JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره چهارم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۲

صفحات ۹۰-۷۱

دریافت مقاله: ۹۲/۳/۱۹

پذیرش مقاله: ۹۲/۵/۲

تعیین ارزش تشخیصی سرم آمیلوئید A به عنوان شناساگر نوین ارزیابی کیفیت شیر مخزن دامداری

محمدرضا تقدیری[۱*]، گیتی کریم[۲]، شهاب الدین صافی[۱]، عباس رحیمی فروشانی[۳]، عباسعلی مطلبی[۴]

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

۲- دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، تهران، ایران

۳- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، تهران، ایران

۴- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، گروه بهداشت، تهران، ایران

***نویسنده مسئول:** m.r.taghdiri@gmail.com

چکیده

در حال حاضر، شمارش سلول‌های سوماتیک به عنوان آزمون استاندارد طلایی ارزیابی کیفیت شیرمخزن دامداری به شمار می‌آید در حالی که هیچ گاه آزمایشی به اندازه کافی دقیق و حساس نبوده است. این مساله لزوم معرفی شناساگرهای نوین را در این زمینه مطرح ساخته است. در این میان علی رغم آن که پروتئین‌های فاز حاد به عنوان بخشی از پاسخ فاز حاد به منظور تشخیص زود هنگام بیماری‌ها از جمله ورم پستان تحت بالینی در گاوهای شیری مورد مطالعه قرار گرفته‌اند اما تاکنون به قابلیت احتمالی آنها در شناسایی تغییرات نامطلوب کیفی شیر توجه اندکی صورت گرفته است. هدف از این بررسی تعیین ارزش تشخیصی ونقطه برش آمیلوئید A شیر مخزن دامداری به منظور ارزیابی کیفیت آن به ویژه در ارتباط با ارزش کیفی پروتئین‌های شیر است. سه نمونه شیر در سه نوبت زمانی جداگانه از مخازن شیر ۳۰ گاوداری که به تصادف از میان گاوداری‌های واقع در استان تهران انتخاب شده‌اند اخذ شد سپس اندازه‌گیری آمیلوئید A شیر، شمارش سلول‌های سوماتیک، اندازه‌گیری پروتئین تام،کازئین، چربی تام و لاکتوز آن هر یک به روش تجاری رایج صورت پذیرفت. حساسیت، ویژگی و نقطه برش هرآنالیت با استفاده از آنالیز راک محاسبه شد. میانگین ومیانه غلظت امیلوئید A شیر در نمونه‌های آلوده به شکل معنی‌داری بیش از نمونه‌های سالم بود. بدین ترتیب با در نظر گرفتن تعداد Cells/mL ۲۰۰۰۰۰ برای سلول‌های سوماتیک، غلظت آمیلوئید A شیر مخزن دامداری در نقطه برش ng/mL ۵۵/۶۴ بالاترین حساسیت و درستی بالینی را از خود نشان داد و با در نظر گرفتن تعداد Cells/mL ۴۰۰۰۰۰ برای سلول‌های سوماتیک، غلظت آمیلوئید A شیر مخزن دامداری در نقطه برش ng/mL ۱۲۱/۰۲ به بالاترین حساسیت و درستی بالینی دست یافت و اندازه‌گیری غلظت پروتئین تام، چربی تام، لاکتوز وکازئین شیر به ترتیب در ردیف‌های بعدی قرارگرفتند. همچنین میان اندازه‌گیری آمیلوئید A با پروتئین تام و کازئین شیر مخزن دامداری، ارتباط معنی‌داری ملاحظه شد ($P < ۰/۰۵$).

واژه‌های کلیدی: آمیلوئید A شیر، شناساگر، کیفیت شیر

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 4(2)71-90, 2013
Received: June 9, 2013
Accepted: July 24, 2013

Determination of diagnostic value of milk Amyloid A as a new biomarker of bulk milk quality

Taghdiri, M.R.[1*], Karim, G.[2], Safi, S.[1] Rahimi Froushani, A.[3] Motalebi A.A.[4]

1- Department of Pathobiology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of food Hygiene and control, Faculty of veterinary Medicine, Tehran, Iran.

3. Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Department of Hygiene, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**** Corresponding author:*** m.r.taghdiri@gmail.com

Abstract

Somatic cell count (SCC) has been considered as the golden standard method to evaluate raw bulk milk quality for several decades. Nevertheless, SCC is neither sensitive nor specific enough to evaluate raw bulk milk. Much effort has been performed to substitute new markers in this regard. Acute phase proteins (APPs) as part of inflammatory response received too much attention as new diagnostic markers in veterinary medicine as well as subclinical mastitis in dairy cattle. Since subclinical mastitis cause unfavorable changes in milk composition, APPs would be a potential biomarkers to predict milk quality. The objectives of this study were to determine the diagnostic value of Milk Amyloid A(MAA) for evaluating raw bulk milk quality delivered to dairy industry and to establish cut off points to detect early changes in bulk tank milk quality. The study performed on 30 random selected dairy farms delivering their bulk milk to Pegah dairy industries at Tehran province. Three milk samples collected at 3 different times to measure MAA, SCC, total protein, casein, total fat and lactose level using commercially available methods. Diagnostic sensitivity and specificity and cutoff points for each test were determined using receiver-operating characteristics (ROC) analysis. MAA was the most accurate test with a diagnostic sensitivity of 96% and specificity of 60% at cutoff point of 55.64ng/mL based on a SCC of 200 × 1000 cells/mL of bulk milk. The study showed that determination of MAA can be used as a potential biomarker to discriminate early unfavorable compositional change in bulk milk quality based on SCC higher than 200 × 1000 cells/mL of bulk milk. A significant relationship found between MAA and bulk milk protein quality traits($P<0.05$).

Key words: Milk Amyloid A, Biomarker, milk quality

مقدمه

طی هزاران سال، شیر همواره یکی از مهمترین منابع غذایی انسان در طول تاریخ بوده و نقش مهمی را در فراهم ساختن انرژی، پروتئین، ویتامین و املاح به ویژه برای کودکان و سالمندان ایفا کرده و می‌کند.بخشی از شیر تولید شده که مقدار آن در برخی کشورهای پیشرفته اروپایی به ۳۰ یا ۴۲ درصد سهم بازار محصولات لبنی میرسد مستقیما مصرف شده و مابقی به صورت سایر فرآورده‌های لبنی نظیر پنیر،کره و... به مصرف می‌رسد(۱).

بدیهی است تنها گاوهای سالم می‌توانند شیری با ترکیب طبیعی و مطلوب تولید نمایند وهر عاملی که بتواند سبب کاهش کیفیت شیر شود با کاستن از ارزش غذایی آن لطمات وخسارات جدی به سلامت غذایی جامعه و نیز تولید کنندگان این ماده ارزشمند وارد ساخته واز آنجایی که شیر خام منشا تولید فرآورده‌های لبنی بسیاری است عمق این خسارات دو چندان خواهد شد. بنابر این صنایع تولید فرآورده‌های لبنی به منظور تولید محصولاتی با کیفیت بالا به ترکیب وخصوصیات فرآوری شیر خام به شدت وابسته اند. ورم پستان تحت بالینی مهمترین عامل و شایعترین بیماری در گاوهای شیری است که تاثیر مخرب بسیاری بر مقدار، ترکیب و خصوصیات شیر به هنگام فرآوری می‌گذارد(۳،۵). با این وجود، تغییرات یاد شده از نظرها دور مانده و شیر نامرغوب تولیدی همچنان به مخازن شیر گاوداری‌ها راه یافته و موجب کاهش کیفیت شیر تحویل شده به واحدهای صنعتی می‌گردد(۱۶).

بنابر این ابداع شناساگرهایی (Biomarker) با ویژگی و حساسیت بالا به منظور شناسایی تغییرات نامطلوب کیفی شیر در نتیجه این بیماری از اهمیت بهداشتی و اقتصادی به سزایی برخوردار است که تاکنون چنین شناساگرهایی به رغم نیاز روزافزون به آنها در دسترس تولیدکنندگان و صنایع تولید فرآورده‌های شیر قرار نگرفته است(۳).

امروزه حتی در کشورهای پیشرفته تنها از آزمایش سلول‌های سوماتیک که از آن به عنوان استاندارد طلایی تشخیص ورم پستان تحت بالینی، شاخص سلامت پستان و کیفیت شیر در گله یاد می‌شود می‌توان بهره جست که در عمل به شکلی غیر مستقیم در ارتباط با کیفیت شیر تولیدی قرار داشته و شاخص چندان مطلوبی برای این منظور به شمار نمی آید زیرا این آزمایش تحت تاثیر عوامل فیزیولوژیک متعددی قرار می‌گیرد. روش مذکور علاوه بر گرانی و افزودن بر هزینه‌های دامداران، با سیستمهای مکانیزه امروزین تولید شیر همخوانی چندانی نیافته و هم اکنون توانایی این آزمایش در ارزیابی کیفی شیر به شدت زیر سوال قرار گرفته است(۱۲،۱۷،۳).

پارامتر دیگری که برای ارزیابی کیفیت شیر، به ویژه کیفیت پروتئین‌های آن به کار می‌رود آزمایش پروتئین تام است. این آزمایش حتی می‌تواند یکی از عوامل موثر درتعیین قیمت شیر باشد اما مطالعات انجام شده نتایج متناقضی را در ارتباط با اثر ورم پستان بر کیفیت ومیزان پروتئین تام شیر نشان داده اند. در حالی که تعدادی از این بررسی‌ها تفاوتی بین میزان پروتئین تام شیر حاصل از گاوهای مبتلا وگاوهای سالم نشان نداده‌اند برخی افزایش سطح پروتئین‌های تام را در شیر حاصل از کارتیه‌های مبتلا گزارش می‌نمایند لذا این فاکتور هم نمی تواند شاخصی حساس در ارزیابی کیفی شیر به ویژه کیفیت پروتئینی آن باشد (۱۴،۲۱،۲۳،۳۰).

اندازه‌گیری سایر پارامترها مانند چربی تام شیر به دلیل مبهم بودن تاثیر عامل مهمی چون ورم پستان بر میزان چربی شیر و به دنبال آن تغییر وکاهش کیفیت چربی‌های آن که حتی پس از پاستوریزاسیون وذخیره سازی ادامه خواهد یافت، کمک چندانی در ارزیابی کیفیت شیر نکرده ودر اینجا نیز فقدان شاخصی ویژه وحساس خودنمایی می‌کند(۲۸،۲۰). لاکتوز نیز هیچ گاه پارامتری حساس و دقیق برای ارزیابی کیفیت شیر مخزن دامداری به حساب نیامده است(۳).

این در حالیست که با وجود تلاش‌های فراوانی که امروزه برای یافتن شناساگرهای جایگزین در تشخیص ورم پستان

تحت بالینی صورت می‌گیرد، توجه کمی به ارتباط بین شناساگرهای احتمالی جدید وتغییرات نامطلوب در کیفیت شیرشده است(۳).

یکی از این شناساگرهای جدید و تحت بررسی پروتئین‌های فاز حادند که در سال‌های اخیر مورد توجه روزافزونی در تشخیص بیماری‌ها از جمله ورم پستان در گاو قرار گرفته اند. تولید این پروتئین‌ها بخشی از پاسخ مرحله حادی است که به عنوان یک واکنش غیر اختصاصی در موارد بروز آسیب بافت ها، عفونت، تروما و به ویژه التهاب رخ می‌دهد(۳۱،۱۱،۸،۷).

علی رغم قابلیت تولید موضعی این پروتئین‌ها در بافت‌های مختلف هنوز پروتئین‌های فاز حاد موجود در شیر مورد مطالعات گسترده قرار نگرفته اند. در عین حال رفتار بیولوژیک پروتئین‌های فاز حاد می‌تواند آنها را به یکی از شناساگرهای حساس و اختصاصی درتشخیص زود هنگام ورم پستان و ارزیابی کیفیت شیر خام بدل سازد(۳).

دو پروتئین فاز حاد اصلی یافت شده در گاو عبارتند از سرم آمیلوئید A و هاپتوگلوبین که در عین حال به عنوان شناساگرهای‌های اختصاصی التهاب پستان نیز شناخته می‌شوند(۷).

از آنجا که سرم آمیلوئید A به عنوان شاخصی با حساسیت و ویژگی بالا در مقایسه با سایر پارامترهای تشخیصی، به هنگام بروز التهاب پستان به سرعت در شیرظاهر شده و غلظت آن افزایش بیشتری می‌یابد و از سویی به دلیل سنتز داخل پستانی آمیلوئید A اندازه‌گیری غلظت آن در مقایسه با سایر پروتئین‌های فاز حاد مانند هاپتوگلوبین که امکان نشت آن از سرم به درون شیر وجود دارد ارزش تشخیصی به مراتب بالاتری خواهد داشت(۷،۸).

از آنجایی که دامداران و صنایع تولید شیر و فرآورده‌های آن به کیفیت، ترکیب و خصوصیات فرآوری شیر شدیدا وابسته‌اند و امروزه فقدان شناساگرهای ویژه و حساس در ارزیابی کیفیت شیر، خصوصا پروتئین‌های آن، این نیاز فوری را برآورده نساخته وکماکان به رغم انجام آزمایش‌های کیفی گوناگون، ورود ناخواسته شیرکم کیفیت حاصل از کارتیه‌های بیمار به مخازن شیر مسبب خسارات هنگفت اقتصادی و بهداشتی است. این بررسی تلاش دارد تا با تعیین ارزش تشخیصی ونقطه برش آمیلوئید A در شیر مخزن دامداری به منظور ارزیابی کیفیت آن به ویژه در ارتباط با ارزش کیفی پروتئین‌های شیر، شناساگری جدید، کمی، ویژه و حساس را در مقایسه با سایر پارامترهای رایج ارزیابی کیفیت شیر (شمارش سلولهای سوماتیک، پروتئین تام، چربی تام، کازئین و لاکتوز) در اختیار تولیدکنندگان، صنایع لبنی، محققین و دامپزشکان قراردهد.

مواد و روش کار

چگونگی انتخاب و اخذ نمونه: جهت انتخاب نمونه‌های شیر، ابتدا لیست گاوداری‌هایی که با شرکت پگاه تهران طرف قرار داد بودند تهیه شد. بر اساس موقعیت مکانی، این گاوداری‌ها به ۵ طبقه جغرافیایی شمال، جنوب، شرق، غرب و مرکز استان تهران تقسیم شدند سپس متناسب با تعداد گاوداری‌های هر طبقه تعداد ۳۰ گاوداری از این طبقات انتخاب شد. برای انتخاب گاوداری‌ها در هر طبقه از روش نمونه گیری تصادفی استفاده شد. لازم به توضیح است که از مخزن هر یک از گاوداری‌های مذکور به هنگام تحویل شیر به کارخانه ۳ نمونه در۳ نوبت مختلف به منظور در نظر گرفتن تغییرات احتمالی در نمونه‌ها برداشت می‌شد.

برای برداشت نمونه، ابتدا شیر درون مخزن به مدت ۱۵ دقیقه از طریق دریچه بالایی آن همزده می‌شد تا کاملا یکنواخت گردد سپس به میزان حداقل ۲۰۰ میلی لیتر، شیر از مخزن برداشت می‌گردید. نمونه‌های جمع آوری شده پس از تقسیم برای آزمایش‌های مختلف در مجاورت یخ به آزمایشگاه ارسال می‌شد.

لازم به یاد آوری است که تمام آزمایش‌ها روی نمونه شیر تازه مخزن انجام پذیرفته و تنها آن بخش از نمونه‌ها که

جهت اندازه‌گیری پروتئین‌های فاز حاد در نظر گرفته شده بودند تا زمان انجام آزمایش به فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد انتقال یافتند.

شمارش سلول‌های سوماتیک: در نمونه‌های شیر به روش الکترونیک فلورسانس و با استفاده از دستگاه شمارشگر سلولی فوزوماتیک (Fossomatic 5000; Foss, Hillerød, Denmark) بر روی نمونه‌های تازه شیر مخزن دامداری انجام پذیرفت.

اندازه‌گیری لاکتوز شیر: به روش طیف نگاری با پرتو مادون قرمز (Mid Infrared Spectroscopy) و با استفاده از دستگاه میلکو اسکن (Milkoscan 4000; Foss, Hillerød, Denmark) بر روی نمونه‌های تازه شیر انجام شد.

اندازه‌گیری چربی تام شیر: به روش طیف نگاری با پرتو مادون قرمز و با استفاده از دستگاه میلکو- اسکن (Milkoscan 4000; Foss, Hillerød, Denmark) بر روی نمونه‌های تازه شیر انجام شد.

اندازه‌گیری پروتئین تام شیر: به روش طیف نگاری با پرتو مادون قرمز و با استفاده از دستگاه میلکو اسکن (Milkoscan 4000;Foss, Hillerød, Denmark) بر روی نمونه‌های تازه شیر انجام شد.

اندازه‌گیری کازئین شیر به روش مرجع کیلدال (Kejeldahl) و پس از رسوب کازئین با اسید استیک رقیق به انجام گرفت.

اندازه‌گیری غلظت آمیلوئید A شیر: به روش الایزا و با استفاده از کیت‌های تجارتی ساخت شرکت تری دلتای ایرلند (Mast ID Range,Tridelta Development Ltd,Wicklow, Ireland) انجام شد.

تجزیه و تحلیل نتایج تحقیق: با استفاده از نرم افزار (SPSS) ویرایش شانزدهم صورت پذیرفت. در آغاز با بهره‌گیری از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف (One sample Kolmogorov Smirnov test) یک نمونه‌ای مشخص شدکه توزیع داده‌های مربوط به چربی تام، پروتئین تام وکازئین شیرنرمال بوده و داده‌های مربوط به شمارش سلول‌های سوماتیک، آمیلوئید A شیر و لاکتوز آن توزیع نرمال ندارند.

بنا بر این به منظور مقایسه داده‌های حاصل از اندازه‌گیری چربی تام، پروتئین تام و کازئین شیر در نمونه‌های سالم و آلوده از آزمون t- تست مستقل استفاده شد.

به منظور مقایسه داده‌های حاصل از شمارش سلول‌های سوماتیک، آمیلوئید A و لاکتوز شیر در نمونه‌های سالم و آلوده، آزمون من - ویتنی (Mann-Whitney) به کار گرفته شد.

آنالیز راک نیز با هدف مقایسه کارایی هر آزمایش با در نظرگرفتن شمارش سلول‌های سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی ارزیابی کیفی شیر مورد انجام شد. منحنی راک، مقادیر مثبت حقیق (حساسیت) و مثبت کاذب(ویژگی) را در تمام نقاط برش ممکن نشان می‌دهد. سطح زیر منحنی به منظور ارزیابی کارایی (حساسیت، ویژگی و درستی بالینی) هر آزمایش مورد استفاده قرار گرفت به طوری که سطح زیر منحنی بین ۰/۵ تا ۰/۷ نمایانگر درستی بالینی پایین، سطح زیر منحنی بین ۰/۷ تا ۰/۹ نمایانگر درستی بالینی متوسط و سطح بالینی بالاتر از ۰/۹ نشان دهنده درستی بالینی بالا برای هر آزمون تشخیصی خواهد بود(۱۰).

نتایج

با در نظر گرفتن تعداد Cells/mL ۲۰۰،۰۰۰ برای سلولهای سوماتیک، نتایج این بررسی نشان داد که بین میانگین درصد چربی، پروتئین و کازئین شیر در نمونه‌های سالم و آلوده اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد (P>۰/۰۵).

از طرفی بین میانگین شمارش سلولهای سوماتیک و غلظت آمیلوئید A شیر در نمونه‌های سالم و آلوده اختلاف آماری به شدت معنی‌داری در آزمون من- ویتنی وجود داشت (P<۰/۰۰۱) و جدول ۱.

این در حالیست که اختلاف درصد لاکتوز شیر نمونه‌های سالم و آلوده در آزمون من- ویتنی اختلاف معنی‌داری را

نشان نداد (P>۰/۰۵).

نتایج مربوط به اندازه‌گیری آمیلوئید A و سایر پارامترهای ارزیابی کیفیت شیر با در نظر گرفتن تعداد Cells/mL ۲۰۰،۰۰۰ برای سلولهای سوماتیک، در جدول ۱ ارائه شده است همچنین نقطه برش، حساسیت، ویژگی، موارد مثبت کاذب، منفی کاذب و درستی بالینی (سطح زیر منحنی) غلظت آمیلوئید A، درصد چربی، پروتئین، کازئین و لاکتوز شیر مخزن دامداری به منظور شناسایی نمونه‌های آلوده بر مبنای حساسیت بالا، ویژگی بالا، حساسیت و ویژگی متوسط برای آمیلوئید A شیر به ترتیب در جداول ۳، ۴ و ۵ آورده شده است.

بر این اساس، غلظت آمیلوئید A شیر در نقطه برش ۵۵/۶۴ ng/mL با بالاترین حساسیت، بیشترین درستی بالینی را دارا بود در حالی که این میزان برای چربی تام، پروتئین تام، کازئین و لاکتوز شیر به ترتیب ۲/۹۶، ۲/۹۳، ۲/۴۴ و ۴/۶۳ درصد معین گردید که با در نظر گرفتن شمارش سلولهای سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی ارزیابی کیفیت شیر مخزن دامداری، بیشترین حساسیت به اندازه‌گیری غلظت آمیلوئید A در نقطه برش ۵۵/۶۴ ng/mL اختصاص یافته (Se=%۹۶،Sp= %۶۰) و به دنبال آن اندازه‌گیری غلظت پروتئین تام، چربی تام، لاکتوز وکازئین شیر به ترتیب در ردیف‌های بعدی قرار گرفتند.

در ادامه، غلظت آمیلوئید A شیر در نقطه برش ۲۸۳/۳۲ ng/mL با بالاترین ویژگی، بیشترین درستی بالینی را نشان داد در حالی که این میزان برای چربی تام، پروتئین تام، کازئین و لاکتوز شیر به ترتیب ۳/۵۴، ۳/۰۵، ۲/۶۴ و ۴/۷۸ معین شد که برمبنای شمارش سلول‌های پیکری به عنوان استاندارد طلایی، بیشترین ویژگی نیز به اندازه‌گیری غلظت آمیلوئید A در نقطه برش ۲۸۳/۳۲ ng/mL تعلق گرفته (Se=%۷۲،Sp =%۱۰۰) و در پی آن اندازه‌گیری غلظت پروتئین تام، چربی تام، لاکتوز وکازئین شیر به ترتیب در ردیف‌های بعد قرار می‌گیرند.

همچنین غلظت آمیلوئید A شیر در نقطه برش ۱۵۹/۹۷ ng/mL با ویژگی و حساسیت متوسط، واجد بیشترین درستی بالینی بود در حالی که این میزان برای چربی تام، پروتئین تام، کازئین و لاکتوز شیر به ترتیب ۳/۳۳، ۳/۰۰، ۲/۵۳ و ۴/۷۱ درصد تعیین گردید براین پایه با در نظر گرفتن ویژگی و حساسیتی متوسط، مطلوبترین نقطه برش ۱۵۹ /۹۷ ng/mL در اندازه‌گیری غلظت آمیلوئید A به دست آمد (Se =%۸۵/۳،Sp =%۸۶/۷) و در ادامه، اندازه‌گیری غلظت پروتئین تام، چربی تام، لاکتوز وکازئین شیر به ترتیب در ردیفهای بعد قرار گرفتند.

از دیدگاه درستی، بیشترین درستی بالینی، بر پایه سطح زیر منحنی به ترتیب متعلق است به اندازه‌گیری غلظت آمیلوئید A شیر، پروتئین تام، چربی تام، لاکتوز و کازئین شیر.

با در نظر گرفتن نقطه برش Cells/mL ۴۰۰،۰۰۰ برای سلولهای سوماتیک، نتایج این بررسی نشان داد که بین میانگین درصد چربی، پروتئین و کازئین شیر در نمونه‌های سالم و آلوده اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد (P>۰/۰۵) و جدول ۲.

از طرفی بین میانگین شمارش سلولهای سوماتیک و غلظت آمیلوئید A شیر در نمونه‌های سالم و آلوده اختلاف آماری به شدت معنی‌داری در آزمون من- ویتنی وجود دارد (P<۰/۰۰۱).

این در حالیست که اختلاف درصد لاکتوز شیر نمونه‌های سالم و آلوده در آزمون من- ویتنی اختلاف معنی‌داری را نشان نمی دهد (P>۰/۰۵).

نتایج مربوط به اندازه‌گیری آمیلوئید A و سایر پارامترهای ارزیابی کیفیت شیر با در نظر گرفتن تعداد Cells/mL ۴۰۰،۰۰۰ برای سلولهای سوماتیک در جدول ۲ ارائه شده است همچنین نقطه برش، حساسیت، ویژگی، موارد مثبت کاذب، منفی کاذب و درستی بالینی (سطح زیر منحنی) غلظت آمیلوئید A، درصد

چربی، پروتئین، کازئین و لاکتوز شیر مخزن دامداری به منظور شناسایی نمونه‌های آلوده بر مبنای حساسیت بالا، ویژگی بالا و حساسیت و ویژگی متوسط برای آمیلوئید A شیر به ترتیب در جداول ۶، ۷ و ۸ آورده شده است.

بر این اساس، غلظت آمیلوئید A شیر در نقطه برش ۱۲۱/۰۲ ng/mL با بالاترین حساسیت، بیشترین درستی بالینی را دارا بود در حالی که این میزان برای چربی تام، پروتئین تام، کازئین و لاکتوز شیر به ترتیب ۳/۴۵، ۳/۰۳۵، ۲/۵۵ و ۴/۷۳ درصد معین گردید. با در نظر گرفتن شمارش سلولهای سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی ارزیابی کیفیت شیر مخزن دامداری، بیشترین حساسیت به اندازه‌گیری غلظت آمیلوئید A در نقطه برش ۱۲۱/۰۲ ng/mL اختصاص یافته (Se =%۹۳/۵،Sp =%۳۰/۵) و به دنبال آن اندازه‌گیری غلظت پروتئین تام، چربی تام، لاکتوز وکازئین شیر به ترتیب در ردیف‌های بعدی قرار می‌گیرند.

در ادامه، غلظت آمیلوئید A شیر در نقطه برش ۷۷۵/۸۹ ng/mLبا بالاترین ویژگی، بیشترین درستی بالینی را نشان داد در حالی که این میزان برای چربی تام، پروتئین تام، کازئین و لاکتوز شیر به ترتیب ۳/۷۱، ۳/۱۶، ۲/۷ و ۴/۸ درصد تعیین گردید. بر مبنای شمارش سلول‌های پیکری به عنوان استاندارد طلایی، بیشترین ویژگی نیز به اندازه‌گیری غلظت آمیلوئید A در نقطه برش ۷۷۵/۸۹ ng/mL تعلق گرفته (Sp =%۸۹/۸،Se=%۳۲/۳) و در پی آن اندازه‌گیری غلظت پروتئین تام، چربی تام، لاکتوز وکازئین شیر به ترتیب در ردیف‌های بعد قرار می‌گیرند.

همچنین غلظت آمیلوئید A شیر در نقطه برش ۳۶۳/۵۲ ng/mL با ویژگی و حساسیت متوسط، واجد بیشترین درستی بالینی بود در حالی که این میزان برای چربی تام، پروتئین تام، کازئین و لاکتوز شیر به ترتیب۳/۴۳، ۳/۰۴، ۲/۵۴ و ۴/۷۴ درصد تعیین شد. بر همین اساس، با در نظر گرفتن ویژگی و حساسیتی متوسط، مطلوبترین نقطه برش ۳۶۳ /۵۲ ng/mL در اندازه‌گیری غلظت آمیلوئید A به دست آمد (Se =%۷۱،Sp =%۵۵/۹) و در ادامه، اندازه‌گیری غلظت پروتئین تام، چربی تام، لاکتوز و کازئین شیر به ترتیب در ردیفهای بعد قرار گرفتند.

از دیدگاه درستی، بیشترین درستی بالینی، بر پایه سطح زیر منحنی به ترتیب متعلق است به اندازه‌گیری غلظت آمیلوئید A شیر، پروتئین تام، چربی تام، لاکتوز و کازئین شیر.

جدول۱- آمار توصیفی برای پارامترهای مورد اندازه‌گیری در شیرمخزن سالم و آلوده با نقطه برش Cells/mL ۲۰۰۰۰۰ برای سلول‌های سوماتیک.

پارامتر	واحد	گروه	تعداد	میانگین± انحراف معیار	میانه	پایینترین و بالاترین مقدار	P-value
آمیلوئید A شیر	ng/mL	۱	۱۵	۵۹/۶۹±۲۰/۶۷	۵۵۱/۳۵	۰/۴-۲۷۸/۳	<۰/۰۰۱
		۲	۷۵	۵۵۱/۸۳±۴۷/۹۶	۵۰۴/۳۵	۰/۴-۲۳۰۵/۷	
پروتئین تام شیر	٪	۱	۱۵	۲/۹۸ ±۰/۰۵	۲/۹۸	۲/۸۸-۳/۰۸	۰/۰۰۶
		۲	۷۵	۳/۰۵ ±۰/۰۹	۳/۰۴	۲/۸۴-۳/۳۶	
کازئین شیر	٪	۱	۱۵	۲/۵۶±۰/۰۹	۲/۵۸	۲/۴-۲/۷۸	۰/۹۶۷
		۲	۷۵	۲/۵۶±۰/۱۲	۲/۵۸	۲/۲۸-۲/۸۱	
چربی تام شیر	٪	۱	۱۵	۳/۲۵±۰/۲۹	۳/۳۲	۲/۶۹-۳/۶۹	۰/۰۳۶
		۲	۷۵	۳/۴۱±۰/۲۷	۳/۴۶	۲/۸۵-۴/۰۴	
لاکتوز شیر	٪	۱	۱۵	۴/۷۱±۰/۱۷	۴/۷۱	۴/۶۱-۴/۸۲	۰/۵۶۶
		۲	۷۵	۴/۷۲±۰/۰۱	۴/۷۴	۴/۴۸-۴/۹۴	
تعداد سلول های سوماتیک	*۱۰۰۰ Cells/mL	۱	۱۵	۱۵۷/۶±۲۲/۷۸	۱۶۲	۱۲۰-۱۹۴	<۰/۰۰۱
		۲	۷۵	۴۲۵/۸۱±۳۰۶/۱۴	۳۲۰	۲۰۲-۲۴۵۰	

جدول ۲- آمار توصیفی برای پارامترهای مورد اندازه‌گیری در شیرمخزن سالم و آلوده با نقطه برش Cells/ml ۴۰۰۰۰۰ برای سلول‌های سوماتیک

پارامتر	واحد	گروه	تعداد	میانگین± انحراف معیار	میانه	پایینترین و بالاترین مقدار	P-value
آمیلوئید A شیر	ng/mL	۱	۵۹	۳۵۵/۶۲±۴۰/۷	۲۷۸/۳	۰/۴-۱۱۷۳/۲	<۰/۰۰۱
		۲	۳۱	۶۸۷/۱۴±۹۲/۶۴	۶۱۰/۷۵	۷۸/۲۵-۲۳۰۵/۷	
پروتئین تام شیر	٪	۱	۵۹	۳/۰۳±۰/۰۹	۳/۰۳	۲/۸۷-۳/۳۶	۰/۶۴۷
		۲	۳۱	۳/۰۴±۰/۰۸	۳/۰۵	۲/۸۴-۳/۲۲	
کازئین شیر	٪	۱	۵۹	۲/۵۷±۰/۱۳	۲/۵۸	۲/۲۸-۲/۸۱	۰/۷۰۶
		۲	۳۱	۲/۵۶±۰/۰۹	۲/۵۵	۲/۳۸-۲/۷۴	
چربی تام شیر	٪	۱	۵۹	۳/۳۷±۰/۲۸	۳/۳۷	۲/۶۹-۴/۰۴	۰/۴۷
		۲	۳۱	۳/۴۱±۰/۲۷	۳/۴۶	۲/۸۵-۳/۸۸	
لاکتوز شیر	٪	۱	۵۹	۴/۷۲±۰/۱۲	۴/۷۴	۴/۵۲-۴/۹۴	۰/۶۷۴
		۲	۳۱	۴/۱۷±۰/۱۶	۴/۷۴	۴/۴۸-۴/۸۴	
تعداد سلول های سوماتیک	*۱۰۰۰ Cells/mL	۱	۵۹	۲۴۱/۴۱±۶۳/۱۰	۲۴۷	۱۲۰-۳۸۰	<۰/۰۰۱
		۲	۳۱	۶۴۷±۳۷۷/۱۹	۵۲۰	۴۰۴-۲۴۵۰	

جدول۳- نقاط برش پیشنهادی، حساسیت، ویژگی، مثبت کاذب، منفی کاذب و سطح زیر منحنی پارامترهای مورد اندازه‌گیری در شناسایی شیرهای سالم و آلوده بر اساس شمارش سلولهای سوماتیک با نقطه برش Cells/mL ۲۰۰۰۰۰ با حساسیت بالا برای آمیلوئید A شیر

پارامتر	نقطه برش	واحد	حساسیت (٪)	ویژگی(٪)	منفی کاذب (٪)	مثبت کاذب (٪)	درستی بالینی
آمیلوئید A شیر	>۵۵/۶۴	ng/mL	۹۶	۶۰	۴	۴۰	۰/۹۳۷
پروتئین تام	<۲/۹۳	٪	۸۹/۳	۲۰	۱۰/۷	۸۰	۰/۷۵۷
کازئین شیر	<۲/۴۴	٪	۸۲/۷	۱۳/۳	۱۷/۳	۸۶/۷	۰/۵۱۰
چربی شیر	<۲/۹۶	٪	۹۳/۳	۱۳/۳	۶/۷	۸۶/۷	۰/۶۶۵
لاکتوز شیر	<۴/۶۳	٪	۸۵/۳	۱۳/۳	۱۴/۷	۸۶/۷	۰/۵۴۷

جدول۴- نقاط برش پیشنهادی، حساسیت، ویژگی، مثبت کاذب، منفی کاذب و سطح زیر منحنی پارامترهای مورد اندازه‌گیری در شناسایی شیرهای سالم و آلوده بر اساس شمارش سلولهای سوماتیک نقطه برش Cells/mL ۲۰۰۰۰۰ با ویژگی بالا برای آمیلوئید A شیر

پارامتر	نقطه برش	واحد	حساسیت (٪)	ویژگی(٪)	منفی کاذب (٪)	مثبت کاذب (٪)	درستی بالینی
آمیلوئیدA شیر	>۲۸۳/۳۲	ng/mL	۷۲	۱۰۰	۲۸	صفر	۰/۹۳۷
پروتئین تام	<۳/۰۵	٪	۴۶/۷	۹۳/۳	۵۳/۳	۶/۷	۰/۷۵۷
کازئین شیر	<۲/۶۴	٪	۲۹/۳	۸۶/۷	۷۰/۷	۱۳/۳	۰/۵۱۰
چربی شیر	<۳/۵۴	٪	۳۶	۸۶/۷	۱۳/۳	۶۴	۰/۶۶۵
لاکتوز شیر	<۴/۷۸	٪	۲۵/۳	۸۰	۷۴/۷	۲۰	۰/۵۴۷

جدول۵- نقاط برش پیشنهادی، حساسیت، ویژگی، مثبت کاذب، منفی کاذب و سطح زیر منحنی پارامترهای مورد اندازه‌گیری در شناسایی شیرهای سالم و آلوده بر اساس شمارش سلولهای سوماتیک با نقطه برش Cells/mL ۲۰۰۰۰۰ با حساسیت و ویژگی متوسط برای آمیلوئید A شیر

پارامتر	نقطه برش	واحد	حساسیت (٪)	ویژگی(٪)	منفی کاذب (٪)	مثبت کاذب (٪)	درستی بالینی
آمیلوئیدA شیر	>۱۵۹/۹۷	ng/mL	۸۵/۳	۸۶/۷	۱۴/۷	۱۳/۳	۰/۹۳۷
پروتئین تام	<۳/۰۰	٪	۷۴/۷	۶۰	۲۵/۳	۴۰	۰/۷۵۷
کازئین شیر	<۲/۵۳	٪	۶۲/۷	۴۶/۷	۳۷/۴	۵۳/۳	۰/۵۱۰
چربی شیر	<۳/۳۳	٪	۶۶/۷	۵۳/۳	۳۳/۳	۴۶/۷	۰/۶۶۵
لاکتوز شیر	<۴/۷۱	٪	۶۱/۳	۵۳/۳	۳۸/۷	۴۶/۷	۰/۵۴۷

جدول ۶- نقاط برش پیشنهادی، حساسیت، ویژگی، مثبت کاذب، منفی کاذب و سطح زیر منحنی پارامترهای مورد اندازه‌گیری در شناسایی شیرهای سالم و آلوده بر اساس شمارش سلولهای سوماتیک با نقطه برش Cells/mLl ۴۰۰۰۰۰ با حساسیت بالا برای آمیلوئید A شیر

پارامتر	نقطه برش	واحد	حساسیت (٪)	ویژگی(٪)	منفی کاذب (٪)	مثبت کاذب (٪)	درستی بالینی
آمیلوئیدA شیر	>۱۲۱/۰۲	ng/mL	۹۳/۵	۳۰/۵	۶/۵	۶۹/۵	۰/۷۲۳
پروتئین تام	<۲/۹۷	٪	۸۷/۱	۲۳/۷	۱۲/۹	۷۶/۳	۰/۵۵۱
کازئین شیر	<۲/۴۶	٪	۹۰/۳	۲۲	۹/۷	۷۸	۰/۴۴۷
چربی شیر	<۳/۰۰	٪	۸۷/۱	۱۲/۹	۹/۷	۸۹/۸	۰/۵۴۸
لاکتوز شیر	<۴/۶۳	٪	۸۳/۹	۱۳/۶	۱۱/۹	۸۶/۴	۰/۴۷۳

جدول ۷- نقاط برش پیشنهادی، حساسیت، ویژگی، مثبت کاذب، منفی کاذب و سطح زیر منحنی پارامترهای مورد اندازه‌گیری در شناسایی شیرهای سالم و آلوده بر اساس شمارش سلولهای سوماتیک با نقطه برش Cells/mL ۴۰۰۰۰۰ باویژگی بالابرای آمیلوئید A شیر

پارامتر	نقطه برش	واحد	حساسیت (٪)	ویژگی(٪)	منفی کاذب (٪)	مثبت کاذب (٪)	درستی بالینی
آمیلوئیدA شیر	>۷۷۵/۸۹	ng/mL	۳۲/۳	۸۹/۸	۶۷/۷	۱۰/۲	۰/۷۲۳
پروتئین تام	<۳/۱۶	٪	۱۲/۹	۹۱/۵	۸۷/۱	۸/۵	۰/۵۵۱
کازئین شیر	<۲/۷	٪	۱۰	۸۶/۴	۹۰	۱۳/۶	۰/۴۴۷
چربی شیر	<۳/۷۱	٪	۱۹/۴	۸۸/۱	۸۰/۶	۱۱/۹	۰/۵۴۸
لاکتوز شیر	<۴/۸	٪	۱۲/۹	۸۶/۴	۸۷/۱	۱۳/۶	۰/۴۷۳

جدول ۸- نقاط برش پیشنهادی، حساسیت، ویژگی، مثبت کاذب، منفی کاذب و سطح زیر منحنی پارامترهای مورد اندازه‌گیری در شناسایی شیرهای سالم و آلوده بر اساس شمارش سلولهای سوماتیک با نقطه برش Cells/mL ۴۰۰۰۰۰ با حساسیت و ویژگی متوسط برای آمیلوئید A شیر

پارامتر	نقطه برش	واحد	حساسیت (٪)	ویژگی(٪)	منفی کاذب (٪)	مثبت کاذب (٪)	درستی بالینی
آمیلوئیدA شیر	>۳۶۳/۵۲	ng/mL	۷۱	۵۵/۹	۲۹	۴۴/۱	۰/۷۲۳
پروتئین تام	<۳/۰۴	٪	۵۱/۶	۶۱	۵۸/۱	۳۹	۰/۵۵۱
کازئین شیر	۲/۵۴	٪	۵۴/۸	۳۳/۷	۴۵/۲	۶۶/۳	۰/۴۴۷
چربی شیر	<۳/۴۳	٪	۵۸/۱	۵۵/۹	۴۱/۹	۴۴/۱	۰/۵۴۸
لاکتوز شیر	۴/۷۴	٪	۴۱/۹	۵۰/۸	۵۸/۱	۴۹/۲	۰/۴۷۳

جدول ۹- ضرایب همبستگی اسپیرمن- رو بین آمیلوئیدA، پروتئین تام، کازئین، چربی تام و لاکتوز شیر با تعداد سلول‌های سوماتیک (n=۹۰).

پارامتر	لاکتوز	چربی تام	کازئین	پروتئین تام	آمیلوئیدA شیر	سلول های سوماتیک
سلول های سوماتیک	٭ -۰/۰۵۷	۰/۱۵۱	-۰/۰۵۶	۰/۱۶۵	٭۰/۵۳۰	۱
آمیلوئیدA شیر	۰/۱۵۰	۰/۲۷۱	٭-۰/۲۶۰	٭۰/۲۲۴	۱	٭۰/۵۳۰

٭ وجود همبستگی معنی‌دار میان پرامترهای مورد سنجش(P <۰/۰۵)

بحث و نتیجه گیری

از دهه ۱۹۶۰ میلادی شمارش سلول‌های سوماتیک شاخص اجباری و استاندارد طلایی تعیین کیفیت شیر خام به شمار آمده و از آن به عنوان معیاری جهت پرداخت بهای شیر به تولیدکننده، ارزیابی سلامت پستان در گله و روش استاندارد طلایی تشخیص ورم پستان تحت بالینی نیز استفاده می‌شود(۱،۴).

علی رغم پذیرش شمارش سلول‌های سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی ارزیابی کیفیت شیر باید توجه داشت که این آزمون می‌تواند از سوی عوامل گوناگونی همچون بزرگی گله، تعداد گاوهای مبتلا به پاتوژن‌های مولد ورم پستان در گله، نسبت اختلاط شیر حاصل از گاوهای سالم و آلوده در مخزن، علل فیزیولوژیک نظیر دوره‌های شیرواری، مرحله شیرواری، میزان تولید شیر، استرس، فصل و نژاد گاوها تحت تاثیر قرار گیرد تا نه تنها ارزیابی افراد را از کیفیت شیر مخزن دامداری بلکه از وضعیت سلامت پستان در گله نیز دچار اختلال سازد. بنابر این ممکن است حتی درمخازن با تعداد سلول‌های سوماتیک یکسان، کیفیت شیر یکی نباشد(۱،۱۲،۱۶).

لورو همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند این آزمون برای ارزیابی کیفیت شیر مخزن دامداری ویژگی و حساسیت کمتری دارد(۱۸).

این در حالیست که هم اکنون سایر محققان مانند لایتنر وهمکاران در سال ۲۰۰۶ و ۲۰۰۸ در مورد همبستگی تعداد سلول‌های سوماتیک شیر با سایر پارامترهای ارزیابی کیفیت آن تردید جدی دارند.آنان کارآیی شمارش سلول‌های سوماتیک در ارزیابی کیفیت شیر به ویژه ازدیدگاه ارتباط ضعیف آن با کیفیت پروتئین‌های شیر مورد تردید قرار داده و عقیده دارند برای تولید برخی فرآوردهای لبنی مانند پنیر، بکارگیری شمارش سلول‌های سوماتیک به تنهایی نمی تواند شناساگر قابل اعتمادی برای ارزیابی کیفیت شیر خام درسطح کارتیه، شیر مخلوط کارتیه‌ها و مخازن شیر باشد(۱۶،۱۷).

همچنین درحال حاضر این آزمون علاوه بر گرانی و افزودن بر هزینه‌های دامداران با روش‌های مکانیزه فعلی تولید شیر همخوانی چندانی ندارد(۲).

روشن است که به دلایل یادشده علی رغم کاربرد گسترده شمارش سلول‌های سوماتیک، تلاش‌های بسیاری در جهت جایگزین ساختن این آزمون با شناساگرهای موثر تر در حال انجام باشد.

تاکنون رویکرد اولیه به پروتئین‌های فاز حاد از جمله

آمیلوئید A در گاو به دلیل نقش آنها در فرآیندهای التهابی بالینی و در جهت تشخیص زود هنگام مواردی همچون ورم پستان تحت بالینی بوده است بر این پایه بسیاری از محققین همچون هاراداگودا و همکاران در سال ۱۹۹۹ اکرسال و همکاران در سال ۲۰۰۱ پدرسن و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیلسن وهمکاران در سال ۲۰۰۴ گرونلوند وهمکاران در سالهای ۲۰۰۵ افزایش غلظت آمیلوئید A در شیر گاوان مبتلا به ورم پستان را به عنوان شناساگری برای تشخیص ورم پستان گزارش کرده‌اند (۹،۱۱،۱۳،۲۶).

برخلاف توجه گسترده به پروتئین‌های فاز حاد با هدف شناسایی زود هنگام تغییرات التهابی پستان، تاکنون توجه اندکی به پتانسیل و ضرورت استفاده از آنها به عنوان شاخص کیفیت و ترکیب شیرخام شده است (۱،۳،۴،۵).

مطالعات سورنسن وهمکاران در سال ۲۰۰۲ و پدرسن و همکاران در سال ۲۰۰۳ مبنی بر افزایش آمیلوئیدA شیر بلافاصله پس از وقوع عفونت پستان و پیش از افزایش شمار سلولهای سوماتیک نشان داد(۲۹،۲۶) نه تنها می‌توان آمیلوئید A شیر را شاخصی حساستر از شمارش سلول‌های سوماتیک به منظور تشخیص زود هنگام ورم پستان به شمار آورد بلکه از آن به عنوان شناساگری حساس در ارزیابی کیفی شیر یاد کرد زیرا ورم پستان تحت بالینی به عنوان شایعترین بیماری گاوان شیری عاملی موثر در بروز تغییرات نامطلوب کیفی شیر شناخته می‌شود(۳).

ویژگی دیگری که آمیلوئید A را به عنوان شناساگری مفید و حساس جهت ارزیابی کیفیت شیر در مقایسه با دیگر پروتئین‌های فاز حاد گاوی از جمله هاپتوگلوبین شیر مطرح ساخته تولید موضعی آمیلوئید A در سلول‌های پوششی غده پستان به هنگام وقوع ورم پستان و فقدان همبستگی میان آمیلوئید A سرم و شیر گاوان مبتلا به ورم پستان بالینی است(۷،۹،۲۴).

مطالعه اکرسال و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد به هنگام وقوع التهاب تحت بالینی پستان، افزایش سطح mRNA مولد سرم آمیلوئید A در بافت پستان بیش از (mRNA) مولد هاپتوگلوبین است در حالی که در کبد این نسبت به نفع هاپتوگلوبین تغییر می‌کند (۸).

یافته‌ای که گویای دلیل حضور رایج سرم آمیلوئید A در نمونه‌های مختلف شیر و به دنبال آن مخازن شیربوده و این پروتئین را علاوه بر شناساگر تشخیص زود هنگام التهاب‌های پستان به شاخص بالقوه ارزیابی کیفیت شیر از جمله در صنایع تولید شیر بدل سازد(۱،۳،۴،۱۹) خصوصیتی که در مورد هاپتوگلوبین صادق نیست.

بر این اساس، بری وهمکاران در سال ۲۰۰۵ و کواچ و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ از اولین محققانی هستند که به قابلیت احتمالی سرم آمیلوئید A شیر برای ارزیابی کیفی آن و احتمال جایگزینی آن با شمارش سلول‌های سوماتیک جهت ارزیابی کیفیت شیر اشاره کرده اند(۶،۱۵)

نخستین بار اکرشتات و همکاران در سال ۲۰۰۷ با همین رویکرد، وجود مقادیر قابل اندازه‌گیری پروتئین‌های فاز حاد از جمله سرم آمیلوئید A را در نمونه‌های اخذ شده از مخازن شیرخام گزارش کردند(۲).

در تحقیق حاضر میانگین غلظت آمیلوئید A نمونه‌های شیر آلوده مخزن از نمونه‌های سالم آن به شکل معنی‌داری بیشتر بود ($P<۰/۰۰۱$).

در مطالعه حاضر، درستی بالینی آمیلوئید A شیر با در نظر گرفتن شمارش سلول‌های سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی ارزیابی کیفیت شیر مخزن دامداری تعیین شد. میانگین غلظت آمیلوئید A نمونه‌های شیر آلوده مخزن از نمونه‌های سالم آن به شکل معنی‌داری بیشتر بود($P<۰/۰۰۱$) که این یافته با نتایج سایر مطالعات انجام شده در این زمینه همخوانی دارد(۱،۳،۴).

شایان ذکراست که به دلیل بهره گیری ازکیت ویژه اندازه‌گیری آمیلوئید A پستانی (MAA) در مطالعه حاضر و به دنبال آن افزایش ویژگی آزمایش، میانگین غلظت آمیلوئید A در مقایسه با سایر مطالعات انجام شده کمتر است در حالی

که بهره گیری از کیت اندازه‌گیری ایزوفرم سرمی آمیلوئید A(SAA) در سایر مطالعات مشابه سبب شده تا همزمان هردو ایزوفرم پستانی و سرمی آمیلوئید A که به درون شیر نشت می‌کند اندازه‌گیری شود.

البته در این میان، مداخله عواملی مانند اختلاط شیر حاصل از کارتیه‌های سالم و بیمار طی دوشش‌های مختلف درون مخازن، تفاوت در شدت بیماری زایی و نوع عوامل مسبب ورم پستان تحت بالینی در گله و سطح مدیریتی آن، مدت زمان ذخیره و نگهداری شیر در مخزن قبل و بعد از تحویل آن به کارخانه‌های شیر دور از ذهن نیست.

اکرشتات و همکاران در سال ۲۰۰۹ با درنظر گرفتن تعداد Cells/mL ۱۹۵۰۰۰ برای سلول‌های سوماتیک، میانگین غلظت آمیلوئید A شیر مخزن دامداری را در نمونه‌های حاوی آن ۱/۱۲میلی گرم در لیتر برابر با ۱۱۲۰نانو گرم در میلی لیتر اعلام نموده اند. میانگین تعداد سلول‌های سوماتیک در نمونه‌های مذکور Cells/mL ۲۱۸۰۰۰ و در نمونه‌های فاقد آمیلوئید A، Cells/mL ۱۲۷۰۰۰گزارش شده است (۴).

پیش از آن محققین یاد شده در سال ۲۰۰۷ میانگین غلظت آمیلوئید A را در نمونه‌های مثبت شیر مخزن دامداری ۲ میلی گرم در لیتربرابر با ۲۰۰۰ نانو گرم در میلی لیتر گزارش کرده بودند. میانگین تعداد سلول‌های سوماتیک در نمونه‌های شیر مخزن دامداری در این مطالعه Cells/mL ۲۶۸۸۹۶ محاسبه شده است(۲).

در مطالعه حاضر با در نظر گرفتن تعداد Cells/mL ۲۰۰۰۰۰ برای سلولهای سوماتیک، آمیلوئید A شیر مخزن دامداری در نقطه برش ng/ml ۵۵/۶۴ بالاترین حساسیت را معادل ۹۶% از خود نشان داد در حالی که ویژگی آن ۶۰% و درستی بالینی آن ۰/۹۳۷ محاسبه شد به دنبال آن اندازه‌گیری غلظت پروتئین تام، چربی تام، لاکتوز وکازئین شیر به ترتیب در ردیف‌های بعدی قرار گرفتند. همچنین با در نظر گرفتن Cells/mL ۴۰۰۰۰۰ برای سلول‌های سوماتیک که در بسیاری کشورها به عنوان نقطه برش استاندارد شیر مخزن دامداری پذیرفته شده، آمیلوئید A در نقطه برش ng/mL ۱۲۱/۰۲ بالاترین حساسیت را معادل ۹۳/۵% نشان داد درحالی که ویژگی آن ۳۰/۵% و درستی بالینی آن ۰/۷۲۳ به دست آمد و اندازه‌گیری غلظت پروتئین تام، چربی تام، لاکتوز وکازئین شیر به ترتیب در ردیف‌های بعدی قرار گرفتند.

با اطلاعات موجود، تاکنون تعیین نقطه برش آمیلوئید A شیرمخزن به منظور ارزیابی کیفی آن در مطالعه دیگری صورت نپذیرفته است تنها ویکشتروم وهمکاران در سال ۲۰۰۹ بیان داشتند سنجش غلظت سرم آمیلوئید A شیر به تنهایی یا به همراه هاپتوگلوبین برای ارزیابی کیفیت شیر مخزن دامداری به مراتب حساستر و دقیقتر از محاسبه اندیس فاز حاد آن (به کمک آلفا-لاکتالبومین، سرم آمیلوئید A شیر و هاپتوگلوبین) است(۳۲).

در این مطالعه ارتباط معنی‌داری میان غلظت آمیلوئید A شیرمخزن و تعداد سلول‌های سوماتیک آن به عنوان استاندارد فعلی ارزیابی کیفی شیر وجود داشت (P<۰/۰۰۱) به طوری که غلظت آمیلوئید A شیر به موازات شمار سلول‌های سوماتیک افزایش می‌یافت.

بدین ترتیب حضور و افزایش غلظت آمیلوئید A شیر (MAA) نه تنها می‌تواند نمایانگر وضعیت کلی گله در ارتباط با رخداد و میزان وقوع التهاب پستان (تحت بالینی) باشد بلکه به روشنی، قادر به انعکاس تغییرات نامطلوب در کیفیت و ترکیب شیر تحویل شده به صنایع و خصوصیات فرآوری آن نیز خواهد بود.

بررسی اکرشتات و همکاران در سال ۲۰۰۹ و ۲۰۰۷ بر روی شیر مخزن دامداری در راستای همین یافته بوده و محققین یاد شده طی بررسی دیگری در سال ۲۰۰۸ بر روی شیر مخلوط و کارتیه به نتایج مشابهی دست یافته و به وجود ارتباطی معنی‌دار بین غلظت آمیلوئید A، تعداد سلول‌های سوماتیک و بروز تغییرات نامطلوب در ترکیب و کیفیت شیر به دنبال رخداد تغییرات التهابی در پستان اشاره دارند(۱،۳،۴).

بری و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵ طی مطالعه‌ای بر روی کیفیت شیر به وجود ارتباط معنی‌دار میان غلظت ایزوفرم پستانی آمیلوئید A (MAA) و شمار سلول‌های سوماتیک شیرمخلوط، توجه نشان داده اند(۶).

همچنان که اوماهونی و همکاران در سال ۲۰۰۶ به همبستگی میان آمیلوئید A شیر و شمار سلول‌های سوماتیک درسطح شیر مخلوط کارتیه‌ها اشاره می‌کنند(۲۵).

لیندمارک و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بررسی نمونه‌های شیر کارتیه افزایش سطح آمیلوئید A را با افزایش تعداد سلولهای سوماتیک مرتبط دانسته‌اند و آمیلوئید A شیر را نمایانگر تعداد سلول‌های سوماتیک به شمار می‌آورند(۱۹).

در این مطالعه بین میانگین غلظت پروتئین تام شیرهای سالم و آلوده مخزن اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت. یافته مذکور با نتایج بررسی‌های دیگر محققان مطابقت دارد (P>۰/۰۵).

تنها با در نظر گرفتن تعداد Cells/mL ۲۰۰۰۰۰ برای سلول‌های سوماتیک، بین میانگین غلظت پروتئین تام شیرهای آلوده و سالم مخزن اختلاف آماری معنی‌داری ملاحظه شد(P<۰/۰۰۶) همچنین درستی بالینی برای پروتئین تام شیر در این نقطه برش ۰/۷۵۷ محاسبه گردید که بر اساس تعریف گاردنر مقدار متوسطی است.

در مطالعه حاضر، غلظت پروتئین تام شیر مخزن دامداری نمونه‌های آلوده بیش از نمونه‌های سالم بود در توضیح این یافته باید دانست غلظت پروتئین تام شیر در شرایط گوناگون می‌تواند بسیار متغیر باشد.

نتایج مطالعات مونرو و همکاران در سال۱۹۸۴ اورخ وهمکاران در سال ۱۹۹۹ پیورالا و همکاران در سال۲۰۰۳ و اکرشتات و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی شیر مخزن دامداری نشان داد مقدار پروتئین تام شیر می‌تواند به علت افزایش غلظت برخی پروتئین‌های سرمی متعاقب التهاب پستان ثابت مانده و حتی در مواردی نیز افزایش یابد تا همچنان تغییرات نامطلوب کیفی شیر از نظرها پوشیده بماند(۴،۲۱،۲۷،۳۰)

بر این اساس پروتئین تام نمی تواند شاخصی مفید درارزیابی کیفیت شیر ولو در ارتباط با ارزش کیفی پروتئین‌های آن شمرده شود زیرا که به اندازه کافی در نمایاندن تغییرات نامطلوب کیفی شیر حساس نیست هر چند کاربرد فعلی آن برای ارزیابی کیفی و تعیین بهای شیر گسترده باشد.

در بررسی حاضر، همبستگی معنی‌داری میان غلظت آمیلوئید A شیر مخزن دامداری و مقدار پروتئین تام آن مشاهده شد یافته مذکور می‌تواند به معنای اهمیت اندازه‌گیری آمیلوئید A شیر مخزن دامداری به منظور ارزیابی کیفیت پروتئینی آن باشد(P<۰/۰۵) و (جدول ۹).

اکرشتات و همکاران در سال ۲۰۰۷ و۲۰۰۹ بر روی شیر مخزن دامداری اظهار داشتند میان غلظت هاپتوگلوبین و آمیلوئید A شیر با مقدار پروتئین تام آن رابطه معنا داری وجود ندارد(P>۰/۰۵)،(۱،۴).

علت را می‌توان در شدت پاسخ فاز حاد و ترشح هر چه بیشتر ایزوفرم پستانی آمیلوئید A به شیر، نشت میزان بیشتری از پروتئین‌های سرم به درون شیرمتعاقب وقوع التهاب جست به علاوه نقش عواملی چون اختلاط شیر حاصل از کارتیه‌های سالم و بیمار طی دوشش‌های مختلف درون مخازن، تفاوت در شدت بیماری زایی و نوع عوامل مسبب ورم پستان تحت بالینی در گله و سطح مدیریتی آن، مدت زمان ذخیره و نگهداری شیر در مخزن قبل و بعد از تحویل آن به کارخانه‌های شیر و شدت و مدت روند پروتئولیز متعاقب آن را نباید از نظر دور داشت(۱۶،۱۷).

بررسی حاضر نشان داد میان تعداد سلول‌های سوماتیک شیر مخزن دامداری و پروتئین تام شیر همبستگی معناداری وجود ندارد. یافته مذکور با نتایج مطالعات دیگر محققان همخوانی دارد (P>۰/۰۵) و(جدول ۹).

اورخ و همکاران در سال ۱۹۹۹ و اکرشتات و همکاران در سال ۲۰۰۸ و در مطالعه خود بر روی شیر مخزن دامداری ۲۰۰۹بیان داشتند ارتباط معنی‌داری میان پروتئین تام شیر و

تعداد سلول‌های سوماتیک وجود ندارد(۳،۴،۳۰).

لایتنر و همکاران در سال‌های ۲۰۰۶ و ۲۰۰۸ همبستگی شمارش سلول‌های سوماتیک را با کیفیت پروتئین‌های شیر ضعیف دانسته‌اند و از همین روی ارزش شمارش سلول‌های سوماتیک را جهت ارزیابی کیفی شیر مورد تردید جدی قرار داده اند(۱۶،۱۷).

تنها ویکشتروم و همکاران در سال ۲۰۰۹ عقیده دارند افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک با کاهش پروتئین تام شیر مخزن دامداری همراه بوده و دلیل آن را درشدت یافتن پروتئولیز می‌دانند(۳۲).

در این بررسی، بین میانگین درصد کازئین در شیرهای سالم وآلوده مخزن اختلاف آماری معنی‌داری دیده نشد (P>۰/۰۵). همچنین همبستگی معنی‌داری میان غلظت آمیلوئید A شیر مخزن دامداری و کازئین آن مشاهده شد. در این تحقیق وجود مقادیر قابل اندازه‌گیری آمیلوئید A شیر با کاهش محتوای کازئین همراه بود که به روشنی نشان می‌دهد حضور آمیلوئید A در شیر مخزن دامداری نمایانگر وقوع تغییرات نامطلوب در ترکیب و کیفیت پروتئین‌های آن است(جدول ۹).

بررسی اکرشتات و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی کیفیت شیر مخزن دامداری نشان داد در نمونه‌های حاوی مقادیر قابل اندازه‌گیری آمیلوئید A عدد کازئین کاهش می‌یابد پیش از آن نامبردگان در سال ۲۰۰۸ در مطالعه خود بر روی کیفیت شیر مخلوط به نتیجه مشابهی دست یافته بودند(۱،۳،۴).

لورو وهمکاران در سال ۲۰۰۳ لایتنر و همکاران در سال۲۰۰۸ علت کاهش محتوای کازئین شیر گاوان مبتلا به ورم پستان را پدیده پروتئولیز می‌دانند روندی که حتی در مخازن نگهداری شیر در گاوداری‌ها و سیلوهای ذخیره آن در صنایع شیر ادامه می‌یابد(۱۷،۱۸)

دلیل وقوع و ادامه پروتئولیز در شیرمخزن حتی پس از ذخیره و فرآوری آن به شکل فراورده‌های لبنی، فعالیت آنزیم‌هایی چون پلاسمین، کاتپسین وپروتئازهای مقاوم به حرارت ترشح شده از باکتری‌های سرمادوست (Psychrotrophs) و پاتوژن موجود در شیر است که به هیدرولیز کازئین به پپتیدهای کوچکتر می‌انجامد(۳).

علی رغم این که در مطالعه حاضر با افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک، مقدار کازئین شیر مخزن دامداری کاهش می‌یافت اما میان این دو همبستگی معنی‌داری دیده نشد(P>۰/۰۵). یافته مذکور با نتایج بررسی‌های اورخ و همکاران در سال ۱۹۹۹ و اکرشتات و همکاران در سال ۲۰۰۸ و ۲۰۰۹ همخوانی دارد. این محققان اظهار می‌دارند که ارتباط معنی‌داری میان کازئین شیر و تعداد سلول‌های سوماتیک وجود ندارد(۳،۴،۳۰).

تنها ویکشتروم و همکاران در سال ۲۰۰۹ افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک را با کاهش مقدار کازئین شیر مخزن دامداری مرتبط دانسته اند. نامبردگان علت را در تشدید فرایند پروتئولیز شیر به دنبال افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک می‌دانند(۳۲).

همان طور که پیش از این اشاره شد مداخله عواملی مانند اختلاط شیر حاصل از کارتیه‌های سالم و بیمار طی دوشش‌های مختلف درون مخازن، عوامل متنوع محیطی و فیزیولوژیک موثر بر تعداد سلول‌های سوماتیک، تفاوت در شدت بیماری زایی و نوع عوامل مسبب ورم پستان تحت بالینی در گله و سطح مدیریتی آن، مدت زمان ذخیره و نگهداری شیر در مخزن قبل و بعد از تحویل آن به کارخانه‌های شیر و شدت و مدت روند پروتئولیز متعاقب آن را در توضیح دلایل این اختلاف موثر دانست.

بین میانگین غلظت چربی تام شیرهای سالم و آلوده مخزن اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵).یافته مذکور با نتایج بررسی‌های دیگر محققان مطابقت دارد. بررسی حاضر نشان داد میان غلظت آمیلوئید A مخزن و چربی تام آن همبستگی معناداری وجود ندارد. یافته مذکور با نتایج معدود مطالعات انجام شده در این زمینه همخوانی دارد(۳،۴).

در مطالعه حاضر میان تعداد سلول‌های سوماتیک و چربی تام شیر رابطه معنی‌داری ملاحظه نگردید. یافته مذکور با نتایج بررسیهای دیگر محققان همخوانی دارد(۳،۴،۳۰).

بین میانگین غلظت لاکتوز شیرهای سالم و آلوده مخزن اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵).

بررسی حاضر نشان داد میان غلظت آمیلوئید A شیر مخزن دامداری و لاکتوز آن همبستگی معناداری وجود ندارد (P>۰/۰۵) و (جدول ۹). در حالی که مطالعه اکرشتات و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داده بود که در نمونه‌های شیر مخزن دامداری حاوی مقادیر قابل اندازه‌گیری آمیلوئید A میزان لاکتوز کمتری وجود دارد(۴).

همان طور که قبلا در خصوص پروتئین تام و کازئین اشاره شدعلت چنین تفاوت‌های را در میان عواملی چون اختلاط شیرهای سالم و عفونی را پس از دوشش‌های مختلف در مخازن جمع آوری شیر دانست(۱۶).

البته لازم به یاد آوریست که استفاده از لاکتوز در سطح شیر مخزن دامداری هرگز به اندازه کافی ویژه و حساس نبوده تا به عنوان شاخص کیفیت بکار گرفته شود(۳)..

علی رغم این که در مطالعه حاضر با افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک، مقدار لاکتوز شیر مخزن دامداری کاهش می‌یافت اما میان این دو همبستگی معنی‌داری دیده نشد.

یافته مذکور با نتایج بررسیهای دیگر محققان همخوانی دارد (جدول ۹)

در حالی که تنها ویکشتروم و همکاران در سال ۲۰۰۹ به ارتباط افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک و کاهش محتوای لاکتوز شیر مخزن دامداری اشاره می‌کنند(۳۲).

مطالعه حاضر نشان داد با در نظر گرفتن تعداد ۲۰۰۰۰۰ Cells/mL برای سلول‌های سوماتیک، اندازه‌گیری غلظت آمیلوئید A شیرمخزن در این نقطه برش می‌تواند یکی از دقیق ترین آزمایش‌های غربالگر به منظور ارزیابی کیفی شیر باشد در حالی که نقاط برش بالاتر سلول‌های سوماتیک علی رغم بالا بودن حساسیت (بیش از ۹۰%) درستی بالینی متوسطی (۰/۷۲۳-۰/۷) برای اندازه‌گیری آمیلوئید A شیر مخزن دامداری به دست آمد. در این صورت به نظر می‌رسد دست کم بتوان از آمیلوئید A شیر مخزن دامداری در کنار شمارش سلول‌های سوماتیک بهره جست.

به علاوه در این مطالعه اندازه‌گیری آمیلوئید A ارتباط معنی‌داری را با پروتئین تام و کازئین شیر مخزن دامداری از خود نشان داد (P>۰/۰۵) که می‌تواند بیانگر ارزش بالقوه آن درارزیابی کیفی پروتئین‌های شیر باشد.

براساس اطلاعات موجود به نظر می‌رسد نه تنها مطالعات انجام شده در خصوص ارزش پروتئین‌های فاز حاد به عنوان شاخص کیفیت شیر انگشت شمارند بلکه تاکنون هیچ‌گونه پژوهش مستندی در مورد تعیین نقطه برش آمیلوئید A شیر مخزن دامداری به منظور ارزیابی کیفیت آن صورت نگرفته و از این لحاظ بررسی حاضر در نوع خود اولین است.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نگارنده بر خود لازم می‌داند تا مراتب سپاس و قدردانی خود را از همکاری بیدریغ شرکت پگاه تهران و مسئولین محترم آن به ویژه آقایان دکتر دانشی، مهندس سالاریه و مهندس رضایی ابراز نماید.

Refrences

1. Åkerstedt, M. Bovine acute phase proteins in milk. Doctoral thesis. Swedish University of agricultural sciences.Uppsala. Sweden. 2008.

2. Åkerstedt, M., Persson Waller, K. Sternesjö, Å. Haptoglobin and serum amyloid A in relation to the somatic cell count in quarter, cow composite and bulk tank milk samples. Journal of dairy research.2007. 74: 198-203

3. Åkerstedt, M., Persson Waller, K., Bach Larsen L., Forsbäck, L. & Sternesjö, Å.. Relationship between haptoglobin and serum amyloid A in milk and milk quality. International dairy journal.2008;18:669-674.

4. Åkerstedt, M., Persson Waller, K. Sternesjö, Å Haptoglobin and serum amyloid A in bulk tank milk and in relation to raw milk quality. Journal of dairy research.2009. 76: 483-489.

5. Auldist, M. J., Coats, S., Rogers, G. L., & McDowell, G. H. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. Australian Journal of Dairy Technology.1995; 35: 427–436.

6. Berry, E., Hillerton, J.E. & Torgerson, P. Why measure acute phase proteins in mastitis. National Mastitis Council (NMC) 45th Annual Meetings Proceedings 2006, Tampa, Florida, pp. 103-108.

7.Eckersall PD., Bell R.Acute phase proteins: biomarkers of infection &inflammation in veterinary medicine.The veterinary journal.2010;185:23-27

8. Eckersall, P. D., Young, F. J., Nolan, A. M., Knight, C. H., McComb, C.,Waterston , M. M., et al. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of Staphylococcus aureus subclinical mastitis. Journal of Dairy Science.2006; 89:1488–1501.

9. Eckersall, P.D., Young, F.J., McComb, C., Hogarth, C.J., Safi, S., Weber, A., McDonald, T., Nolan, A.M. & Fitzpatrick, J.L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. Veterinary Record.2001; 148:35-41.

10. Gardner, I.A., Greitner M. Receiver-operating characteristic curves and likelihood ratios: improvement over traditional method for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. Veterinary clinical pathology.2006; 35: 8-17.

11. Grönlund, U., Halle´n Sandgren, C., & Persson Waller, K. Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis. Veterinary Research. 2005 ;36: 191–198.

12. Harmon, R. J. Symposium: Mastitis and genetic evaluation for somatic cell count—Physiology of mastitis and factors affecting
somatic cell counts.. Journal of Dairy Science.1994; 77: 2103–2112.

13. Horadagoda, N.U., Knox, K.M.G., Gibbs, H.A., Reid, S.W.J., Horadagoda, A., Edwards S.E.R. & Eckersall, P.D. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. Veterinary Record.1999; *144*: 437-441.

14. Kitchen, B. J. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. Journal of Dairy Research.1981 ; 48: 167-188.

15. Kováč, G., Popelková, M., Tkáčiková, L., Burdová, O. & Ihnát, O. Interrelationship between somatic cell count and acute phase proteins in serum and milk of dairy cows. Acta Veterinaria Brno.2007; 76: 51-57.

16. Leitner, G., Silanikove, N., Jacobi, S., Weisblit, L., Bernstein, S., & Merin,U. (2008). The influence of storage on the farm and in dairy silos on milk quality for cheese production. International Dairy Journal, 18,109–113.

17. Leitner, G., Krifucks, O., Merin, U., Lavi, Y., & Silanikove, N. Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physicochemical properties of bovine milk. International Dairy Journal. 2006;16: 648–654.

18. Le Roux Y., Laurent F., Moussaaoui F. Polymorphonuclear Proteolytic activity and milk composition change. Veterinary Reaserch. 2003;34:629-645.

19. Lindmark-Månsson, H., Bränning, C., Aldén, G. & Paulsson, M. Relationship between somatic cell count, individual leukocyte populations and milk components in bovine udder quarter milk. International Dairy Journal2006; 16: 717-727.

20. Ma, Y., Ryan, C., Barbano, D.M., Galton, D.M., Rudan, M.A. & Boor, K.J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science.*2000; *83*: 264-274.

21. Munro, G. L., Grieve, P. A., & Kitchen, B. J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. Australian Journal of Dairy Technology.1984;39: 7–16.

22. Murata, H., Shimada, N., & Yoshioka, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. Veterinary Journal. 2004; 168: 28–40.

23. Nielsen, N.I., Larsen, T., Bjerring, M. & Ingvartsen, K.L. Quarter health, milking interval, and sampling time during milking affect the concentration of milk constituents. Journal of Dairy Science. 2005; 83: 3186-3200.

24. Nielsen, B. H., Jacobsen, S., Andersen P. H., Niewold, T. A. & Heegaard P.M.H. Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. Veterinary Record.2004; 154, 361-365

25. O'Mahony, M.C., Healy, A.M., Harte, D., Walshe, K.G., Torgerson P.R. & Doherty, M.L. Milk amyloid A: Correlation with cellular indices of mammary inflammation in cows with normal and raised serum amyloid A. Research in Veterinary Science. 2006; 80: 155-161.

26. Pedersen, L.H., Aalbaek, B., Rontved, C.M., Ingvartsen, K.L., Sorensen, N.S., Heegard, P.M.H. & Jensen, H.E. Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to Streptococcus uberis. Journal of comparative pathology.2003;128: 156-164.

27. Pyörälä, S., Hänninen, S., Hovinen, M., Fotzpatrick, J.L. & Eckersall, P.D. 2006. *Acute phase proteins in bovine milk in mastitis* caused by different pathogens. In: Proceedings of the 6th European Colloquium on acute phase proteins. 24-25 August. The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark.

28. Santos, M.V., Ma, Y., Barbano, D.M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. Journal of Dairy Science. 2003; 86: 2491-2503.

29. Sorensen, N.S., Pedersen, L.H., Jensen. H.E., Rontved. C.M., Ingvarsten. K.L., Heegard. P.M.H. Serum Amyloid A in serum and milk after experimental mammary gland infection of cows with streptococcus uberis. In: third European Colloquim on Acute Phase Proteins, 23-25 May, Doorn, Netherland.

30. Urech, E., Puhan, Z. & Schallibäum, M. Changes in milk fraction as affected by subclinical mastitis. Journal of Dairy Science. 1999; 82: 2402-2411

31. Westermark, P., Johnson, K.H., Westermark, G.T., Sletten, K. & Hayden, D.W. Bovine amyloid protein AA: Isolation and amino acid sequence analysis. Comparative Biochemistry and Physiology part B: Biochemistry & Molecular Biology. 1986; 85: 609-614.

32. Wickstrom, E. New markers of bulk tank quality in relation to mastitis. Licenciate thesis. Swedish university of agricultural sciences. Uppsala. Sweden. 2009.