جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تعیین حساسیت و ویژگی تست ممانعت از تشکیل Rosette برای تشخیص زود هنگام آبستنی در تلیسه‌های شیری

دکتر مهدی وجگانی[۱] دکتر محمد وجگانی[۲] دکتر فرامرز قراگزلو[۱] دکتر سید وحید میر ترابی[۳]

هدف: تعیین تشخیص آبستنی در ۲۴ الی ۷۲ ساعت پس از تلقیح در تلیسه‌ها از طریق مشخص کردن (Early Pregnancy Factor "EPF") در سرم تلیسه‌ها با آزمایش (Rosette inhibition test "RIT").

طرح: مطالعه تجربی میدانی.

حیوانات: در مجموع ۷۵ رأس تلیسه از یک دامداری بزرگ در اطراف شهر تهران جهت انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

روش: در این مطالعه ۱۵ رأس تلیسه به عنوان گروه شاهد و ۶۰ رأس تلیسه به عنوان گروه نمونه انتخاب شدند. از تلیسه‌های گروه نمونه ۲۴ الی ۷۲ ساعت پس از تلقیح خونگیری به عمل آمد. در نهایت ۴۲ روز پس از تلقیح از طریق لمس راست روده‌ای آبستنی تشخیص داده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: شاخصهای اپی‌دمیولوژیک (حساسیت و ویژگی).

نتایج: تست در گروه کنترل ۱۱ تلیسه را آبستن تشخیص داد و در گروه نمونه از ۳۳ تلیسه آبستن، ۵ تلیسه را غیر آبستن و از ۲۷ تلیسه غیر آبستن، ۲۰ تلیسه را آبستن تشخیص داد. در نهایت حساسیت این تست در رقت $^{1}/_{32}$ سرم ۸۵ درصد، ویژگی ۲۶ درصد، ارزش پیشگویی مثبت ۴۷ درصد و ارزش پیشگویی منفی ۶۹ درصد تعیین شد.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه حساسیت و ویژگی این تست در مطالعه صورت گرفته مشابه سایر مطالعات که از تست‌های دیگر جهت مشخص کردن EPF استفاده کرده بودند پایین بود می‌توان چنین بیان کرد که تشخیص آبستنی در تلیسه‌ها از طریق مشخص کردن EPF خون آنها با آزمایش E-Rosette در ۷۲-۲۴ ساعت پس از تلقیح دقت بالایی ندارد. *مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۱)، دوره ۵۷، شماره ۱، ۴-۱.*

واژه‌های کلیدی: EPF، ECF، RIT، آبستنی، تلیسه.

Determination of sensitivity and specificity for Early Pregnancy Factor "EPF" through Rosette Inhibition Test in heifers

Vojgani, M.[1], Vojgani, M.[2], Gharagozloo, F.[1], Mirtorabi, S.V.[3]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran – Iran.* [2]*Department of Immonology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran – Iran.* [3]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran – Iran.*

Objective: To determine the sensitivity and specificity of Rosette Inhibition Test (RIT) for detection of (Early Pregnancy Factor "EPF").

Design: Experimental field study.

Animals: Seventy five heifers from a dairy farm in the vicinity of Tehran were selected reandomly during July 2000 to Felbruary 2001.

Procedure: Fifteen heifers (control group) were tested and blood was collected 36-84 hours after estrus. Blood serum of 60 heifers (treatment group) were collected 24-72 hours after AI. Pregnancy was determined 42 days after insemination via rectal examination.

Statistical analysis: Epidemiological indices (Sensitivity specificity).

Results: Eleven heifers were diagnosed pregnant in control group. In the other group, 5 of 33 pregnant cows were diagnosed non pregnant and 20 of 27 non pregnant heifers were diagnosed pregnant with R.I.T. Sensitivity of RIT in dilution of $^{1}/_{32}$ (RIT5) for pregnancy diagnosis was 85.5 percent and specificity was 26 percent. Positive predictive value was observed to be 47 percent and the negative predictive value 69 percent.

Clinical implications: EPF is a protein detectable in the serum of pregnant females in most mammals before and after attachment of the embryo. EPF is secreted with growth regulatory and immunomodulatory properties. Despite of determination EPF in women by RIT in heifer there is no significant association between the detection of EPF through E-RIT and pregnancy. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 57, 1: 1- 4, 2002.***

Key words: EPF, ECF, RIT, Pregnancy, Heifer.

Morton و همکارانش در سال ۱۹۷۴ ماده‌ای را در خون محیطی موش آبستن پیدا کردند که می‌توانست جنین را در برابر پس زدن مادر محافظت کند. ماده مزبور در ۶-۴ ساعت پس از تلقیح و تا هفته دوم آبستنی در موش قابل جستجو بود. این ماده عامل اولیه آبستنی (Early Pregnancy Factor "EPF") نامیده شد (۱). پس از آن Morton و همکارانش توانستند EPF را در سال ۱۹۷۷ در انسان، ۱۹۷۹ در گوسفند، و در سال ۱۹۸۱ در خوک و گاو شناسایی کنند. (۵).

EPF از دو بخش تشکیل شده است: EPF-A و EPF-B که با سولفات آمونیوم ۴۰ درصد می‌توان آنها را جدا کرد. EPF-A ترکیبی است که به لنفوسیتها متصل می‌شود اما این کار را تنها در حضور EPF-B می‌تواند انجام دهد. برای مشخص کردن EPF از طریق RIT حضور هر دو ترکیب ضروری است (۵).

به نظر نمی‌رسد که اثر EPF روی لنفوسیتها اختصاص به گونه داشته باشد و EPF سرم یک گونه را می‌توان با استفاده از لنفوسیتهای گونه‌های دیگر شناسایی کرد. به هر حال برای انجام تست روزت در دو گونه متفاوت پروتئینهای هترولوگ باید خارج شود زیرا ممکن است تست روزت را منفی نشان دهد (۵).

منبع تولید EPF در حقیقت سلولهای در حال تکثیر است. یعنی همان‌گونه که EPF از سلولهای جنینی ترشح می‌شود از سلولهای توموری و سلولهای در حال تکثیر نیز ترشح می‌شود. مانند زمانی که کبد پس از هپاتکتومی جزیی در حال ترمیم سلولی است و EPF را می‌توان در سرم جستجو کرد (۷).

کشت آزمایشگاهی اعضای مختلف موش نشان داد که EPF-A در رمان استروس و آبستنی توسط اویدوکت ترشح می‌شود و EPF-B در هنگام آبستنی به وسیله تخمدان ساخته می‌شود. تاکنون مکانیسم مشخصی برای چگونگی ساخت EPF-A ارایه نشده است اما نشان داده شده است که جهت تولید EPF-B ترشح ماده‌ای از سلول تخم در حضور پرولاکتین ضروری است که به این ماده Zygotin که یک

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
۲) گروه آموزشی ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران - ایران.
۳) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

فاکتور تخمدانی است گفته می‌شود (۵).

در بررسی Lash و همکارانش در سال ۱۹۹۷ معلوم شد که عامل فعال کننده پلاکتها (Platelet Activating Factor "PAF") همان Zygotin است که به وسیله Zygot ترشح می‌شود و در تحریک سنتز EPF نقش دارد (۶).

احتمالا پس از لقاح (نفوذ اسپرم به داخل تخمک) سلول تخم فاکتور ذکر شده را آزاد می‌کند. در یک مشاهده جالب دیده شد که محرکهای بکرزایی (Parthnogenic) سلول تخم - مثل قرار دادن تخم در محیط حاوی کلسیم و منیزیوم آزاد یا Hyalauronidase - باعث آزاد شدن Zygotin می‌شود. بعد از لقاح ظاهرا رویان تولید Zygotin را تا مرحله بلاستوسیت ادامه می‌دهد و سپس خود منبع تولید EPF می‌شود (۱۱). البته طی آزمایشاتی نیز دیده شده است منشأ EPF در انسان قبل از لانه گزینی مادر و پس از لانه‌گزینی جنین است (۱۲، ۸).

لازم به ذکر است که برای تولید EPF وجود تخمکهای فعال و رویانهای زنده ضروری است به نحوی که در آزمایشی متوجه شده‌اند که اندازه‌گیری EPF در برنامه‌های انتقال رویان ممکن است سودمند باشد، چرا که نشان دهنده موفقیت انتقال رویان و زنده بودن رویانهای انتخاب شده است.

در گاو تحقیقات محدودی درباره EPF و تشخیص آن انجام گرفته است. در گاو معلوم شده است اندازه‌گیری EPF در کمتر از ۲۴ ساعت از شروع آبستنی در ۸۷/۵ درصد موارد، آبستنی را تشخیص می‌دهد و ۱۲/۵ درصد خطا در تشخیص گاوهای غیر آبستن دارد (۱۰). وجود EPF در سرم یکی از شاخصهای زنده بودن رویان است (۹).

در آزمایشی برای ارزیابی ارزش اندازه‌گیری EPF خصوصا به منظور تشخیص تفریقی سقط و آبستنی خارج رحمی در انسان متوجه شدند که بیماران مبتلا به سقط اکثرا EPF منفی نشان می‌دهند و در مورد آبستنیهای خارج رحمی در انسان نیز همین گونه است. در این آزمایش حساسیت و ویژگی EPF ۸۳ درصد تعیین شده است و ارزش پیشگویی مثبت آن ۵۴ درصد و ارزش پیشگویی منفی آن ۹۵ درصد تعیین شده است. در نهایت چنین نتیجه‌گیری شده است که می‌توان از اندازه‌گیری EPF در اوایل آبستنی به عنوان یکی از شاخصهای مهم جهت تشخیص اختلالات آبستنی استفاده کرد.

در بررسی دیگری حساسیت تست EPF برای موارد تهدید به سقط ۷۸/۹ درصد و ویژگی آن ۹۵/۶ درصد و ارزش پیشگویی مثبت آن ۹۳/۸ درصد و ارزش پیشگویی منفی آن ۸۴/۶ درصد گزارش شده است و در نهایت چنین نتیجه‌گیری شده است که چون EPF در صورت زنده بودن رویان در خون وجود دارد، پس می‌تواند یکی از شاخصهای خوب پیشگویی موارد تهدید به سقط باشد (۱۰). برای مشخص کردن EPF از آزمایش ممانعت از تشکیل Rosette استفاده شده است و اساسا سه روش Rosette وجود دارد E-Rosette، EA- Rosette و EAC- Rosette که در شکل اول تنها مجاور شدن لنفوسیت با گلبول قرمز گوسفند می‌تواند تشکیل Rosette دهد و در روش دوم نیاز به آنتی بادی ضد لنفوسیت می‌باشد و در روش سوم علاوه بر آنتی‌بادی ضد لنفوسیت نیاز به کمپلمان نیز هست. در این آزمایش از E-Rosette استفاده گردید.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه: جمع آوری نمونه‌های سرم خون، در تعدادی از دامداریهای صنعتی اطراف تهران انجام شد. تمام نمونه‌های سرم خون از تلیسه‌های نژاد هولشتاین گرفته شد. در این بررسی تعداد تلیسه‌های گروه کنترل ۱۵ رأس و تعداد تلیسه‌های گروه نمونه ۶۰ رأس در نظر گرفته شد.

در ابتدا جهت به دست آوردن سرم خون گروه کنترل تعدادی تلیسه انتخاب شد و پس از وارد شدن در مرحله استروس بدون آنکه تلقیح صورت گیرد در فاصله زمانی ۳۶ الی ۸۴ ساعت پس از شروع علایم فحلی نمونه خون اخذ شد. این زمان به معنی ۲۴ الی ۷۲ ساعت پس از تلقیح فرضی است. یک الی دو ساعت پس از خونگیری، ابتدا به وسیله اپلیکاتور لخته‌های خون را از جداره لوله جدا نموده و سپس لوله‌ها با ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس سرم جدا شده، به وسیله پی‌پت پاستور به لوله‌های اپندورف منتقل شده و شماره هر گاو روی لوله مربوط به آن درج شد. نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل و تا هنگام آزمایش در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. جهت اخذ خون از گروه نمونه، تعدادی از تلیسه‌های گروه کنترل به اضافه تعدادی دیگر از تلیسه‌ها انتخاب شده و ۲۴ تا ۷۲ ساعت پس از تلقیح مصنوعی، نمونه خون اخذ شد و پس از جدا کردن سرم در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شد. برای اطمینان از عدم وجود EPF از منابع دیگر در بدن دام (مثل تومورها و غیره) در این تحقیق فقط از تلیسه‌ها استفاده شد.

در نهایت ۴۲ الی ۵۰ روز پس از تلقیح، تشخیص آبستنی از طریق لمس راست روده‌ای انجام گرفت.

آزمایش ممانعت از تشکیل Rosette: جهت آزمایش RIT به SRBC و سلولهای لنفوسیت زنده دام غیر آبستن یا گاو نر نیاز بود. بنابراین هر روز صبح نمونه‌های خون هپارینه گاو غیرآبستن و گوسفند از موسسه تحقیقاتی امین آباد یا بیمارستان مردآباد تهیه می‌شد و جهت آزمایش همان روز به کار می‌رفت.

جدا کردن لنفوسیت‌ها: جهت جدا کردن لنفوسیت‌ها باید خون تازه هپارینه گاو غیر آبستن تهیه کرد تا لنفوسیتها تضعیف شده نباشند. باید توجه داشت که در این قسمت نباید از EDTA به عنوان ماده ضد انعقاد استفاده کرد چون EDTA تشکیل Rosette را مهار می‌کند (۴). در یک لوله آزمایش ۶-۳ میلی‌لیتر محلول فایکول ریخته و هم حجم یا دو برابر آن و به آرامی خون هپارینه گاو از کنار لوله وارد می‌شد، به طوری که فاز خونی روی فایکول تشکیل می‌شود. سپس لوله را به سانتریفوژ یخچال دار منتقل کرده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد و به مدت ۲۰ دقیقه با ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس لایه لنفوسیتی تشکیل شده در لوله را به وسیله پی‌پت پاستور به دقت جمع‌آوری کرده و به لوله آزمایش دیگری منتقل می‌شد. در ابتدا چند قطره آب مقطر جهت لیز شدن گلبولهای قرمز که احتمالا همراه لنفوسیتها برداشت شده بود، به لوله اضافه می‌شد و بلافاصله ۱۰-۵ میلی‌لیتر محلول بافر PBS به آن اضافه می‌شد. سپس به آرامی سلولها را در بافر معلق نموده به مدت ۵ دقیقه و با ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ کرده و مایع رو دور ریخته می‌شد. سپس دوباره از سلولهای باقیمانده در ته لوله با تکان دادن آرام هموژن تهیه می‌شد و شستشو تکرار می‌شد. پس از ۳ بار شستشو از سلولهای باقیمانده ته لوله هموژن تهیه شده و مقدار کمی از آن را برداشته و با تریپتان بلو، رنگ آمیزی می‌شد. جهت شمارش این سلولها از لام نئوبار استفاده شد. نحوه شمارش به این صورت بود که در ۵ خانه بزرگ تعداد لنفوسیتها را شمرده و بعد با انجام عمل تناسب تعداد آن در ۲۵ خانه بزرگ به دست آمد. چون سلولها با رنگ تریپتان بلو رقیق شده بود، باید آن را در عکس رقت ضرب کرده و در نهایت عدد به دست آمده در 10^4 ضرب شد. حاصل این عدد تعداد لنفوسیتها را در یک میلی‌لیتر نشان می‌داد. در

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مرحله بعد محیط کشت سلول یا بافت استریل آنقدر به سلولها اضافه می‌شد تا غلظت این سلولها به ۲×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر می‌رسید. بررسی درصد زنده بودن لنفوسیتها نیز بسیار مهم است که این کار با انجام رنگ آمیزی حیاتی امکانپذیر است و در این مطالعه بیش از ۹۷ درصد لنفوسیتهای به دست آمده زنده بودند.

تهیه سوسپانسیون ۱ درصد از گلبولهای قرمز گوسفند: نمونه خون هپارینه گوسفند به مدت ۱۰ دقیقه با ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌شد. سپس پلاسما و لایه بافی کوت خارج شده و به گلبولهای باقیمانده در ته لوله PBS اضافه می‌شد. سپس به مدت ۵ دقیقه با ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌شد. عمل شستشو را ۳ بار تکرار کرده و در نهایت از گلبولهای قرمز خالص ته لوله سوسپانسیون ۱ درصد SRBC با استفاده از PBS تهیه می شد.

روش انجام تست: پس از تهیه لنفوسیتها و گلبولهای قرمز در تعداد مورد نظر، ابتدا جهت شاهد تست، در یک لوله، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون SRBC به ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون لنفوسیت اضافه می‌شد. لوله به مدت ۵ دقیقه در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می‌گرفت و سپس به سانتریفوژ یخچالدار منتقل می‌شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و با ۷۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌شد و سپس به مدت ۱ الی ۲ ساعت در یخچال یا در کنار یخ نگهداری می‌شد.

جهت آزمایش سرم اخذ شده باید رقتی از سرم را به دست می‌دهد تا شاخص تعیین آبستنی باشد. بدین منظور چند نمونه سرم دام آبستن و غیر آبستن تهیه و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد غیر فعال گردید. سپس رقتهای ۱، $\frac{۱}{۲}$، $\frac{۱}{۴}$، $\frac{۱}{۸}$، $\frac{۱}{۱۶}$، $\frac{۱}{۳۲}$ و $\frac{۱}{۶۴}$ تهیه شد. تمامی رقتها طوری تهیه می‌شد که در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از سرم رقیق شده در هر لوله وجود داشته باشد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون لنفوسیت به هر لوله اضافه می‌شد و بعد به مدت ۳۰ دقیقه در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شد. پس از ۳۰ دقیقه گرم کردن، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون SRBC به هر لوله اضافه می‌شد و مجددا به مدت۵ دقیقه در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شد. در مرحله بعد لوله‌ها به آرامی از گرمخانه خارج می‌شد و به سانتریفوژ یخچال دار منتقل می‌شد. در ضمن درب لوله‌ها با پارافیلم مسدود می‌شد. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه و با ۷۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌شد و پس از آن به مدت ۱ الی ۲ ساعت نمونه‌ها به یخچال منتقل می‌شد. پس از این مرحله لوله‌ها را از یخچال خارج نموده و مایع رو به آرامی برداشت می‌شد. بعد مقداری از قسمت ته نشین شده ته لوله به آرامی برداشت می‌شد و روی لام قرار می‌گرفت و پس از لامل گذاری وضعیت تشکیل Rosette بررسی می‌شد. در نهایت وضعیت تشکیل Rosette در این لوله‌ها با لوله‌های شاهد مقایسه می‌شد.

چنانچه در هر نمونه میزان تشکیل Rosette کاهش قابل توجهی نسبت به شاهد داشت، دام آبستن و در غیر این صورت دام غیر آبستن تلقی می‌شد. در این مرحله مشاهده شد در رقتهای ۱، $\frac{۱}{۲}$، $\frac{۱}{۴}$، $\frac{۱}{۸}$، $\frac{۱}{۱۶}$ در تمامی لوله‌ها (آبستن و غیر آبستن) تشکیل Rosette به میزان فراوانی مهار شده بود و در رقت $\frac{۱}{۶۴}$ درصد تشکیل Rosette مشابه شاهد تست بود.

اما در رقت $\frac{۱}{۳۲}$ در دامهای آبستن تشکیل Rosette مهار شده بود و در دامهای غیر آبستن Rosette تشکیل شده بود. بنابراین رقت $\frac{۱}{۳۲}$ (RIT5) جهت آزمایش سرمهای دیگر در نظر گرفته شد. از ۷۵ سرم اخذ شده از تلیسه‌ها نیز پس از غیرفعال شدن در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد رقت $\frac{۱}{۳۲}$ تهیه شد و همانند مراحل قبل عمل می‌شد. در نهایت نتایج هر نمونه توسط دو نفر به طور جداگانه قرائت می‌شد.

نتایج

از ۱۵ رأس تلیسه گروه شاهد که تلقیح نشده بودند، تنها ۴ تلیسه غیر آبستن تشخیص داده شد و در ۱۱ تلیسه دیگر تشکیل Rosette مهار شده بود. از میان ۶۰ رأس تلیسه دیگر مورد آزمایش در مجموع ۳۳ تلیسه در ۴۲ روزگی آبستن تشخیص داده شده بودند که از این میان RIT ۲۸ تلیسه را آبستن و ۵ تلیسه را غیر آبستن تشخیص داده بود. RIT از میان ۲۷ تلیسه باقیمانده که در ۴۲ روزگی غیر آبستن تشخیص داده شده بودند، ۷ تلیسه را غیر آبستن و ۲۰ تلیسه را آبستن تشخیص داد. در مجموع این تست از میان ۳۳ تلیسه آبستن ۲۸ تشخیص صحیح و از ۴۲ تلیسه غیرآبستن ۱۱ تشخیص صحیح داده بود. بنابراین با توجه به جدول زیر می‌توان حساسیت و ویژگی تست را به دست آورد:

آزمایش	آبستن	غیر آبستن
تست مثبت	۲۸(a)	۳۱(b)
تست منفی	۵(c)	۱۱(d)

$$(\text{حساسیت}) = \frac{a}{a+c} \times ۱۰۰ = \frac{۲۸}{۳۳} \times ۱۰۰ = ٪۸۵$$

$$(\text{ویژگی}) = \frac{d}{b+d} \times ۱۰۰ = \frac{۱۱}{۴۲} \times ۱۰۰ = ٪۲۶$$

بنابراین حساسیت RIT برای تشخیص آبستنی در تلیسه ۸۵ درصد و ویژگی آن ۲۶ درصد می‌باشد. از طرفی ارزش پیشگویی مثبت و منفی تست را نیز می‌توان بدین صورت تعیین کرد:

$$PV+ \ (\text{ارزش پیشگویی مثبت}) = \frac{a}{a+b} \times ۱۰۰ = \frac{۲۸}{۵۹} \times ۱۰۰ = ٪۴۷$$

$$PV- \ (\text{ارزش پیشگویی منفی}) = \frac{d}{c+d} \times ۱۰۰ = \frac{۱۱}{۱۶} \times ۱۰۰ = ٪۶۹$$

یعنی ارزش پیشگویی مثبت تست در تلیسه ۴۷ درصد و ارزش پیشگویی منفی در آن ۶۹ درصد می‌باشد. ضمنا از طریق دو تست آماری مربع کای یکی با در نظر گرفتن تصحیح یاتس (Yates correction) و دیگری بدون در نظر گرفتن تصحیح یاتس از لحاظ آماری بررسی شد و ارتباط معناداری بین تشخیص تست و وضعیت آبستنی وجود نداشت. به عبارتی دیگر می‌توان نتایج زیر را به دست آورد: ۱- تلیسه‌هایی که توسط تست غیر آبستن تشخیص داده می‌شوند، به احتمال ۶۹ درصد غیر آبستن هستند. ۲- در مواردی که تست، آبستن تشخیص می‌دهد، به احتمال ۴۷ درصد دام آبستن است. ۳- دامهای آبستن به احتمال ۸۵ درصد در این تست صحیح تشخیص داده می‌شوند. ۴- دامهای غیرآبستن به احتمال ۲۶ درصد در این تست صحیح تشخیص داده می‌شوند.

بحث

در خانمها وجود EPF در روزهای ۲-۱ پس از لقاح گزارش شده است و در گردش خون خانمهای آبستن تا حدود هفته آخر آبستنی باقی می‌ماند اما همیشه قبل از زایمان از خون محو می‌شود (۶). وجود EPF در ۱۶ ساعت پس از لقاح تا ثلث دوم آبستنی در گردش خون مادیان اثبات شده است ولی پس از آن دیگر نمی‌توان آن را در خون مادر یافت. در پونی نیز الگوی ترشح EPF به همین شکل است (۹). در گوسفند وجود EPF ۷۲ ساعت پس از لقاح گزارش شده است که در بعضی موارد به مدت یکماه و در بعضی موارد تا ۴ ماه پس از گذشت آبستنی در خون قابل تشخیص است

(۷). در خوک دوره تولید EPF با سایر گونه‌ها کمی متفاوت است و تا زمان زایش در خون حضور دارد (۵).

در گاو معلوم شده است که EPF را در کمتر از ۲۴ ساعت پس از لقاح می‌توان در خون دامهای آبست یافت (۱۰) و بلافاصله پس از جمع آوری جنین در دامهای دهنده میزان آن کاهش پیدا می‌کند و تا یک هفته بعد یافت نمی‌شود (۳). لذا در بررسی حاضر نیز طبق گزارشهای موجود ۲۴ الی ۷۲ ساعت پس از تلقیح از تلیسه‌ها خونگیری به عمل آمد و پس از جدا سازی سرم آزمایش RIT برای جستجوی EPF انجام شد.

در کارهای تحقیقاتی مختلف به عمل آمده برای تشخیص EPF از تست ایمونولوژیک RIT استفاده شده است (۹، ۵، ۳، ۱). البته گزارش شده است که با استفاده از الایزا نیز می‌توان EPF را تشخیص داد (۳). در بررسیهایی که برای تشخیص EPF از طریق آزمایش RIT صورت گرفته است، حساسیت و ویژگی این آزمایش را در انسان ۸۳ درصد و ارزش پیشگویی مثبت آن را ۵۴ درصد و ارزش پیشگویی منفی آن را ۹۵ درصد بیان کرده‌اند. در بررسی دیگری حساسیت آزمایش EPF برای موارد تهدید به سقط در انسان ۷۸/۹ درصد و ویژگی آن ۹۵/۶ درصد و ارزش پیشگویی مثبت آن ۹۳/۸ درصد و ارزش پیشگویی منفی آن ۸۴/۶ درصد گزارش شده است (۱۰).

یکی از سئوالاتی که در ارتباط با بالا بودن موارد مثبت کاذب آزمایش مطرح است این است که ممکن است دامهایی را که در چند روز اول پس از لقاح ۲۴ الی ۷۲ ساعت با اندازه‌گیری EPF آبستن فرض می‌شوند و در تشخیص آبستنی در ۴۲ روز بعد از طریق معاینه رکتال منفی می‌شوند این دامها واقعا آبستن بوده‌اند ولی در طی این مدت جنین آنها از بین رفته و بنابراین در تشخیص آبستنی از طریق معاینه بالینی منفی شده‌اند. در پاسخ به این سئوال Cordoba و همکارانش روی ۱۸ رأس گاو و تلیسه به عنوان گروه شاهد (تلقیح نشده) و ۱۸ رأس به عنوان گروه تیمار (تلقیح شده) مطالعه‌ای انجام دادند و ۲۴ الی ۴۸ ساعت پس از تلقیح در گروه تیمار و در همین زمان در گروه شاهد خونگیری برای جستجوی EPF به عمل آمد و ۶ روز بعد در دامهای گروه تیمار به منظور به دست آوردن جنین شستشوی رحم (Flushing) رحم صورت گرفت دامهایی را که جنین از آنها به دست آمد آبستن و در غیر این صورت غیر آبستن فرض کردند و با تست EPF مقایسه نمودند و چنین نتیجه‌گیری کردند که حساسیت و ویژگی این تست و همچنین ارزش پیشگویی مثبت و منفی آن به ترتیب ۸۶، ۴، ۴۹ و ۲۳ درصد است (۲).

در گاو از طریق EAC- Rosette روی دامهای دهنده رویان متوجه شدند که اگر مهار تشکیل Rosette در تیتر بالاتر از $\frac{1}{32}$ باقی بماند، دام آبستن است و در دامهای غیر آبستن، مهار تشکیل Rosette در تیتر کمتر از $\frac{1}{16}$ رخ می‌دهد (۲). لذا در مطالعه صورت گرفته اگر در تیتر $\frac{1}{32}$ Rosette تشکیل می‌گردید دام آبستن و در غیر این صورت دام غیر آبستن قلمداد می‌شد. در این ارتباط با انجام آزمایشهایی روی دامهای آبستن و غیر آبستن در تیترهای $\frac{1}{16}$ و $\frac{1}{64}$ مشخص شد که در تیتر $\frac{1}{16}$ در کلیه دامهای آبستن و غیر آبستن Rosette مهار شد و در $\frac{1}{64}$ در کلیه دامهای آبستن و غیر آبستن Rosette تشکیل شد که علت این دو پدیده را می‌توان چنین بیان کرد که در تیتر $\frac{1}{16}$ مهارکننده‌های دیگر موجود در سرم در حد بالایی وجود داشتند و در نتیجه تشکیل Rosette مهار می‌شد ولی در تیتر $\frac{1}{64}$ غلظت EPF به حدی کم شده بود که حتی در دامهای آبستن Rosette به میزان زیادی تشکیل می‌شد.

در این مطالعه حساسیت RIT برای تشخیص آبستنی ۸۵ درصد و ویژگی این تست نیز ۲۶ درصد تعیین شد ولی بررسیهای دیگر حساسیت این تست را ۸۷/۵ درصد بیان کرده‌اند (۱۰). علت این تفاوت را می‌توان در این دانست که در تجربه مذکور نوع روزت مورد استفاده بیان نشده است و همچنین نمونه خون در کمتر از ۲۴ ساعت پس از لقاح اخذ شده است. لذا می‌توان این نتیجه را گرفت که تشخیص آبستنی یا مشخص کردن EPF از طریق آزمایش E. Rosette در ۲۴ الی ۷۲ ساعت پس از تلقیح در رقت $\frac{1}{32}$ ارزش تشخیصی ندارد و به علت پایین بودن حساسیت و ویژگی این تست و معنادار نبودن آن، این تست برای تشخیص آبستنی گاو در زمان ذکر شده توصیه نمی‌شود. و با توجه به مطالعه Cordoba و همکارانش شاید بتوان اعلام کرد که تشخیص آبستنی گاو از طریق مشخص کردن EPF غیر قابل اعتماد است، گرچه تعداد مطالعات در این زمینه نیز کم است و شاید با استفاده از سایر روشهای Rosette و تغییر روزها که نیاز به مطالعات بیشتری دارد، بتوان نتایج کاربردی تری گرفت.

References

1. Arthur, G.H., Noakes, D.E., Pearson, H. (1996): Veterinary Reproduction & Obstetrics; 7th ed. W.B. Saunders; PP: 65,89.
2. Cordoba, M.C., Satori, R., Fricke, P.M. (2001): Assessment of a commercially available Early Conception Factor (ECF) test for determining pregnancy status of dairy cattle. J. Dairy. Sci. 84: 1884-1889.
3. Gordon, I. (1996): Controlled Reproduction in Cattle & Buffaloes CAB INTERNATIONAL: 185.
4. Jondal, M., Holm, G., Wigzell, H. (1972): Journal of Experimental Medicine, 136: 771.
5. Koch, E., Morton, H., Elmendorf, F. (1983): Early Pregnancy Factor: Biology and practical application. British Vet. J; 139: 52-58.
6. Lash, G.E., Legge, M. (1997): Induction of early pregnancy factor activity in vitro by platelet-activating factor in mice. J. Reprod. Fertil; 109, 2: 187-91.
7. Moron, H., Clunie, G.J.A. (1979): A test for early pregnancy in sheep. Research in Veterinary Science, 26: 261-262.
8. Nahhas, F., Barnea, E. (1990): Human embryonic origin early pregnancy factor before and after implantation. Am. J. Reprod. Immunol, 22, 3-4: 105-8.
9. Ohnuma, K., Takghashi, J. (2000): Study of Early Pregnancy Factor (EPF) in equine. AM. J. Reprod. Immunol. 43, 3; 174-179.
10. Shahant. S.K., Moniz, C.I., Bordekar, A.D., Gupta, S.M., Naik, K. (1994): Early pregnancy factor as a marker for missed abortions. Gynecol. Obstet. Invest. 37, 2: 73-6.
11. Youngquist, R.S. (1997): Current Therapy in Large Animal Theriogenology. WB. Saunders company, Philadelphia, PP: 301.
12. Zhang, B., Morton, H. (2000): Early Pregnancy Factor suppress experimental encephalomyelitis induced in Lewis rats with myelin basic protein and in SJL/J mice with myelin proteolipid protein peptide 139-154.J.Neuro.Sci.182, 1 :5-15.