱	گروه شاهد (گاوهای سالم)
	NS	NS	اختلاف معنی‌دار (P < ۰/۰۵)

همان‌طور که ملاحظه می‌شود عمدتاً تعداد گلبولهای سفید و نوتروفیلها در محدوده طبیعی است. گرچه در ورم پستان تحت‌بالینی اشیشیاکلی بیشتر به سمت بالای حد طبیعی تمایل دارد ولی براساس آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) تابلوی خونی بین هیچ کدام از ورم پستانهای بالینی و تحت‌بالینی و دامهای سالم همچنین بین خود ورم پستانهای تحت‌بالینی حاصل از عوامل واگیردار و عوامل محیطی (اشیشیاکلی) تغییر معنی‌داری را نشان نداد.

بحث

در طی روند ورم پستان حاد طبیعی یا تجربی، جریان خون در بافت پستانی بسیار افزایش یافته و گاهی تا ۳۰۰ درصد بیش از حالت طبیعی می‌رسد (۵ و ۱) که به همین لحاظ انتظار می‌رود تابلوی خونی نیز در ورم پستان تغییر پیدا کند.

در یک تجربه، نمونه‌های شیر، خون و مغز استخوان از گاوهایی که به طور تجربی به داخل پستانشان آندوتوکسین اشیشیاکلی تلقیح شده بود، اخذ گردید تا تغییرات تعداد نوتروفیلهای خون در حین ورم پستان حاد مشخص گردد، در خلال ۴-۶ ساعت اول به دلیل دیاباز نوتروفیلها به بافت پستانی و شیر، ابتدا نوتروپنی رخ داده و به دنبال آن به دلیل فراخوانی از مغز استخوان نوتروفیلی ایجاد می‌شود. این فراخوانی به حدی است که علی‌رغم مهاجرت آنها به سمت شیر، افزایش تعداد نوتروفیلهای خون (نوتروفیلی) بیشتر از میزان نوتروفیلی است که به شیر مهاجرت می‌کند (۱). در منابع دیگر هم ذکر شده است که در ورم پستان کلیفرمی، ابتدا نوتروپنی و لنفوپنی ایجاد شده و به دنبال آن نوتروفیلی جبران‌شونده پدید می‌آید (۷، ۳، ۲) و گزارش گردیده که در اثر این جبران، نوتروفیلهای نابالغ از سلولهای باند تا میلوپیت (انحراف به چپ) در خون محیطی دیده می‌شود (۲) و این میزان تحت تأثیر حدت ورم پستان و میزان نوتروپنی اولیه است و لذا در ورم پستان حاد گانگرنوز میزان انحراف به چپ شدیدتر است (۷). در تجربه‌ای دیگر که نیم میلی‌گرم از آندوتوکسین اشیشیاکلی به کارتیه ۴ رأس گاو تلقیح شده بود در طی ۲/۵ ساعت اول پس از تلقیح ۲۳ درصد کاهش در تعداد نوتروفیلهای سگمانته به وجود آمد و ۵ ساعت



References

1. Blowey, R. and Edmondson, P. Mastitis control in dairy herds an illustrated and practical guide. Farming press, 3: 18-30, (1995).
2. Jain, N.C., Schalm, O.W. and Lasmanis, J. Neutrophil Kinetics in endotoxine induced mastitis, American Journal of Veterinary Research, 39: 1552-1557, (1978).
3. Paape, M.J., Schultze, W.D., Desjardines, C. and Miller, R.H. Plasma corticosteroid circulation leukocyte and milk somatic cell responses to E. coli endotoxin induced mastitis, proceeding of the society for experimental biology and medicin, (1974).
4. Radostitis, O.M., Blood, D.C. and Gay, C.C. Veterinary Medicine, Eight edition: 566, 590, 597, (1994).
5. Saad, A.M. and Ostensson, K. Floucytometric studies in the altration of leukocyte Papulations in blood and milk endotoxin-induced mastitis in cows. American Journal Veterinary Research, Vol. 51: 1603-1607, (1990).
6. Schalm, O.W., Lasmanis, J. and Jain, N.C. Conversion of chronic staphylococcal mastitis to acute gangrenous mastitis after neutropenia in blood and bone marrow produced by an equine antibovine leukocyte serum. American Journal Veterinary Research, 37: 885-894, (1986).
7. Schalm, O.W., Corrolls, E.J. and Jain, N.C. Bovine mastitis LEA and FEBIGER first Edition, 128-136, (1971).

Survey of leucogram in clinical and subclinical mastitis in dairy cows

Vojgani, M.¹, Gharagozloo, F.¹, Khaki, Z.¹, Kheradmand Kelour, A.²

¹Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran. ²Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.

CMT is one of the most common diagnostic tests in detection of subclinical mastitis in dairy cows. In this test, there are four degrees: tract 1, 2 and 3. Grade 3 CMT is equivalent to about 4 to 8 million scc/ml in milk. The previous reports have determined that blood table especially WBC and Neutrophils are changed in clinical mastitis caused by Escherchia coli, and Streptococcus agalactiae, However, there was not such data for subclinical mastitis in the leaterature. In this study CMT was performed in 833 dairy cows belonged to 5 herds in the province suburb of Tehran. Milk samples were taken for culture from all quarters with grade 3 CMT and 115 blood samples were randomly taken from 94 cows with subclinical mastitis (grade 3 CMT) and 21 cows without any sign of disease and negative CMT. The results was statistically tested using ANOVA test. There were no significant correlation between subclinical mastitis and changes in WBC/Neutrophils.

Key words : WBC, CBC, Neutrophil, CMT, Subclinical mastitis, Dairy cow.

