Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دوازدهم، شماره دوم، ۱۳۹۵، پیاپی ۳۳: ۸۴-۷۳

اعتبارسنجی دستگاه رفرکتومتر دیجیتال بریکس برای اندازه گیری غلظت ایمونوگلوبولین جی (IgG) درآغوزگاوهلشتاین

امیر زکیان[۱]، محمد نوری[۲*]، آریا رسولی[۳و۶]، مسعود قربانپور[۴]، پیتردی. کانستیبل[۵]

۱- دستیار دوره تخصصی بیماری‌های داخلی دام‌های بزرگ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۴- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۵- استاد گروه طب بالینی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ایلینویز، ایلینویز، ایالات متحده آمریکا

۶- دانشیار گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۲ اردیبهشت ۱۳۹۵ *تاریخ پذیرش ۲ مرداد ۱۳۹۵*

چکیده

در سال‌های اخیر علاقه به استفاده از ابزارهای قابل حمل، سبک و دقیق از قبیل رفرکتومترها افزایش یافته است. در این مقاله سعی شده تا عملکرد و دقت دو نوع از این وسایل را در نقاط برش مختلف و با در نظر گرفتن متغیرهایی که در سطح مزرعه وجود دارند، بررسی شود. به صورت تصادفی ۸۰ راس گا و نژاد هلشتاین در انتهای آبستنی انتخاب و تا زمان زایمان پایش شدند. مواردی از قبیل تعداد شکم زایش، درجه سختی زایش و حجم آغوز در اولین دوشش ثبت گردید و سپس میزان سلول‌های سوماتیک آغوز، ماده خشک، وزن مخصوص آغوز، شاخص بریکس و غلظت ایمونوگلوبولین جی نمونه‌های آغوز اندازه‌گیری شد. ۳۲٪ از نمونه‌های آغوز در مطالعه اخیر دارای غلظت ایمونوگلوبولین کم‌تر از ۵۰ گرم در لیتر بودند. نتایج نشان داد که ارتباط قوی و قابل قبولی ($R^2=$ ۰/۶۷۹) بین روش رفرکتومتری و غلظت ایمونوگلوبولین سنجیده به روش الایزا وجود دارد، همچنین یک ارتباط مثبت و قوی ($R^2=$ ۰/۷۱۱) بین روش رفرکتومتری و هیدرومتری دیده شد. عملکرد رفرکتومتر دیجیتال بریکس جهت ارزیابی کیفیت آغوز در نقطه برش ۲۴٪ افزایش یافت و حساسیت و ویژگی این وسیله به ترتیب به ۸۵/۵٪ و ۹۶٪ رسید. نتایج حاصل از مطالعه اخیر ثابت کرد رفرکتومتر دیجیتال بریکس یک ابزار دقیق در بررسی کیفیت آغوز است که همبستگی بالایی با غلظت ایمونوگلوبولین آغوز به روش الایزا دارد و ارزش تشخیصی این وسیله چنانچه از مقادیر ثابتی از آغوز استفاده شود بهبود می‌یابد اما در نمونه‌های آغوزی که تعداد سلول‌های سوماتیک بسیار بالایی داشته باشند کفایت و دقت این وسیله افت خواهد کرد.

کلمات کلیدی: *الایزا، سلول‌های سوماتیک، رفرکتومتر دیجیتال بریکس، هیدرومتر.*

* نویسنده مسئول: محمد نوری

آدرس: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. تلفن:۰۹۱۶۳۱۹۴۶۶۳

پست الکترونیک: m.nouri@scu.ac.ir

مقدمه

آغوز گاو حاوی مواد مغذی ضروری مختلف، آنتی بادی‌ها، هورمون‌ها، عوامل رشد، سیتوکین‌ها و پپتیدهای ضد باکتری (لاکتوفرین و لاکتوپراکسیدزها) می‌باشد که برای تأمین مواد مغذی، تکامل سیستم ایمنی، رشد و سازگاری گوساله با شرایط بعد از تولد بسیار مهم هستند. به منظور کاهش ریسک احتمالی ابتلای گوساله به نقص ایمنی اکتسابی لازم است تا حداقل غلظت پلاسمایی ایمونوگلوبولین جی به مقدار ۱۰ گرم در لیتردر ۴۸ ساعت ابتدایی تولد از طریق آغوز تامین گردد. حداقل میزان قابل قبول ایمونوگلوبولین جی آغوز نیز ۵۰ گرم در لیتراست و نمونه‌های آغوز با مقادیر کمتر از این عدد کم کیفیت و یا بی‌کیفیت محسوب می‌شوند (۱۰). تست‌های غربالگری متعددی در طی سال‌های گذشته جهت ارزیابی مقادیر ایمونوگلوبولین‌جی در نمونه آغوز مورد آزمایش قرار گرفته است که از این بین روش SRID به‌عنوان دقیق‌ترین تست کمی جهت اندازه‌گیری میزان ایمونوگلوبولین جی در نمونه آغوز و سرم گوساله شناخته می‌شود. اگرچه انجام این روش زمانبر بوده و بین ۱۸ تا ۲۴ ساعت جهت مشخص شدن نتیجه آزمایش زمان لازم است که یکی از معایب این روش آزمایشگاهی محسوب می شود (۷). اما یکی دیگر از روش‌های اندازه‌گیری میزان ایمونوگلوبولین موجود در نمونه آغوز و سرم روش ELISA است و با اینکه به دقت روش SRID نیست اما در زمان بسیار کوتاه‌تری نتیجه آزمون مشخص می‌شود.

امروزه استفاده از وسایل قابل حمل و کاربردی که روش کار با آن‌ها ساده باشد جایگاه ویژه‌ای در صنعت گاو شیری پیدا کرده‌اند. این وسایل نه تنها نتایج قابل قبولی به همراه دارند بلکه به کلینیسین کمک می کند تا هرچه سریع‌تر به تشخیص رسیده و بتواند برمبنای آن جهت ارائه یک پروتکل مدیریتی در سطح مزرعه تصمیم‌گیری کند. رفرکتومترها از جمله این ابزارها هستندکه چندین سال است در دونوع چشمی و دیجیتال مورد استفاده قرار می‌گیرند و بزرگترین مزیت آنها توانایی استفاده در سطح مزرعه است اما در سالهای اخیر مدل جدیدی از آنها به عنوان Brix درصنعت گاو شیری مورد استفاده روزمره قرار می‌گیرد. درجه بریکس یک معیار برای تعیین میزان شکر(سوکروز) در محلول است که بستگی به میزان انکسار نور دارد و در صنایع نوشابه‌سازی و آب‌میوه استفاده می‌شود.یک درجه بریکس برابر با یک گرم ساکاروز در ۱۰۰ گرم محلول است. اما از آنجایی که آنتی بادی و ایمونوگلوبولین‌های موجود در آغوز اساساً از جنس پروتئین هستند درجه انکسار نور این دستگاه که با عدد بریکس و برحسب درصد نشان داده می‌شود ارتباط بالایی با میزان ایمونوگلوبولین موجود در سرم و یا آغوز دارد. مطالعات نشان داده ضریب همبستگی بین شاخص بریکس با روشSRID مستقیم و قوی(۰/۷۵- R^2=۰/۶۴) می‌باشد (۴ و ۲۲). مقادیر بریکس ۲۲٪ برابر با ۵۰ گرم در لیتر ایمونوگلوبولین جی در آغوز است و بدین معنی است که آغوزهای با مقدار بالاتر از این نقطه برش با اطمینان خاطر می‌توانند جهت تغذیه گوساله مورد استفاده قرارگیرند. آغوزهای با مقادیر بریکس بین ۱۸ تا ۲۲٪ نیز برای وعده دوم و یا سوم تغذیه گوساله می‌توانند به کار گرفته شوند اما چنانچه شاخص بریکس در نمونه آغوزی ۱۷٪ و یا پایین‌تر باشد یعنی میزان ایمونوگلوبولین بسیار پایینی داشته و مناسب تغذیه گوساله نمی‌باشد (۴،۳،۱۴و۲۲).

هیدرومتر و کلوسترومتر نیز از دیگر وسایل قابل حمل و نسبتاً دقیق جهت ارزیابی کیفیت آغوز به‌شمارمی‌رود

که از طریق اندازه‌گیری وزن مخصوص آغوز عمل می‌کنند (۹) و بر این اساس هر چه وزن مخصوص آغوز بالاتر باشد حجم آنتی بادی و پروتئین بیشتری دارد و حاکی از بالاتر بودن غلظت ایمونوگلوبولین موجود در نمونه مورد آزمایش است. اما از معایب عمده این ابزارها حساسیت بالا نسبت به تغییرات دمایی نمونه آغوز و ساختار شیشه‌ای آسیب‌پذیر آنها است.

با اینکه دستگاه رفرکتومتر دیجیتال بریکس جهت ارزیابی کیفیت آغوز بسیار مناسب است اما کماکان فقدان وجود یک روش قابل اعتماد، دقیق و کاربردی در راستای بررسی میزان و شدت آلودگی آغوز احساس می‌شود چرا که علیرغم بالابودن ایمونوگلوبولین جی در آغوز، آلودگی بالای باکتریایی آغوز سبب تداخل در جذب ایمونوگلوبولین‌ها و افزایش احتمال ابتلا به نقص ایمنی غیرفعال در گوساله‌ها می‌شود (۱۷).

لذا هدف از طراحی مطالعه حاضر ارزیابی و اعتبارسنجی دستگاه رفرکتومتر دیجیتال بریکس و مقایسه آن با دستگاه هیدرومتراست، علاوه بر آن ارائه نقاط برش مناسب برای هر دو وسیله با در نظر گرفتن وجود متغییرهایی از قبیل حجم آغوز، تعداد سلول‌های سوماتیک آغوز، شکم زایش و درجه سختی زایش از دیگر اهداف این مطالعه بودتا در سطح مزرعه کفایت و کارایی این وسایل بررسی شود.

مواد و روش کار

۱- جمع آوری نمونه‌های آغوز، هیدرومتری، رفرکتومتری و اندازه گیری ماده خشک

۸۰ نمونه آغوز از ۸۰ گاو تازه زا در فاصله حداکثر دو ساعت پس از زایش به صورت کاملاً تصادفی جمع آوری شد. مواردی مانند درجه سختی زایش بر اساس امتیاز ۱ تا ۵ (۱۸)، تعداد شکم‌زایش و حجم آغوز دوشیده شده توسط دستگاه شیردوش انفرادی در اولین دوشش ثبت شد. وزن مخصوص نمونه‌های آغوز توسط هیدرومتر تجاری موجود در بازار (Nasco,FortAtkinson,WI) اندازه‌گیری شد. برای این منظور ابتدا حجم مشخصی از آغوز در یک ظرف استوانه‌ای مدرج ریخته شد و در یخچال قرار گرفت تا به دمای ۲۲ درجه برسد، سپس هیدرومتر در سطح ۰/۰۰۲ کالیبره شد و به صورت آزادانه در ظرف استوانه‌ای شناور شد. برای کاهش خطای آزمون سه بار این فرایند انجام و میانگین عدد حاصله برای هر نمونه ثبت گردید. درآزمون رفرکتومتری نیز ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه آغوز توسط سمپلر (Variable volume 200 µL, Eppendorf, North America, Inc.) بر روی منشور رفرکتومتردیجیتال بریکس (Digital dairy model, DD-3, Misco, Cleveland, OH, USA) قرار داده شد و عدد بریکس برای هر نمونه ثبت گردید. علاوه بر آن با استفاده از دستگاه رفرکتومتر بریکس و با معادله زیرمیزان ماده خشک نمونه‌های آغوز نیز محاسبه شد: ۰/۹۹۸۴ (عددبریکس٪)+ ۲/۰۷۷ =ماده خشک آغوز (۱۶). در انتها نیز ۵ سی سی از هر نمونه آغوز در میکروتیوب ریخته و تا زمان انجام سایر آزمایش‌ها در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

۲- اندازه گیری تعداد سلول‌های سوماتیک و غلظت ایمونوگلوبولین جی در آغوز

تعداد سلول‌های سوماتیک در نمونه‌های آغوز به روش فوزوماتیک اندازه گیری شد (Maunsell, 1998). برای این منظور نمونه‌های آغوز به نسبت ۱:۱ با فسفات بافر (pH= ۷/۴) رقیق شد تا ویسکوزیته آغوز کاهش یافته و از خطای فنی در اندازه گیری سلول‌های سوماتیک جلوگیری شود. برای اندازه گیری غلظت ایمونوگلوبولین جی نیز از کیت جاری (Bio- X

(Diagnostics, Belgium) استفاده شد. آزمون الایزای رقابتی براساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام گرفت و بعد از اضافه نمودن محلول متوقف کننده به تمام گوده‌ها میزان جذب نوری حفره های پلت در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت کننده الایزا (Dynatech, Netherlands) قرائت و ثبت شد.

۳- تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های جمع‌آوری شده با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و Analyse-it نسخه ۲/۲۲ به صورت توصیفی و تحلیلی بررسی شدند. در ابتدا توزیع داده‌ها توسط آزمون one sample Kolmogorov-Smirnov بررسی شد و داده‌هایی که از توزیع نرمال برخوردار بودند براساس میانگین± انحراف معیار و داده‌هایی که توزیع غیرنرمال داشتند براساس میانه و دامنه میان چارکی بیان شدند. نمونه‌های آغوز جداگانه و براساس غلظت ایمونوگلوبولین به روش الایزا، تعداد شکم زایش دام، تعداد سلول‌های سوماتیک آغوز و درجه سختی زایش طبقه بندی و مورد بررسی قرار گرفتند. سپس نتایج حاصله از روش‌های هیدرومتری و رفرکتومتری با آزمون الایزا (به عنوان روش استاندارد در مطالعه حاضر) مقایسه شد. در ادامه حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی محاسبه شد و با ترسیم منحنی ROC میزان دقت هر روش در نقاط برش مختلف بررسی شد تا بهترین و مناسب‌ترین نقطه برش مشخص گردد. به منظور بررسی توافق بین روش های تشخیصی آماره کاپا محاسبه شد و از آزمون مک نمار و تحلیل همبستگی با درنظر گرفتن میزان تورش داده‌ها برای ارزیابی درجه توافق و ارتباط بین روش‌های مختلف با آزمون الایزا استفاده شد. لازم به ذکر است که منحنی استاندارد برای رفرکتومتر دیجیتال بریکس با اندازه‌گیری نمونه کنترل آغوز موجود در کیت تجاری الایزا که دارای میزان مشخصی از ایمونوگلوبولین جی است سنجیده شد. برای این منظور نمونه کنترل موجود در کیت به نسبت های مشخصی با فسفات بافر (۷/۴ =pH) ۷ مرتبه رقیق‌سازی شد و هر نمونه با سه تکرار توسط دستگاه اندازه‌گیری شد تا خطا و میزان واریانس اندازه‌گیری دستگاه بررسی شود. نتایج این آنالیز نشان داد که ارتباط خطی و همبستگی بسیار بالایی (Y= 2.353x-Log (IgG) 2.2959; R2= 0.9996) بین لگاریتم ایمونوگلوبولین جی آغوز (گرم در لیتر) به روش الایزا و عدد بریکس (٪) وجود دارد (تصویر شماره ۱).

نتایج

۱- آمار توصیفی

جدول شماره ۱، به صورت خلاصه آمار توصیفی متغیرهای مختلف در مطالعه حاضر را بر اساس میزان غلظت ایمونوگلوبولین جی نمونه‌های آغوز (بالاتر از ۵۰ گرم در لیتر و پایین‌تر از ۵۰ گرم درلیتر) نشان می‌دهد. نتایج نشان داد از ۸۰ نمونه آغوز جمع آوری شده ۳۲ نمونه غلظت ایمونوگلوبولین جی پایین‌تراز ۵۰ گرم در لیترداشتند و از کیفیت مطلوبی برخوردار نبودند. حداقل و حداکثر غلظت ایمونوگلوبولین جی نمونه‌های آغوز در روش الایزا به ترتیب ۳۱/۳ و ۸۵/۷ گرم در لیتر و در روش رفرکتومتری به ترتیب ۱۲/۶ و ۳۷/۳٪ بود. آزمون آماری نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین غلظت ایمونوگلوبولین جی آغوز و حجم آغوز تولید شده در اولین دوشش وجود ندارد (P>۰/۰۵). داده‌های مطالعه حاضر براساس شکم‌زایش دسته‌بندی و مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲). در این تحقیق از ۸۰ نمونه آغوز ۳۵ نمونه متعلق به تلیسه‌ها، ۱۴ نمونه متعلق به گاوهای شکم دوم و ۳۱ نمونه متعلق به گاوهای شکم سوم بود. نتایج نشان داد که با افزایش

سن دام تعداد سلول‌های سوماتیک آغوز(P<۰/۰۰۱) به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد درحالی‌که غلظت ایمونوگلوبولین جی به روش الایزا (P<۰/۰۰۱)، شاخص بریکس (P<۰/۰۱) و میزان ماده خشک آغوز (P<۰/۰۱) کاهش معنی‌داری یافت. در ادامه نمونه‌های آغوز براساس تعداد سلول‌های سوماتیک آغوز به سه دسته تقسیم شده و متغیرهای موجود بر این اساس مورد مقایسه قرارگرفتند. نتایج جدول ۳، مشخص کرد با افزایش یافتن تعداد سلول‌های سوماتیک آغوز وزن مخصوص، میزان غلظت ایمونوگلوبولین جی (گرم در لیتر)، شاخص بریکس (٪) و ماده خشک (٪) آغوز با کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) مواجه شد. اما ارتباط آماری بین حجم آغوز و تعداد سلول‌های سوماتیک(P>۰/۰۵) و درجه سختی زایش و تعداد سلول‌های سوماتیک آغوز(P>۰/۰۵) معنی‌دار نبود. نهایتاً داده‌ها بر مبنای درجه سختی زایش در جدول شماره ۴ مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج نشان داد از ۸۰ گاو مورد مطالعه ۱۵ رأس (۱۸/۷۵٪) حداقل به کمک یک نفر جهت انجام زایمان احتیاج داشتند. جدول شماره ۴ نشان می‌دهد هرچه دام زایمان دشوارتری داشته باشد وزن مخصوص آغوز، تعداد سلول‌های سوماتیک، غلظت ایمونوگلوبولین جی و ماده خشک پایین‌تری خواهد داشت (P<۰/۰۱) .

۲- ضریب همبستگی و درجه توافق بین متغیرهای مورد مطالعه و روش‌های مختلف ارزیابی کیفیت آغوز

در مطالعه حاضر ارتباط مستقیم و قوی بین غلظت ایمونوگلوبولین جی اندازه‌گیری شده به روش الایزا و وزن مخصوص آغوز اندازه‌گیری شده به روش هیدرومتری (R^2=۰/۶۴۷) و بین غلظت ایمونوگلوبولین جی اندازه‌گیری شده به روش الایزا و عدد بریکس حاصل از روش رفرکتومتری (R^2=۰/۶۷۹) وجود داشت اما هیچ ارتباط معنی‌داری بین سایر متغیرها و غلظت ایمونوگلوبولین جی آغوز وجود نداشت. علاوه بر این نتایج نشان داد که همبستگی مثبت و قوی بین روش هیدرومتری و رفرکتومتری (R^2=۰/۷۱۱) وجود دارد که حاکی از دقت بالای این دو وسیله در هنگام استفاده در سطح مزرعه است. در جدول شماره ۵، درجه توافق و آماره کاپا بین روش‌های مختلف در مقابل روش الایزا ارائه گردیده است. برای روش رفرکتومتری بالاترین توافق (۹۳/۸٪) درنقطه برش ۲۲٪ باآماره کاپای ۰/۸۷(P<۰/۰۰۱) بود و برای روش هیدرومتری بهترین درجه توافق (۹۷/۵٪) در نقطه برش ۱/۰۴۷ با آماره کاپای ۰/۹۵ (P<۰/۰۰۱) مشخص شد.

۳- بررسی ارزش تشخیصی رفرکتومتر و هیدرومتر

مشخصه‌های تشخیصی روش رفرکتومتری و هیدرومتری در نقاط برش مختلف بررسی و در جدول شماره ۶ نشان داده شده است. سطح زیرمنحنی ROC برای روش هیدرومتری در نقطه برش ۱/۰۴۹ و برای رفرکتومتری در نقطه برش ۲۲٪ به ترتیب ۰/۹۷۱ (فاصله اطمینان ۹۵٪: ۰/۹۳۰-۱/۰۰) و ۰/۹۳۳ (فاصله اطمینان ۹۵٪: ۰/۸۷۱-۰/۹۹۱) بود. در بررسی ارزش تشخیصی نیز مشخص شد رفرکتومتر دیجیتال بریکس در نقطه برش ۲۲٪ دارای بهترین ترکیب حساسیت (۷۹/۵٪)، ویژگی (۹۰/۹٪)، ارزش اخباری مثبت (۸۹٪)، ارزش اخباری منفی (۶۰٪) و دقت (۵۸/۷۵٪) می‌باشد و هیدرومتر نیز در نقطه برش ۱/۰۴۹ دارای قوی‌ترین ترکیب حساسیت (۹۰٪)، ویژگی (۸۴/۱٪)، ارزش اخباری مثبت (۸۹٪)، ارزش اخباری منفی (۹۰٪) و دقت (۴۷/۵٪) است. نتایج در مجموع نشان‌دهنده ارزش تشخیصی بالای هردو وسیله در ارزیابی کیفیت آغوز داشت اگر چه رفرکتومتر در دقت نسبتا بالاتری

درمقایسه با هیدرومتر قرار دارد و میزان خطای این روش بسیار پایین‌تر از هیدرومتری است.

جدول ۱- دسته‌بندی داده‌ها براساس غلظت ایمونوگلوبولین جی اندازه‌گیری شده به روش الایزا به دودسته با غلظت بالا (≤۵۰ گرم در لیتر) و غلظت پایین (< ۵۰ گرم در لیتر). مقادیر براساس میانگین± انحراف معیار و یا میانه و دامنه میان‌چارکی ارائه شده است

پارامتر	تعداد	وزن مخصوص	تعداد سلول سوماتیک (×۱۰^۳)	ایمونوگلوبولین (گرم در لیتر)	عدد بریکس (٪)	ماده خشک (٪)	حجم آغوز (لیتر)
کلنمونه‌ها	۸۰	۱/۰۴۸۵ ± ۰/۰۰۸	۲۲۷۰/۷ ± ۱۱۵۶/۶	۴۸/۹۹ ± ۱۲/۶۷	۱۸/۹ (۲۴/۹-۱۷)	۲۰/۹ (۱۸/۹-۲۰/۹)	۶ (۵/۵-۶/۵)
<۵۰ گرم در لیتر	۴۸	*۱/۰۴۳۳ ± ۰/۰۰۳	**۱۹۸۹/۳ ± ۱۱۲۰/۶	**۴۰/۷۷ ± ۴/۲۹	**۱۷/۸ (۱۸/۸-۱۵)	**۱۹/۸ (۱۷-۲۰/۸)	۶ (۵/۳-۶/۳)
≤۵۰ گرم در لیتر	۳۲	۱/۰۵۷۲ ± ۰/۰۰۷	۲۷۳۹/۷ ± ۱۰۷۶/۳	۶۲/۶۹ ± ۹/۷۵	۲۴/۴۵ (۲۴/۵-۳۰/۳)	۳۰/۸ (۲۶/۵-۳۲/۳)	۶ (۵/۵-۷/۲)

*P<0.01;** P<0.001

جدول ۲- دسته‌بندی نمونه‌های آغوز براساس تعداد زایش دام‌های مورد مطالعه. مقادیر براساس میانگین± انحراف معیار و یا میانه و دامنه میان چارکی ارائه شده است

تعداد زایش	تعداد	وزن مخصوص	تعداد سلول سوماتیک (×۱۰^۳)	ایمونوگلوبولین (گرم در لیتر)	عدد بریکس (٪)	ماده خشک (٪)	حجم آغوز (لیتر)
۱	۳۵	۱/۰۵۵۹ ± ۰/۰۰۷	۱۳۲۹/۵ ± ۶۱۷	**۶۰/۵۵ ± ۱۰/۴۷	*۲۷/۱ (۲۳/۳-۳۰)	**۲۹/۱ (۲۵/۴-۳۱/۹)	۵/۹ (۵/۵-۷/۱)
۲	۱۴	۱/۰۴۵۹ ± ۰/۰۰۱	۲۵۳۷/۹ ± ۱۰۶۳	۴۴/۱ ± ۱/۰۷	۱۸/۷ (۱۸/۲-۱۹/۱)	۲۰/۷ (۲۰/۳-۲۱/۱)	۵/۹ (۹/۳-۶/۲)
۳	۳۱	۱/۰۴۱۵ ± ۰/۰۰۳	*۳۲۱۲/۷ ± ۷۸۵/۹	۳۸/۱۴ ± ۳/۰۲	*۱۶ (۱۴/۵-۱۷/۸)	۱۷/۶۵ (۱۶/۵-۱۹/۸)	۶ (۵/۵-۶/۴)

*P<0.01;** P<0.001

جدول ۳- دسته‌بندی نمونه‌های آغوز براساس تعداد سلول‌های سوماتیک نمونه‌های آغوز. مقادیر براساس میانگین± انحراف معیار و یا میانه و دامنه میان‌چارکی ارائه شده است

تعداد سلول‌های سوماتیک (×۱۰^۳)	تعداد	وزن مخصوص	ایمونوگلوبولین (گرم در لیتر)	ماده خشک (٪)	عدد بریکس (٪)	حجم آغوز (لیتر)	درجه سختی زایش
>۱۲۰۰	۱۶	**۱/۰۶۲۳ ± ۰/۰۰۶	**۶۹/۸۳ ± ۷/۷۹	**۳۰/۲ (۲۹/۱-۳۵/۷)	**۳۲/۱ (۳۱/۱-۳۷)	۶ (۵/۵-۷/۲)	۲/۳ ± ۰/۹
۱۲۰۰-۲۱۹۹	۳۰	۱/۰۴۹۰ ± ۰/۰۰۲	۴۹/۷۱ ± ۵/۱۱	۲۲ (۱۹/۰۸-۲۴/۰۵)	۲۳/۶ (۲۱/۱-۲۶/۰۸)	۵/۹ (۵/۴-۶/۲)	۱/۸ ± ۰/۹
≤۲۲۰۰	۳۴	۱/۰۴۱۷ ± ۰/۰۰۲	۳۸/۵۴ ± ۳/۱۶	۱۶/۱۵ (۱۴/۵-۱۷/۸)	۱۸/۱ (۱۶/۷-۱۹/۸)	۶ (۵/۵-۶/۳)	۱/۴ ± ۰/۶

*P<0.01;** P<0.001

جدول ۴- دسته‌بندی نمونه‌های آغوز براساس درجه سختی زایش دام‌های مورد مطالعه. مقادیر براساس میانگین± انحراف معیار و یا میانه و دامنه میان‌چارکی ارائه شده است

درجه سختی زایش	تعداد	وزن مخصوص	تعداد سلول سوماتیک (×۱۰^۳)	ایمونوگلوبولین (گرم در لیتر)	عدد بریکس (٪)	ماده خشک (٪)	حجم آغوز (لیتر)
۱	۲۲	*۱/۰۵۵ ± ۰/۰۰۷	**۲۵۹۷/۹ ± ۱۰۲۳	*۵۹/۷۵ ± ۱۰/۷۳	*۲۶/۲ (۲۳-۲۹/۹)	*۲۸/۲ (۲۵-۳۱/۸)	۶ (۵/۵-۷)
۲	۲۸	۱/۰۴۴ ± ۰/۰۰۲	۲۲۶۹/۱ ± ۱۲۹۴	۴۱/۸ ± ۲/۰۷	۱۸ (۱۷/۳-۱۸/۵)	۲۰ (۱۹/۳-۲۰/۵)	۵/۸ (۵/۳-۶/۲)
۳	۱۳	۱/۰۳۹۷ ± ۰/۰۰۸	۱۵۶۲/۱ ± ۸۲۸	۳۶/۳۳ ± ۱/۶۱	۱۴/۵ (۱۳/۶-۱۴/۸)	۱۶/۵ (۱۵/۷-۱۶/۹)	۶ (۵/۳-۶/۶)
۴	۲	۱/۰۳۸ ± ۰/۰۰۰	۸۴۶/۵ ± ۱۱۳۳	۳۱/۵۴ ± ۰/۳۵	۱۳/۸ (۱۲/۶-۱۵)	۱۵/۸ (۱۴/۶-۱۷)	۶/۱ (۶-۶/۳)

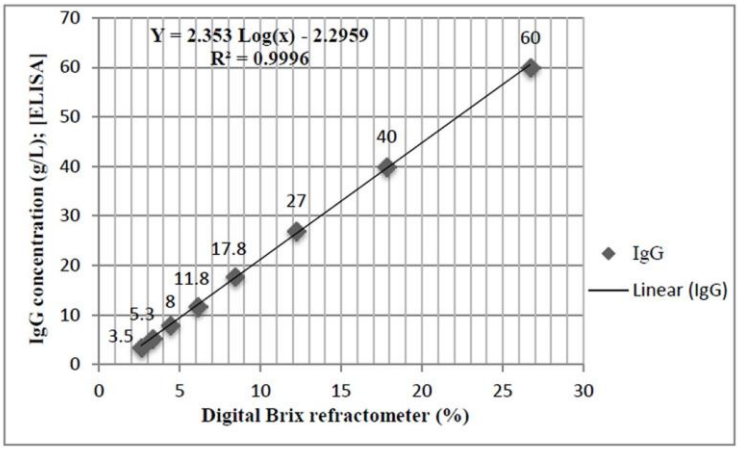
*P<0.01;** P<0.001

جدول ۵- میزان توافق و آماره کاپای روش‌های هیدرومتری و رفرکتومتری در مقابل روش الایزا (به عنوان آزمون استاندارد) در نقاط برش مختلف

آزمون	نقطه برش	درصد توافق	آماره کاپا
رفرکتومتر × الایزای رقابتی	۱۷	۶۳/۸	۰/۳۴
	۱۸	۷۲/۵	۰/۴۸
	۲۰	۹۱/۳	۰/۸۲
	۲۲	۹۳/۸	۰/۸۷
	۲۴	۷۶	۰/۷۶
	۲۵	۶۷/۱	۰/۶۷
هیدرومتری × الایزای رقابتی	۱/۰۴۲	۸۵/۴	۰/۶۷
	۱/۰۴۳	۸۰/۲	۰/۶
	۱/۰۴۵	۹۰	۰/۸
	۱/۰۴۷	۹۷/۵	۰/۹۵
	۱/۰۴۹	۶۳/۱	۰/۳۴

جدول ۶- ارزیابی عملکرد رفرکتومترو هیدرومتر در نقاط برش مختلف برای مشخص نمودن نمونه‌های آغوز با کیفیت (≤۵۰ گرم در لیتر ایمونوگلوبولین جی) وکم کیفیت (<۵۰ گرم در لیتر ایمونوگلوبولین جی).

آزمون	نقطه برش	سطح زیرمنحنی (۹۵٪ فاصله اطمینان)	حساسیت (٪)	ویژگی (٪)	ارزش اخباری مثبت (٪)	ارزش اخباری منفی (٪)	دقت (٪)
رفرکتومتر	۱۷	۰/۷۶۲ (۰/۶۹۹-۰/۸۲۵)	۱۰۰	۵۲/۵	۹۵	۱۰۰	۲۳/۷
	۱۸	۰/۷۸۰ (۰/۷۰۴-۰/۸۵۶)	۹۶/۴	۵۹/۶	۹۶	۶۵	۳۵
	۲۰	۰/۹۰۶ (۰/۸۴-۰/۹۷۳)	۹۵/۶	۸۵/۷	۹۸	۶۸	۵۶/۲
	۲۲	۰/۹۳۳ (۰/۸۷۶-۰/۹۹۱)	۹۵/۷	۹۰/۹	۸۹	۶۰	۵۸/۷
	۲۴	۰/۹۰۷ (۰/۸۴۰-۰/۹۶۸)	۸۵/۵	۹۶	۹۹	۴۲	۶۸/۷
	۲۵	۰/۹ (۰/۸۴۹-۰/۹۵۱)	۸۰	۱۰۰	۱۰۰	۳۶	۷۵
هیدرومتری	۱/۰۴۲	۰/۷۶۲ (۰/۶۹۹-۰/۸۲۵)	۸۳	۵۲/۵	۹۵	۹۰	۲۳/۷
	۱/۰۴۳	۰/۷۸۱ (۰/۷۱۶-۰/۸۴۹)	۸۶	۵۶/۱	۹۵	۹۰	۳۰
	۱/۰۴۵	۰/۸۳۳ (۰/۷۶۶-۰/۹۰۱)	۸۸	۶۶/۷	۹۶	۱۰۰	۴۰
	۱/۰۴۷	۰/۹ (۰/۸۳۷-۰/۹۶۳)	۸۹	۸۰	۹۸	۹۶	۵۰
	۱/۰۴۹	۰/۹۷۱ (۰/۹۳۰-۱)	۹۰	۸۴/۱	۸۹	۹۰	۶۵



تصویر ۱-منحنی استاندارد رفرکتومتر دیجیتال بریکس. نتایج آنالیز نشان دهنده غلظت ایمونوگلوبولین جی اندازه گیری شده به روش الایزا در برابر لگاریتم عدد بریکس (٪) است. {خط مورب بیانگر نحوه توزیع ایمونوگلوبولین جی آغوز و لوزی های توپر نشانگر غلظت ایمونوگلوبولین جی به روش الایزا}

بحث

ارزیابی دقیق کیفیت آغوز یکی از پراهمیت‌ترین مباحث در زمینه مدیریت گله است. همانطور که در مقدمه اشاره شد تکنیک های مختلفی جهت بررسی کیفیت آغوز در راستای پایش و مدیریت بهتر سلامت گوساله‌ها وجود دارد که از این میان روش‌های

سهل‌الوصول، ارزان و نسبتاً دقیقی که امکان انجام در سطح مزرعه را داشته باشد از ارزش بالاتری برخوردار است. در مطالعه حاضر شاخص‌های بریکس بدست آمده مشابه با مطالعه Quigley و همکاران (۲۰۱۳) و برخلاف مطالعه Barrier و همکاران (۲۰۱۵) از توزیع نرمال برخوردار بود. در مجموع تنها ۴۰٪ (۳۲ نمونه از ۸۰ نمونه) از نمونه‌های آغوز به دست آمده در تحقیق حاضر از کیفیت مطلوبی برخوردار بودند (غلظت ایمونوگلوبولین جی بالاتر از ۵۰ گرم در لیتر) و ۶۰٪ (۴۸ نمونه از ۸۰ نمونه) آغوزهای مورد بررسی در زمره کم کیفیت و بی‌کیفیت (غلظت ایمونوگلوبولین جی کمتر از ۵۰ گرم در لیتر) قرار گرفتند.

میزان ایمونوگلوبولین آغوز و سلول‌های سوماتیک آن در مطالعه انجام شده بالاتر از مطالعات قبلی بود (۲۱ و ۱۴). نتایج نشان داد بین غلظت ایمونوگلوبولین و ماده خشک آغوز یک ارتباط خطی مثبت و مستقیم وجود دارد در حالی که بین غلظت ایمونوگلوبولین و سلول‌های سوماتیک موجود در آغوز یک ارتباط منفی معکوس برقرار است و این مسئله می تواند به این دلیل باشد که وقتی تعداد سلول‌های سوماتیک و متعاقب آن بار میکروبی آغوز افزایش می‌یابد سبب تجزیه و تخریب ساختارهای پروتئینی آغوز می شود. محدوده طبیعی میزان سلول‌های سوماتیک آغوز بسته به وضعیت مدیریتی و تغذیه ای در دوران خشکی متفاوت است اما معمولا مقادیر کمتر از $۱/۲\times۱۰^{۳}$ سلول در هر میلی‌لیتر از آغوز قابل قبول قلمداد می‌شود (۸) اما در مطالعه حاضر میزان سلول‌های سوماتیک آغوز بسیار بیشتر از این مقدار بود. Ferdowsi Nia و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند چنانچه آغوزهایی که سلول سوماتیک بالایی دارند در تغذیه گوساله های نوزاد مصرف شوند سبب افزایش شانس ابتلا به نقص ایمنی غیرفعال می‌شود. در زمینه میزان غلظت ایمونوگلوبولین جی آغوز و تعداد شکم زایش نتایج مطالعه حاضر در مغایرت با دیگر مطالعات بود (۲ و ۲۲). ورم پستان و بالاتر بودن سلول‌های سوماتیک بر کیفیت آغوز اثر منفی خواهد داشت (Auldist and Hubble, 1998). نوتروفیل‌ها مهترین سلول‌های سوماتیک موجود در آغوز هستندکه می توانند چربی و پروتئین‌های اساسی آن (مانند کازئین) را مورد مصرف قرار دهند (Kehrli and Shuster, 1994) و باعث افت کیفیت آغوز شوند. با توجه به پایین‌تر بودن ریسک ابتلای تلیسه به ورم پستان نتایج موجود در جدول ۳ مبین این نکته است که میزان سلول‌های سوماتیک موجود در آغوز تلیسه‌ها کمتر از ۱۴۰۰×۱۰^{۳} سلول در هر میلی‌لیتر است در حالی‌که میزان سلول‌های سوماتیک موجود در آغوز گاوهای شکم سوم، بالاتر از ۳۲۰۰×۱۰^{۳} سلول در هر میلی لیتر بودکه این وضعیت می‌تواند ناشی از آلودگی بالاترکارتیه‌ها و یا ابتلا به ورم پستان باشد و به دلیل تاثیرات ناشی از وجود لکوسیت‌های بالاتر و افت شدیدتر pH به دنبال بالاتر بودن بار میکروبی آن سبب کاهش میزان ایمونوگلوبولین جی موجود در آغوز و افزایش ماده خشک می‌شود که در مطالعه حاضر دیده می‌شود.

در مطالعه Fleenor and Stott (۱۹۸۰) بین وزن مخصوص آغوز اندازه گیری شده به وسیله کلوسترومتر و روش RID همبستگی مثبت و قوی وجود داشت (R^2=۰/۶۹۹) که از این حیث به مطالعه حاضر نزدیک بود. Mechor و همکاران (۱۹۹۲) در مطالعه‌ای دقت دستگاه هیدرومتر را در دماهای مختلف بررسی کردند که نتایج نشان داد به ازای هر یک درجه تغییر در دمای آغوز باعث تغییر حدود ۱ گرم در لیتر در میزان ایمونوگلوبولین قرائت شده توسط دستگاه هیدرومتر

می‌گردد. علاوه بر آن Mechor و همکاران (۱۹۹۲) نشان دادند حساسیت دمایی این وسیله سبب می‌شود تا حدودی کفایت عمل آن زیر سؤال برود و به همین دلیل رفرکتومترها می‌توانند جایگزین مناسبی برای این وسایل باشند چون دارای محدودیت و حساسیت دمایی نیستند. نتایج مطالعه ما ثابت کرد چنانچه از هیدرومتر در دمای آغوز ۲۲ درجه سانتی‌گراد استفاده شود و برای کار با رفرکتومتر دیجیتال بریکس همواره از حجم مشخصی آغوز (برای مثال ۲۰۰ میکرولیتر) استفاده شود، نتایج آنها قابل اعتمادتر خواهد بود.

ارزش تشخیصی رفرکتومتر و هیدرومتر در ۶ نقطه برش مختلف مطالعه شد و نتایج آن ارائه گردید (جدول ۶). براین اساس کمترین و بیشترین ویژگی تشخیصی برای دستگاه رفرکتومتر دیجیتال بریکس به ترتیب در نقطه‌های برش ۱۷٪ و ۲۵٪ بدست آمد درحالیکه این فاکتور برای هیدرومتر به ترتیب در نقاط برش ۱/۰۴۲ و ۱/۰۵۱ مشخص شد. همچنین مقایسه این دو وسیله نشان داد که ارزش اخباری مثبت و منفی رفرکتومتر دیجیتال بریکس در نقطه برش ۲۴٪ بسیار نزدیک به ارزش اخباری مثبت و منفی هیدرومتر در نقطه برش ۱/۰۴۹ است. نتایج مطالعه ما ثابت کرد که بهترین نقطه برش برای دستگاه رفرکتومتر دیجیتال بریکس مشابه مطالعه Bielmann و همکاران (۲۰۱۰) ۲۲٪ است با این تفاوت که قدرت تشخیصی این نقطه برش در مطالعه حاضر قوی‌تر از مطالعه Bielmann و همکاران بود. Lori و همکاران (۱۹۹۴) نشان دادند نتایج حاصل از هیدرومتر می‌تواند تا ۴۷٪ اختلاف داشته باشد و در مواردی که غلظت ایمونوگلوبولین آغوز بالاتر از ۵۰ گرم در لیتر باشد، افزایش نقطه برش باعث کاهش دقت دستگاه می‌شود اما در مطالعه حاضر میزان اختلاف داده‌ها کمتر از ۱۸ درصد بود و به علت یکسان‌سازی دمای نمونه های آغوز دقت دستگاه در نقاط برش بالاتر به مقدار بسیارکمی با افت روبرو شد.

سطح زیر منحنی ROC بافاصله اطمینان ۹۵٪ ثابت کردکه نقاط برش ۱۷ و ۱۸٪ در روش رفرکتومتری و نقاط برش ۱/۰۴۲، ۱/۰۴۳ و ۱/۰۴۵ در روش هیدرومتری دارای دقت متوسطی (۰/۹ ≥ سطح زیر منحنی>۰/۷) و برای نقاط برش ۲۰، ۲۲، ۲۴ و ۲۵٪ در روش رفرکتومتری و نقاط برش ۱/۰۴۷، ۱/۰۴۹ و ۱/۰۵۱ در روش هیدرومتری دارای دقت بسیار بالایی (۱> سطح زیر منحنی>۰/۹) هستند. اما نکته قابل توجه زمان استفاده از رفرکتومتر در بررسی حاضر در مورد سلول‌های سوماتیک آغوز بودکه نتایج نشان داد در آغوزهایی با تعداد سلول‌های سوماتیک کمتر از ۱۲۰۰×۱۰^{۳} (سلول در هر میلی لیتر) حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری مثبت دستگاه به ترتیب ۹۳/۸٪، ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ اما در نمونه‌های آغوز که دارای سلول‌های سوماتیک بالاتر از ۲۲۰۰×۱۰^{۳} (سلول در هر میلی لیتر) بودند حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری مثبت دستگاه دچار افت محسوسی شد و به ترتیب به ۹۲/۹٪، ۲۹٪ و ۵۸٪ رسید و کفایت و دقت رفرکتومتر عملاً دستخوش تغییرات بارزی قرار گرفت درحالی‌که هیدرومتر این چنین افتی را نشان نداد. تفسیر این نتیجه کمی دشوار است اما یک دلیل احتمالی آن می‌تواند ناشی از اثرگذاری افزایش سلول‌های سوماتیک بر ضریب انکسار نور رفرکتومتر و تداخل در قرائت میزان پروتئین نمونه مورد سنجش باشد که نیاز به مطالعات گسترده‌تری را برای رد یاتایید این نظریه الزامی می‌کند. آماره کاپا مشخص کرد دو روش رفرکتومتری و هیدرومتری دارای توافق مناسبی در تشخیص کیفیت آغوز هستند و آزمون مک نمار نیز نشان داد اختلاف معنی‌داری($P>۰/۰۵$) بین این دو وسیله وجود ندارد.

همچنین مشخص شد افزایش نقطه برش در روش رفرکتومتری تا ۲۲٪ و در روش هیدرومتری تا ۱/۰۴۷ همراه با افزایش دقت و توافق نسبت به روش الایزا است و منجر می‌شود درصد توافق در رفرکتومتری از ۶۳/۳٪ به ۹۳/۸٪ و در روش هیدرومتری از ۸۵/۴٪ به ۹۷/۵٪ برسد.

در انتها این مطالعه نه تنها سبب افزایش دانش ما در زمینه ارتباط بین میزان ایمونوگلوبولین آغوز، درجه سختی زایش، تعداد سلول‌های سوماتیک آغوز و شکم زایش شد بلکه نشان داد افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک آغوز بر روی دستگاه رفرکتومتر اثر منفی داشته و به کاربردن حجم ثابتی از آغوز در آزمون رفرکتومتری باعث بهبود عملکرد این دستگاه می‌شود. یکی از نتایج غیرقابل انتظار در این مطالعه بالاتر بودن غلظت ایمونوگلوبولین جی آغوز تلیسه در مقایسه با گاو بود که علت احتمالی این پدیده را می‌توان مربوط به بسیار بالاتر بودن میزان سلول‌های سوماتیک موجود در آغوز گاو در مقایسه با تلیسه دانست.

منابع

1. Auldist, M.J.; Hubble, I.B., (1998). Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Australian journal of dairy technology* **53**:28-36.
2. Bartier, A.L., Windeyer, M.C., Doepel, L., (2014). Evaluation of on-farm tools for colostrum quality measurement.*Journal of Dairy Science* **98**:1878–1884.
3. Bielmann, V., Gillan, J., Perkins, N.R., Skidmore, A.L.,Godden, S., Leslie,K.E., (2010). An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **93**:3713–3721.
4. Chigerwe, M., Tyler, J.W., Middleton, JR., et al., (2008). Comparison of four methods toassess colostral IgG concentration in dairy cows. *Journal of American Veterinary Medical Association* **233**:761–766.
5. Chigerwe, M., Hagey,J.V., (2014). Refractometer assessment of colostral and serum IgG and milk total solids concentrations in dairy cattle. *BMC Veterinary Research* **10**:178.
6. Deelen, S.M., Ollivett, T.L.,Haines, D.M.,and Leslie, K.E., (2014). Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science* **97**:3838–3844.
7. Elsohaby, I., McClure, JT., Keefe, G.P., (2015). Evaluation of Digital and Optical Refractometers for Assessing Failure of Transfer of Passive Immunity in Dairy Calves.*Journal of Veterinary Internal Medicine* **29**:721–726.
8. Ferdowsi Nia, E., Nikkhah, A., Rahmani, H.R., Alikhani, M., Mohammad Alipour M., Ghorbani, G.R., (2010). Increased colostral somatic cell counts reduce pre-weaning calf immunity, health and growth.*Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **94**:628–634.
9. Fleenor, W.A., Stott, G.H., (1980). Hydrometer test for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. *Journal of Dairy Science* **63**:973–977.
10. Gillan,J., Perkins, N.R., Skidmore, A.L.,Godden, S., Leslie, K.E., (1993). An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle. Godden, S., (2008). Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice* **24**:19–39.
11. Kehrli, M.E., and Shuster, D.E., (1994). Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science* **77**:619-627.
12. Lori, C., Pritcheit, C., Gay, C., Dale, D., Hancock, Thomas E.B., (1994). Evaluation of the Hydrometer for Testing Immunoglobulin GI Concentrations in Holstein Colostrum. *Journal of Dairy Science* **77**:1761-1767.
13. Maunsell, F.P., Morin, D.E., Constable, P.D., Hurley, W.L., McCoy, G.C., Kakoma, I., Isaacson, R.E., (1998). Effects of mastitis on the volume and composition of

colostrum produced by Holstein cows. *Journal of Dairy Science***81**:1291–1299.

14. McBeath, D.G., Penhale, WJ., Logan, EF., (1971). An examination of the influence of husbandry on the plasma immunoglobulin level of the newborn calf, using a rapid refractometer test for assessing immunoglobulin content. *Veterinary Record* **88**:266–270.
15. Mechor, G.D., Grohn, Y.T.,McDowell, L. R.,Van Saun,R.J., (1992). Specific gravity of bovine colostrum immunoglobulins as affected by temperature and colostrum components. *Journal of Dairy Science* **75**:3131–3135.
16. Moore, M., Taylor, J., Hartman, M.L., and Sischo, W.M., (2009). Quality assessments of waste milk at calf ranch. *Journal of Dairy Science**92***:3503-3509.
17. Moore, M., Chigerwe, M.,Dawes, M. E.,Tyler, J.W.,Middleton,J.R., (2005). Effect of delayed colostrum collection on colostral IgGconcentration in dairy cows. *Journal of American Veterinary Medical Association* **226**:1375–1377.
18. Morrill, K.M., Quigley, J.D., Lago, A., Tyler, H.D., (2012). Estimate of colostral IgG concentration using refractometry without or with caprylic acid fractionation. *Journal of Dairy Science***95**:3987–3996.
19. National Animal Health Monitoring System, (2010) Heifer calf health and management practices on US dairy operations, 2007. Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, USDA, Fort Collins, CO.
20. Pritchett, L.C., Gay, C.C.,Besser, T.E.,Hancock,D.D., (1991). Management and production factors influencing immunoglobulin G1 concentration in colostrum from Holstein cows. *Journal of Dairy Science* **74**:2336–2341.
21. Quigley, J.D., Lago, A., Chapman, C., Erickson, P., Polo, J., (2013). Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. *Journal of Dairy Science* **96**:1148–1155.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 12, Issue 2, 2016

Validation of The Digital Brix Refractometer to Evaluate Immunoglobulin G Concentration (IgG) in Bovine Colostrum

Zakian, A.[1], Nouri, M.[2*], Rasooli, A.[3,6], Gorbanpour, M.[4], Peter D. Constable[5]

1. Resident of Large animal Internal medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
2. Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
3. Associate Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
4. Professor, Department of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
5. Professor, Department of Veterinary Clinical Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois, 61802, USA
6. Associate Professor, Department of Animal Health Management, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received Date: 1 May 2016 *Accepted Date: 23 July 2016*

Abstract
In recent years, there has been an increasing interest in usage of portable lightweight and accurate instrument such as refractometer in dairy industry. This paper attempts to show that each one of mentioned instruments in various cut-points what will be their performance. Randomly, 80 cattle (primiparous and multiparous) selected and lactation number, calving ease score, volume of colostrum at first-milking were recorded and somatic cell count (SCC), total solid (TS), specific gravity, Brix% reading and immunologlobolin G concentration of colostrum sample measured. Thirty-two percent of colostrum samples in the current study had IgG concentration of lower than 50 g/L. The results showed an acceptable correlation (R^2=0.679) between Brix% reading and IgG concentration measured by enzyme linked immunoabsorbant assay (ELISA), also interaction of hydrometer method and digital Brix refractometer (%) had a strong and positive (R^2=0.711) correlation. Performance of digital Brix refractometer for identifying low quality colostrum elevated at cut-point 24%, so that the sensivity and specificity of instrument in mentioned cut-point were 85.5% and 96%, respectively. The current results confirmed digital Brix refractometer is accurate and have a good correlation with IgG concentration of colostrum, and diagnostic characteristics test of device could be better if used of fixed colostrum volume for measurement, but in the colostrum samples with high SCC adequacy of this portable on-farm device falls down.
Keywords: *ELISA, SCC, Digital Brix refractometer, Hydrometer.*

**Corresponding author: Nouri, M.*
Address: Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran. Tel: +989163194663.
Email: m.nouri@scu.ac.ir