JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره سوم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۱

صفحات ۷۳-۶۳

تعیین ارزش تشخیصی سرم آمیلوئید A، هاپتوگلوبین و برخی پارامترهای هماتولوژیک درارزیابی سلامت اسب

سید محمود مرتضوی[1*]، شهاب الدین صافی[2]، سید حامد شیرازی بهشتی ها[3]، وحید ربانی[1]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، کرج، ایران

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

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

***نویسنده مسئول:** mahmoodmortazavi@gmail.com

چکیده

پروتئینهای مرحله حاد دسته ای از پروتئینهای سرم هستند که غلظت آنها در پاسخ به عفونت، التهاب، تروما و نئوپلازی به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. هاپتوگلوبین و سرم آمیلوئید A به عنوان دو پروتئین اصلی مرحله حاد مثبت در اسب شناخته شده است. از آنجائی که در اسبداری ها، شناسائی دام سالم از بیمار حائزاهمیت فراوان است، این مطالعه جهت تعیین ارزش تشخیصی پروتئین‌های مرحله حاد به عنوان بیومارکرهای حساس و مقایسه آن با برخی پارامترهای هماتولوژیک در تفکیک اسب‌های بیمار از سالم با هدف استفاده از فاکتورهای با حساسیت و ویژگی بالا در بررسی‌های فارمی طرح‌ریزی شد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، سطح سرمی هاپتوگلوبین و آمیلوئید A در گروه بیمار نسبت به گروه سالم افزایش کاملا معناداری به لحاظ آماری نشان داد. با در نظرگرفتن منحنی راک، نقطه برش هاپتو گلوبین و سرم آمیلوئید A به ترتیب ۸۲۹/. و ۰/۶ نانوگرم در دسی لیتر و حساسیت و ویژگی آن‌ها در نقاط برش مذکور به ترتیب، برای هاپتوگلوبین ۸۶% و ۸۷% و آمیلوئید A ۸۴% و ۷۳% به دست آمد. به علاوه درستی بالینی هاپتوگلوبین و آمیلوئید A سرم بر اساس سطح زیر منحنی راک به ترتیب ۰/۹۰۷، ۸۹۱/ به دست آمد. از طرفی تفاوت معناداری بین درستی بالینی هاپتوگلوبین و آمیلوئید A سرم خون مشاهده نشد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که از هاپتو گلوبین و سرم آمیلوئید A، می‌توان به عنوان یک آزمون غربالگر جهت جدا سازی اسب‌های بیمار از سالم در سطح فارم بهره جست.

واژه‌های کلیدی: پروتئین‌های فاز حاد، بیومارکر، آمیلوئید A، هاپتوگلوبین، اسب

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 3(2)63-73, 2012

Determination of the diagnostic value of serum amyloid A, haptoglobin and some hematologic parameters in assessment of horse health

Mortazavi, S.M.[1*], Safi, S.[2] , Shirazi-Beheshtiha, S.H.[3], Rabbani, V[1]

1- Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

2- Department of Clinical Pathology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3-Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

**** Corresponding author:*** mahmoodmortazavi@gmail.com

Abstract

Acute Phase Proteins (APPs) are a class of serum proteins whose their concentration increase remarkably in response to infections, inflammation, trauma, neoplasia and etc. Haptoglobin (HPt) and Serum Amyloid A (SAA) are two major APPs in horse. Since , in farms, differentiation between healthy and sick horse is so important, the present study was designed to determine the diagnostic value of APPs as sensitive biomarkers, and compare it with hematologic parameters for differentiation of healthy and sick horses in farm. According to the results of the present study, increase in the median of HPt and SAA was significant. With regard to the ROC curve, cutoff point of HPt and SAA was 0.829 and 0.6 ng/dl respectively and sensitivity and specificity in their cut off point was 86%, 87% for Hpt and 84 % ,73% for SAA. In addition, Clinical Accuracy of HPt and SAA, base of area under the curve, was 0907, 0.891 respectively. In other hand , Significant difference between the clinical accuracy of HPt and SAA has not be seen. Results of the present study show that HPt and SAA measurement can be used as a screening test to determine health status in horse.

Key words: Serum Amyloid A, Haptoglobin, Horse, health

مقدمه

یکی از مهمترین مشکلات پیش رو در حرفه دامپزشکی تشخیص به موقع و سریع بیماری‌ها پیش از بروز علایم بالینی می‌باشد. به همین جهت بهره گیری از بیومارکرهای مختلف با حساسیت و ویژگی بالا در تشخیص دام‌های سالم از بیمار بسیار حائز اهمیت است. در این خصوص استفاده از پروتئین‌های فاز حاد و بررسی تغییرات غلظت آن‌ها تحت تاثیر پاسخ مرحله حاد ناشی از بیماری‌های مختلف از اهمیت بسزایی برخوردار است. پاسخ مرحله حاد با یکسری از علائم عمومی مثل تب، لوکوسیتوز، افزایش غلظت کورتیزول خون، کاهش غلظت تیروکسین و تغییرات متابولیسمی در بدن همراه است. به علاوه افزایش (پروتئین فاز حاد مثبت) یا کاهش (پروتئین فاز حاد منفی) در غلظت پروتئین‌های خاصی در پلاسما که تحت عنوان پروتئین‌های مرحله حاد شناخته می‌شوند نیز دیده می‌شود (۷).

پاسخ مرحله حاد با واسطه مدیاتورهای پروتئینی که سیتوکین نامیده می‌شوند ایجاد می‌شود. این سیتوکین‌ها به عنوان یک پیام آور بین محل ضایعه و سلول‌های کبدی به عنوان محل تولید پروتئین‌های مرحله حاد عمل می‌نمایند. بیشتر سیتوکین‌ها دارای منابع تولید، اهداف و اعمال متفاوت می‌باشند (۶).سیتوکین‌های پیش التهابی (اینترلوکین‌های یک و شش و عامل تومور نکروزیس آلفا) توسط مونوسیت هایی که خود بوسیله سموم باکتری‌ها و یا در پاسخ به آسیب‌های موضعی بافتی تحریک شده اند، ترشح می‌شوند (۲۳، ۲۰، ۳۲). این سیتوکین‌ها طی چندین مسیر مشترک با یکدیگر همکاری داشته و اثر منطقه ای خود را برروی سلول‌های اطراف محل آسیب دیده و یا اثر سیستمیک را از طریق خون برروی ارگانهای هدف اعمال می‌نمایند(۱، ۲۸،۲۳). در طی پاسخ مرحله حاد، غلظت سرمی پروتئین‌های مرحله حاد به طور واضحی افزایش پیدا می‌کند. این پروتئین‌ها دسته‌ای ازپروتئین‌های خون هستند که متعاقب برخورد حیوان با شرایطی چون عفونت، التهاب، استرس، تومور، جراحی و سوختگی افزایش می‌یابند. این پروتئین‌ها اغلب توسط کبد ساخته شده و یک پاسخ ایمنی غیر اختصاصی جهت محدود سازی جراحات، بر قراری هموستاز و همچنین دفاع بدن در برابر هجوم عوامل میکروبی قبل از هر گونه واکنش دفاعی در بدن را به وجود می‌آورند (۱۹،۳).

پروتئین‌های مرحله حاد بر اساس غلظتشان در خون در خلال مرحله حاد به دو دسته تقسیم بندی می‌شوند: ۱- پروتئین‌های مثبت مرحله حاد که میزانشان در خلال مرحله حاد افزایش می‌یابد. این پروتئین‌ها شامل هاپتوگلوبین، سرم آمیلوئید A، پروتئین واکنشی C، سرولوپلاسمین، فیبرینوژن و آلفا یک اسید گلیکوپروتئین می‌باشد. ۲- پروتئین‌های منفی مرحله حاد که میزانشان در خلال مرحله حاد کاهش می‌یابد مثل آلبومین و ترانسفرین (۱۹، ۲۳، ۲۷). پاسخ مرحله حاد و افزایش پروتئین‌های مرحله حاد بر حسب گونه‌های مختلف حیوانی اختصاصی می‌باشد و میزان آلبومین در اکثر گونه‌ها بین ۱۰ تا ۳۰ درصد کاهش نشان می‌دهد (۲۳). معمولا به دنبال التهاب، پاسخ هاپتوگلوبین نسبت به سرم آمیلوئید A از حساسیت کمتری برخوردار است، به طوری که افزایش هاپتوگلوبین نسبت به میزان پایه، کمتر از سرم آمیلوئید A می‌باشد. اغلب، میزان طبیعی و پایه سرم آمیلوئید A در مرز غیر قابل اندازه گیری قرار داشته لذا با وجود افزایش غلظت سرمی، این پروتئین نسبت به هاپتوگلوبین، از اهمیت کمتری برخوردار است (۶). پاسخ مرحله حاد تا چندین روز پس از تحریک قابل تشخیص می‌باشد، لیکن میزان پاسخ به گونه حیوانی و وسعت آسیب بافتی بستگی دارد. چنین به نظر می‌رسد که پاسخ مرحله حاد، بخشی از پاسخ عمومی بدن به آسیب بافتی است(۲۳).

نکته قابل توجه آن که،ایجاد تب و خواب با طول موج کوتاه متعاقب پاسخ مرحله حاد برای مواجهه فرد با استرس‌های فیزیکی و مقابله با میکروارگانیسم‌ها مفید است(۲۳). از آنجایی که می‌توان از پروتئین‌های مرحله حاد در ارزیابی سلامت حیوان استفاده نمود، امروزه کاربرد پروتئین‌های

مرحله حاد به میزان زیادی مورد توجه قرار گرفته است(۲). به دلیل نیمه عمر کوتاه این پروتئین‌ها در سرم و همچنین پاسخ فراوان مرحله حاد در حیوانات بیمار، اندازه گیری پروتئین‌های مرحله حاد به عنوان شاخصی قابل اعتماد برای پاسخ عمومی بدن به شروع تحریک درزمان خونگیری می‌باشد (۲۳).

پروتئین‌های مرحله حاد می‌تواند به عنوان یک شاخص غیر اختصاصی در شناسایی امراض بالینی و تحت بالینی بکار رود(۸، ۲۴، ۲۳). علاوه بر این می‌توان از آنها جهت تفریق ضایعات حاد و مزمن (۹)، به منظور پیش گویی روند بیماری و یا بررسی شدت بیماری (۱۰،۲۱،۲۶) و همچنین بررسی اثرات درمانی استفاده نمود(۱۲،۱۱).

از اندازه گیری پروتئین‌های مرحله حاد در سطح گله می‌توان جهت بررسی وضعیت شیوع بیماری در (گروه سنی خاص، بخشی ازسیستم تولید و...) استفاده نمود. به طوریکه از بالابودن غلظت سرمی نوع خاصی از پروتئین مرحله حاد، جهت بررسی شیوع عفونت‌های بالینی و تحت بالینی استفاده می‌شود (۲۴). تاکنون مطالعات بسیاری بر روی پروتئین‌های فاز حاد صورت گرفته است ولی تاکنون مطالعه‌ای بر روی تعیین ارزش تشخیصی این پروتئین‌ها در اسب صورت نگرفته است که در این مطالعه بدان پرداخته می‌شود.

مواد و روش کار

به منظور انجام این مطالعه، از تعداد ۶۸ رأس اسب ازاسبداری‌های اطراف استان تهران نمونه گیری شد. پیش از نمونه گیری، اسب‌های مورد مطالعه توسط یک کلینیسین ماهر در زمینه طب اسب تحت معاینات بالینی قرارگرفتند. براساس معاینات بالینی و همین طور بهره گیری از نتایج پاراکلینیک، نظیر آزمایش‌های کلینیکال پاتولوزی، سونوگرافی و رادیولوژی، ۲۳ راس اسب سالم و ۴۵ راس اسب بیمار شناسایی شدند.

نمونه‌های خون پس از جمع آوری، هر یک به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) انتقال داده شد. پلاسمای مربوط به هر نمونه بلافاصله توسط سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ در دقیقه و طی مدت ۱۰ دقیقه جدا و جهت انجام آزمایش هاپتوگلوبین و سرم آمیلوئید A در میکروتیوب‌های جداگانه و در فریزر ۲۰ – درجه سانتیگراد نگهداری شد.

سنجش سرم آمیلوئید A به روش الایزا و با استفاده از کیت ساخت شرکت (Tridelta ltd) کشور ایرلند و سنجش هاپتوگلوبین سرم نیز با استفاده از کیت بیوشیمیایی ساخت همان شرکت و با استفاده از دستگاه تجزیه گر خودکار انجام گرفت. اندازه گیری آلبومین به روش برموکرزول گرین و با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون، اندازه گیری پروتئین تام به روش بیوره و با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و اندازه گیری فیبرینوژن به وسیله رسوب حرارتی و دستگاه انکسارسنج انجام گرفت.

شمارش سلول‌های خونی با استفاده دستگاه (EXIGO) مدل (VET) صورت پذیرفت. به منظور اطمینان از صحت عملکرد دستگاه پیش از انجام شمارش، از خون کنترل مربوط به دستگاه استفاده شد و جهت بررسی دقت دستگاه به صورت رندوم نمونه‌های دوپلیکیت به دستگاه داده شد. شمارش تفریقی گلوبول‌های سفید نیز به روش دستی انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج تحقیق حاضر به کمک نرم افزار آماری (SPSS) ویرایش شانزدهم انجام گرفت. در ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف یک نمونه‌ای مشخص گردید که توزیع داده‌ها نرمال نیست. سپس به منظور مقایسه داده‌های مورد مطالعه بین گروه سالم و بیمار از آزمون من – ویتنی استفاده شد. سپس به منظور تعیین درستی بالینی، حساسیت و ویژگی پارامترهای مورد مطالعه از منحنی راک استفاده شد. در نهایت به منظور تعیین اختلاف آماری میان درستی بالینی در پارامترهای مختلف با یکدیگر از آزمون مک نمار استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از آمار توصیفی مطالعه در اسب‌های سالم و بیمار بدون توجه به نوع بیماری در جدول شماره ۱ آمده است.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که افزایش کاملا معناداری در میانه غلظت پروتئین تام، آمیلوئید A و هاپتوگلوبین سرم خون اسب‌های بیمار نسبت به اسب‌های سالم (p<۰/۰۱) وجود دارد. غلظت آلبومین سرم خون کاهش نشان داد ولی این کاهش به لحاظ آماری معنادار نبود (p<۰/۰۵). افزایش معناداری در (PCV)، تعداد مطلق ائوزینوفیل، تعداد مطلق مونوسیت و متامیلوسیت و کاهش معناداری در تعداد مطلق لنفوسیت، غلظت هموگلوبین، (MCV) و (MCHC) در اسب‌های بیمار نسبت به سالم وجود دارد (p>۰/۰۱). تغییر معناداری در دیگر پارامترهای مورد مطالعه مشاهده نشد.

نقطه برش، حساسیت، ویژگی، مثبت و منفی کاذب و درستی بالینی (سطح زیر منحنی) غلظت آمیلوئید A سرم خون، آلبومین، هاپتوگلوبین، پروتئین تام و تعداد مطلق گلبول‌های سفید تعداد مطلق گلبول‌های قرمز خون، نوتروفیل، لنفوسیت، ائوزینوفیل و بند سل در تشخیص اسب‌های بیمار بدون توجه به نوع بیماری در جدول شماره ۲ آمده است.

غلظت پروتئین تام سرم خون در نقطه برش g/dl ۳/۸۵، آلبومین در نقطه برش g/dl ۵/۸۵، گلبول‌های سفید در نقطه برش۱۰۳× ۶/۳۵، گلبول‌های قرمز در نقطه برش۱۰۶× ۸/۵، تعداد مطلق نوتروفیل در نقطه برش Cells/µl ۳۲۳۰، تعداد مطلق لنفوسیت در نقطه برش Cells/µl ۳۰۴۲، تعداد مطلق ائوزینوفیل در نقطه برش Cells/µl ۱۱۵، بند سل در نقطه برش Cells/µl ۱۱۰، آمیلوئید A سرم خون در نقطه برش ng/dl ۰/۶ و هاپتوگلوبین در نقطه برش ng/dl ۸۲۹ بیشترین درستی بالینی را در تفکیک اسب‌های سالم از بیمار نشان دادند.

بر اساس نتایج حاصل از علایم بالینی و نتایج رادیوگراف به عنوان استاندارد طلایی تشخیص بیماری، بیشترین حساسیت (Se=۸۶/۷%) و ویژگی (SP=۸۷%) مربوط به اندازه گیری غلظت هاپتوگلوبین می‌باشد از لحاظ حساسیت، اندازه گیری غلظت آمیلوئید A سرم خون،پروتئین تام، آلبومین، تعداد گلبول‌های قرمز، تعداد مطلق ائوزینوفیل‌ها و از لحاظ ویژگی، اندازه گیری غلظت آمیلوئید A سرم، تعداد مطلق سلول‌های بند، تعداد مطلق ائوزینوفیل‌ها و پروتئین تام سرم خون به ترتیب در ردیف‌های بعدی قرار می‌گیرند. از نظر درستی بالینی، بیشترین درستی بالینی، بر پایه سطح زیر منحنی، به ترتیب متعلق به اندازه گیری غلظت هاپتوگلوبین، آمیلوئید A سرم خون، و غلظت پروتئین تام سرم خون می‌باشد و اندازه گیری تعداد مطلق ائوزینوفیل ها، غلظت آلبومین، تعداد مطلق سلول‌های بند سرم خون در ردیف‌های بعدی قرار می‌گیرند. تفاوت معناداری به لحاظ آماری در درستی بالینی غلظت آمیلوئید A سرم خون با غلظت هاپتوگلوبین مشاهده نشد.

جدول شماره ۱-آمار توصیفی برای پارامترهای مورد اندازه گیری در اسب‌های سالم و بیمار بدون توجه به نوع بیماری

پارامتر	واحد	گروه	تعداد نمونه	میانگین ± انحراف معیار	میانه	پایین ترین و بالاترین مقدار	P-value #
آلبومین	g/dl	۱*	۲۳	۳/۸ ± ۰/۵۷	۴/۱۵	۲/۶ – ۴/۵	P > ۰/۰۵
		۲**	۴۵	۴/۱ ± ۰/۳۶	۳/۹	۳ – ۴/۹	
پروتئین تام	g/dl	۱*	۲۳	۵/۸ ± ۰/۵۳	۵/۸	۴/۱ – ۶/۶	P < ۰/۰۱
		۲**	۴۵	۶/۱ ± ۰/۴۳	۶/۱۵	۵/۲ – ۴/۷	
(PCV)	%	۱*	۲۳	۳۴/۶ ± ۱/۶	۳۴/۸	۳۱/۸ – ۳۷/۲	P < ۰/۰۱
		۲**	۴۵	۳۷/۶ ± ۵/۱	۳۸/۱	۲۰/۳ – ۴۷/۱	
هموگلوبین	g/dl	۱*	۲۳	۱۳/۲ ± ۱	۱۳/۱	۱۱/۳ – ۱۴/۸	P < ۰/۰۵
		۲**	۴۵	۱۲/۴ ± ۱/۸	۱۲/۲۵	۶/۴ – ۱۷/۱	
(MCH)	pg	۱*	۲۳	۱۵/۸ ± ۲/۵	۱۵/۸	۱۱/۵ – ۲۰/۸	P < ۰/۰۵
		۲**	۴۵	۱۴/۳ ± ۲/۳	۱۳/۴	۹/۶ – ۲۰/۳	
(MCHC)	%	۱*	۲۳	۳۷/۹ ± ۲/۹	۳۷/۵	۳۳/۴ – ۴۴/۳	P <۰/۰۰۱
		۲**	۴۵	۳۲/۵ ± ۲/۱۶	۳۲/۷	۲۲/۸ – ۳۷/۶	
تعداد مطلق ائوزینوفیل	Cells/µl	۱*	۲۳	۸۴ ± ۸۷	۷۵	۵۶ – ۳۳۰	P < ۰/۱
		۲**	۴۵	۲۴۹ ± ۲۴۶	۲۰۰	۰ – ۱۰۲۶	
تعداد مطلق لنفوسیت	Cells/ µl	۱*	۲۳	۳۱۷۴ ± ۵۴۸	۳۲۳۳	۲۱۱۲ – ۴۲۰۰	P < ۰/۰۵
		۲**	۴۵	۲۳۳۵ ± ۹۹۶	۲۵۹۵	۹۴۵ – ۵۴۵۶	
تعداد مطلق مونوسیت	Cells/ µl	۱*	۲۳	۴۱ ± ۶۹	۰	۴۴ – ۲۷۲	P < ۰/۰۵
		۲**	۴۵	۹۶ ± ۱۰۵	۶۱/۵	۰ – ۴۹۶	
تعداد مطلق متامیلوسیت	Cells/ µl	۱*	۲۳	۰	۰	۰	P < ۰/۰۵
		۲**	۴۵	۱۲ ± ۳۴	۷۹	۰ – ۱۳۲	
خونA آمیلوئید	Ng/dl	۱*	۲۳	۰/۴۷ ± ۰/۲۶	۰/۳۷	۰/۲۱ – ۱/۳	P < ۰/۰۰۱
		۲**	۴۵	۵/۱ ± ۹/۴	۰/۸۵	۰/۴۶ – ۳۳	
هاپتوگلوبین	Ng/dl	۱*	۲۳	۰/۵۷ ± ۰/۲۶	۰/۴۹	۰/۳۲ – ۱/۲	P < ۰/۰۰۱
		۲**	۴۵	۱/۶۷ ± ۰/۸	۱/۵	۰/۲۱ – ۳/۶	

* اسب‌های سالم ** اسب‌های بیمار # آزمون من-ویتنی

جدول شماره ۲- نقاط برش پیشنهادی، حساسیت، ویژگی، مثبت و منفی کاذب و سطح زیر منحنی پارامترهای مورد اندازه گیری در تشخیص اسبهای بیمار از سالم بر پایه نتایج حاصل از معاینات بالینی و نتایج رادیوگراف از اندام حرکتی (به عنوان استاندارد طلایی تشخیص بیماری)

پارامتر	واحد	حساسیت(٪)	ویژگی(٪)	منفی کاذب (٪)	مثبت کاذب (٪)	درستی بالینی (سطح زیر منحنی)*	نقطه برش
آلبومین سرم خون	g/dl	۷۳/۳	۴۷/۸	۲۶/۸	۵۲/۲	۰/۶۳۱ [a]	۳/۸۵
پروتئین تام سرم خون	g/dl	۷۵/۶	۵۶/۵	۲۴/۴	۴۳/۵	۰/۷۰۸ [a]	۵/۸۵
تعداد گلبول های سفید	Cells/ µl	۵۱/۱	۳۹/۱	۴۸/۹	۶۰/۹	۰/۴۷۰ [c]	۶/۳۵
تعداد گلبول های قرمز	Cells/ µl	۷۱/۰۱	۵۲/۲	۲۸/۹۹	۴۷/۸	۰/۵۸۵ [d]	۸/۵
تعداد مطلق نوتروفیل	Cells/ µl	۵۱/۱	۴۳/۵	۴۸/۹	۵۶/۵	۰/۴۷۳ [c]	۳۲۳۰
تعداد مطلق لنفوسیت	Cells/ µl	۴۰	۴۳/۵	۶۰	۵۶/۵	۰/۳۵۳ [e]	۳۰۴۲
تعداد مطلق ائوزینوفیل	Cells/ µl	۶۴/۴	۶۹/۶	۳۵/۶	۳۰/۴	۰/۶۹۹ [a,]	۱۱۵
تعداد مطلق سلول بند	Cells/ µl	۵۱/۱	۷۳/۹	۴۸/۹	۲۶/۱	۰/۶۱۸ [ad]	۱۱۰
Aآمیلوئید سرم	Ng/dl	۸۴/۴	۷۳/۹	۱۵/۶	۲۶/۱	۰/۸۹۱ [b]	۰/۶
هاپتوگلوبین	Ng/dl	۸۶/۷	۸۷	۲۳/۳	۱۳	۰/۹۰۷ [b]	۰/۸۲۹

* آنالیت هایی که در بالای عدد سطح زیر منحنی آنها حروف مشابه قرار گرفته است، از لحاظ آماری تفاوت معناداری با یکدیگر ندارند (با به کار گیری آزمون مک نمار با سطح اطمینان ۹۵٪)

بحث و نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، در گروه سالم وبیمار بدون توجه به نوع بیماری افزایش شدیدا معناداری در میانه غلظت پروتئین تام، آمیلوئید A و هاپتوگلوبین سرم خون اسب‌های بیمار نسبت به اسب‌های سالم (p<۰/۰۱) مشاهده شد.

بر اساس مطالعه کیسیلفسکی و همکاران در سال ۱۹۹۰ مشخص شد در موارد التهاب‌های حاد و مزمن همچنین در همولیز و ضایعات گلومرولی، بیماری‌های انگلی، آسیب‌های پوستی با افزایش سطح سرمی پروتئین تام سرم خون مواجه می‌باشیم که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارد (۳۰).

آمیلوئید A سرم خون و هاپتوگلوبین به عنوان پروتئین‌های مرحله حاد مثبت مطرح می‌باشند که آمیلوئید A سرم خون در اسب پروتئین مرحله حاد اصلی تلقی می‌گردد (۲۲).

جاکوبسن و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که غلظت آمیلوئید A سرم خون در اسب‌های مبتلا به التهابات مفصلی به طور معنا داری افزایش می‌یابد (۱۴). همچنین بر اساس مطالعه اکرسال و همکاران در سال ۱۹۹۵(۵)، تیارا و همکاران در سال ۱۹۹۹ (۲۹) و مایلز و همکاران در سال ۱۹۹۸ (۱۸) افزایش شدیدا معنا داری در غلظت آمیلوئید A سرم خون در اسب‌های مبتلا به آسیب‌های بافتی، عفونت‌های ویروسی و باکتریایی و التهاب‌ها مشاهده شد.

جاکوبسن و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که در اسب‌های مبتلا به آرتریت‌های مفصلی افزایش معنا داری در آمیلوئید A سرم خون رخ می‌دهد. (۱۴)، همچنین پولوک و همکاران در سال۲۰۰۵ (۲۵)، هولتن و همکاران در سال ۲۰۰۲ (۱۳) نشان داند که در اسب‌های مبتلا به آرتریت‌های غیر عفونی در نتیجه اعمال جراحی افزایش معنا داری در غلظت آمیلوئید A سرم خون رخ می‌دهد که این نتایج با نتایج این مطالعه همخوانی دارد.

آمیلوئید A سرم خون تک سمیان یک آپولیپوپروتئین فاز حاد می‌باشد که با افزایش چشمگیری متعاقب التهاب‌ها و آسیب‌های بافتی همراه است. تولید اولیه این پروتئین توسط هپاتوسیت‌ها در طی واکنش مرحله حاد موجب تولید چندین ایزوآنزیم سرم آمیولئید A، خاصه ایزوآنزیم (SAA3) می‌شود که در اسب‌ها به عنوان یک شاخص شناسایی بیماری مطرح می‌باشد (۱۷). در عین حال عقیده بر این است که پروتئین‌های مثبت مرحله حاد دارای کارکردهای عمومی اپسونیزاسیون و به دام انداختن میکروارگانیسم ها، فعال کردن سیستم کمپلمان، اتصال به باقیمانده‌های یاخته‌ای نظیر ذرات هسته ای، خنثی کردن آنزیم ها، پاکسازی هموگلوبین و رادیکال‌های آزاد و تنظیم پاسخ ایمنی میزبان می‌باشند. (۱۵).

تدشی و همکاران اودر سال ۲۰۰۱ گزارش کردند که غلظت هاپتوگلوبین سرم خون در نتیجه همولیزهای داخل و خارج عروقی و همین طور در عفونت‌های باکتریایی و ویروسی و التهاب‌ها در اسب با افزایش معنا داری همراه است. نتایج مذکور با نتایج حاصل از این مطالعه همخوانی دارد. (۳۱).

اعمال زیادی برای هاپتوگلوبین در نظر گرفته شده است لیکن اولین عمل هاپتوگلوبین جلوگیری از اتلاف آهن از طریق تشکیل مجموعه پایدار هاپتوگلوبین – هموگلوبین در خون است (۱۶، ۲۳).

اعتقاد بر این است که هاپتو گلوبین با محدود سازی در اختیار بودن آهن برای باکتری ها، از قدرت رشد باکتریها جلوگیری می‌کند (۴، ۲۳). برای مثال نشان داده شده که هاپتو گلوبین انسان در بررسی آزمایشگاهی از رشد استرپتو کوکوس پایوژن می‌کاهد (۲۳). دفع کلیوی هموگلوبین تا زمانی که تمام ظرفیت هاپتوگلوبین اشباع نشده باشد، اتفاق نمی افتد (۳۱). کمپلکس هاپتوگلوبین – هموگلوبین توسط سیستم رتیکولواندوتلیال کبد گرفته و در سلولهای کوپفر متابولیزه می‌شوند(۲۳).

کاهش معناداری در غلظت آلبومین سرم خون مشاهده نشد (p<۰/۰۵). کاهش غلظت آلبومین به عنوان یکی از پروتئینهای منفی مرحله حاد در خلال پاسخ مرحله حاد قابل

مشاهده است که با نتایج حاصل از این مطالعه همخوانی ندارد. این عدم همخوانی می‌تواند ناشی از شدت و مرحله التهاب و نوع و شدت واکنش مرحله حاد مرتبط باشد.

افزایش معناداری در PCV، تعداد مطلق ائوزینوفیل، تعداد مطلق مونوسیت و متامیلوسیت و کاهش معناداری در تعداد مطلق لنفوسیت، غلظت هموگلوبین، MCV و MCHC در اسب‌های بیمار نسبت به سالم مشاهده شد (p<۰/۰۱).

در مورد سلول‌های خونی افزایش معناداری در تعداد مطلق ائوزینوفیل مشاهده شد (p<۰/۰۱) که این رخداد تحت تاثیر بیماری‌های انگلی به وقوع می‌پیوندد. همچنین کاهش در تعداد مطلق لنفوسیت مشاهده شد که می‌تواند تحت تاثیر تزریق کورتیکو استروئید ها، استرس، التهاب، اندوتوکسمی و در خواست شدید بافتی می‌تواند رخ داده باشد. افزایش تعداد مطلق مونوسیت‌های خون نیز می‌تواند به دلیل استرس، التهابات حاد و مزمن باشد (p<۰/۰۵). تغییر معناداری در دیگر پارامترهای مورد مطالعه مشاهده نشد.

نتایج حاصل از آنالیز منحنی راک در گروه اسب‌های سالم و بیمار بدون توجه به نوع بیماری نشان داد که غلظت پروتئین تام سرم خون در نقطه برش g/dl ۳/۸۵، آلبومین در نقطه برش g/dl ۵/۸۵، گلبول‌های سفید در نقطه برش۱۰۳×۶/۳۵ گلبول‌های قرمز در نقطه برش۱۰۶×۸/۵، تعداد مطلق نوتروفیل در نقطه برش Cells/ µl ۳۲۳۰، تعداد مطلق لنفوسیت در نقطه برش Cells/ µl ۳۰۴۲، تعداد مطلق ائوزینوفیل در نقطه برش Cells/ µl ۱۱۵، بند سل در نقطه برش Cells/ µl ۱۱۰، آمیلوئید A سرم خون در نقطه برش ng/dl ۰/۶ و هاپتوگلوبین در نقطه برش ng/dl ۰/۸۲۹ بیشترین درستی بالینی را در تفکیک اسب‌های سالم از بیمار دارا بودند.

بر اساس نتایج حاصل از علائم بالینی و نتایج رادیوگراف به عنوان استاندارد طلایی تشخیص بیماری، بیشترین حساسیت (Se=۸۶/۷%)و ویژگی(Sp=۸۷%) مربوط به اندازه گیری غلظت هاپتوگلوبین می‌باشد. از لحاظ حساسیت، اندازه گیری غلظت آمیلوئید A سرم خون،پروتئین تام، آلبومین، تعداد گلبول‌های قرمز، تعداد مطلق ائوزینوفیل‌ها واز لحاظ ویژگی، اندازه گیری غلظت آمیلوئید A سرم، تعداد مطلق سلول‌های بند، تعداد مطلق ائوزینوفیل و غلظت پروتئین تام سرم خون به ترتیب در ردیف‌های بعدی قرار گرفتند.

از نظر درستی، بیشترین درستی بالینی، بر پایه سطح زیر منحنی، به ترتیب متعلق به اندازه گیری غلظت هاپتوگلوبین،آمیلوئید A سرم خون، و غلظت پروتئین تام سرم خون می‌باشد و اندازه گیری تعداد مطلق ائوزینوفیل ها، غلظت آلبومین، تعداد مطلق سلول‌های بند خون در ردیف‌های بعدی قرار گرفتند. تفاوت معناداری به لحاظ آماری در درستی بالینی غلظت آمیلوئید A سرم خون با هاپتوگلوبین مشاهده نشد (p<۰/۰۵).

تاکنون مطالعات بسیاری بر روی تغییرات پروتئین‌های فاز حاد سرم خون انجام پذیرفته است. ولی به تعیین ارزش تشخیصی این پارامترها در تفکیک اسب‌های سالم از بیمار پرداخته نشده است. نتایج این مطالعه نشان داد که پروتئین‌های فاز حاد مثبت سرم خون خصوصا هاپتوگلوبین با بیشترین درستی بالینی در اسب می‌تواند به عنوان شاخصی به منظور تفکیک اسب‌های سالم از بیمار در سطح گله مورد استفاده قرار گیرد.

References

1-Baumann,H. and Gauldie, J.(1994) The acute phase response.Immunol.Today., 15:74-80.

2-Burger,W.,Ewald,C. and Fennert,E.M.(1998) Increase in C-reactive protein in the serum of piglets(pCRP)following ACTH or corticosteroid administration.J.Vet. Med. Ser.,B.45:1-6.

3-Ceron,J.J.,Eckersall P.D. and Martinez Subiela,S. (2005) Acute phase proteins in dogs and cats:current knowledge and future perspectives. Vet. Clin. Pathol., 34:85-96.

4-Eaton, J.W., Brandt, P. and Mahoney, J.R.(1982) Haptoglobin:a natural bacteriostat.Science., 215:691-693.

5-Eckersall,P.D.(1995) Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions comp haematol Int, , Springer verlag London Limited., 5:93-97.

6-Gabay,C. and Kushnev,J.(1999) Acute phase protein and other systemic responces to inflammation .N.Eng.J.Med.,340:448-454.

7-Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Niewold, T.A. and Koopman,S.J.(2005) Acute phase reaction and acute phase proteins. J. Zhejiang. Univ.Sci., 6(11):1045-1056.

8-Harding,J.C.,Baarsch,M.J.and Murtaugh,M.P.(1999) Association of tumor necrosis factor and acute phase reactant changes with post arrival disease in swine.J.Vet. Med. Ser.,44(B):405-413.

9-Horadagoda,N.U.,Knox,K.M.G.,Gibbs,H.A., Reid,S.W.J., Horadagoda, A., Edwards, S.E.R. and Eckersall,P.D.(1999) Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation.Vet.Rec.,14:437-441.

10-Hulten, C., Sandgren, B., Skioldebrand, E., Klingeborn, B., Marhaug,G. and Forsberg, M.(1999) The acute phase protein serum amyloid A(SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection.Acta.Vet.Scand.,40:323-333.

11-Hulten,C. and Demmers,S.(2002) Serum amyloid A(SAA)as aid in the management of infectious diseases in the foal:comparison with total leucocyte count, neutrophil count and fibrinogen.Equine Vet.J., 34:693-698.

12-Hulten, C., Tulamo, R. -H., Suominen, M. M., Burvall, K., Marhaug, G and Forsberg, M.(1999) A noncompetitive chemiluminecence enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid A(SAA),a clinically useful inflammatory marker in the horse.Vet.Immunol.Immunopathol., 68:267-281.

13-Hultén C, Grönlund U, Hirvonen J et al2002).) Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and α2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. Eq Vet J., 34:699-704.

14-Jacobsen S, Halling-Thomsen M, Nanni S.(2006) Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease. Am J Vet Res., 67:1738-1742.

15-Katoh,N.and Nakagawa,H.(1999) Detection of haptoglobin in the high density lipoprotein and the very high density lipoprotein fractions from sera of calves with experimental pneumonia and cows with naturally occurring fatty liver.J.Vet. Med. Sci.,61:119-124.

16-Laurell,C.-B. and Nymann, M. (1957) Studies on the serum haptoglobin level in hemoglobinemia and its influence on renal excretion of hemoglobin. Blood12:493-506.

17- McDonald TL, Larson MA, Mack DR et al. (2001) Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum. Vet Immunol Immunopathol., 83:203-211.

18-Mills P.C., Auer D.E., Kramer H., Barry D.,Ng J.C. (1998) Effects of inflammation-associated acute-phase response on hepatic and renal indices in the horse, Aust. Vet. J., 76:187–194.

19-Murata,H.,Shimado,N. and Yoshioka,M.(2004) Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis:an overview. Vet. Immunol. Immunopatho., 168:28-40.

20-Murtaug, M.P., Baarsch, M.J., Zhou, Y., Scamurra, R.W. and Lin,G. (1996) Inflammatory cytokines in animal health and disease. Vet. Immunol. Immunopatho., 54:45-55.

21-Peltola, H.O.(1982) C-reactive protein for rapid monitoring of infections of the central nervous system.Lancet., 980-981.

22- Pepys MB, Baltz ML, Tennent GA.(1989) Serum amyloid A (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response. Eq Vet J., 21:106-109.

23-Petersen,H.H.,Nielsen,J.P.and Heegard,P.M.H.(2004) Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. Vet.Res., 35:163-187.

24-Petersen,H.H.,Ersboll,A.K.,Jensen,C.S. and Nielsen,J.P.(2002) Variation of serum haptoglobin concentration in slaughter pigs of different health status. Prev. Vet. Med., 54: 325-335.

25- Pollock PJ, Prendergast M, Schumacher J et al. (2005) Effects of surgery on the acute phase response in clinically normal and diseased horses. Vet Rec., 156:538-542.

26- Skinner,J. G., Brown, R. L. A. and Roberts, L.(1991) Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions.Vet.Rec., 128:147-149.

27-Stoel,D.M. and Whitehead,A.S.(1994) The major acute phase reactants C-reactive protein,serum amyloid P component and serum amyloid A protein. Immunol.Today. 15:81-88.

28-Suffredini,A.F.,Funtozzi,G.,Badolato,R.,Oppenheim,J.J. and O Grady, N. (1991) New insights into the biology of the acute phase response. J.Clin. Immunol.,19:203-214.

29-Taira T., Fujinaga T., Okumura M., Yamashita K., Tsunoda N., Mizuno S. (1999) Equine haptoglobin:Isolation characterization and theeffects of ageing delivery and inflammation on its serum concentration, J. Vet. Med. Sci.,54:435–442.

30- Tape C, Kisilevsky R. (1990) Apolipoprotein A-I and apolipoprotein SAA half-lives during acute inflammation and amyloidogenesis. Biochem Biophys Acta., 1043:295-300.

31- Tedeschi D., Pellegrini-Masini A., Lubas G., Baragli P., De Andreis C., Sighieri C (2011) Haptoglobin a marker of hemolysis in horses. Eur. Soc. Vet. Clin. Path., 30:1-47.

32- Webel, D.M., Finck, B.N., Baker, D.H. and Johnson, R.W.(1997) Time course of increased plasma cytokines, cortisol and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. J. Anim.Sci., 75:1514-1520.