

ODNOS NEUTROFILA I LIMFOCITA U RANOJ LAKTACIJI KAO PREDIKTIVNI POKAZATELJ ISKLUČENJA KRAVA IZ PROIZVODNJE

Belić Branislava, Cincović Marko R.¹

Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad

Kratak sadržaj

Cilj ovog istraživanja je da se utvrdi granična vrednost i klinički značaj N:L odnosa u proceni isključenja krava iz proizvodnje u laktaciji koja sledi. U toku rutinskog hematološkog pregleda kod 114 krava 7-15 dana posle partusa ispitivali smo broj neutrofila i limfocita kao i odnos neutrofila i limfocita. Granična vrednost N:L odnosa koja najbolje deli krave koje će biti isključene iz proizvodnje od onih koje će u proizvodnji ostati u laktaciji koja sledi je 1,05. Ako je N:L odnos na ovom nivou sa više od 90% verovatnoće (specifičnost 90,32), možemo tvrditi da će krave biti kasnije isključene iz proizvodnje. Ako je vrednost N:L odnosa oko 0,65 sa preko 90% sigurnosti možemo pretpostaviti da će krave ostati u zapatu (senzitivnost 90,92). Površina ispod ROC krive je 0,751, tj. u opsegu $0,7 < AUC \leq 0,9$, što potvrđuje veoma značajnu vezu između vrednosti N:L odnosa posle partusa i isključenja krava sa farmi ($p \sim 0,01$). 72% krava sa vrednošću N:L $> 1,05$ je bilo isključeno iz proizvodnje tokom 12 meseci, nasuprot 20% isključenih krava čiji je N:L $< 0,5$. Odnos neutrofila i limfocita u ranoj laktaciji je koristan indikator za procenu rizika od isključenja krava iz proizvodnje.

Ključne reči: mlečne krave, puerperijum, neutrofil, limfociti, stres, rizik

¹ E-mail: cin_vet@yahoo.com

NEUTROPHIL TO LYMPHOCYTE RATIO IN EARLY LACTATION AS A PREDICTOR FOR FUTURE EXCLUSION OF DAIRY COWS FROM FARM

Belić Branislava, Cincović Marko R.

Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture Novi Sad

Abstract

The aim of this study was to determine the threshold value and clinical significance of neutrophils to lymphocytes ratio in cooling the cows in lactation that follows. In routine hematological examination of 114 cows 7-15 days after parturition, the number of neutrophils and lymphocytes and neutrophil to lymphocyte ratio was examined. The marginal value of N: L correlation that best separates the cows that will be cooled from those that will remain in production in the lactation that follows is 1.05. If the N: L ratio at this level is more than 90% probability (specificity 90.32), it can be claimed that the cows will later be cooled from production. If the value of N: L correlation is about 0.65 with 90% confidence it can be assumed that the cows will remain in the herd (sensitivity 90.92). The area under the ROC curve was 0.751, which confirms a significant association between the values of N:L correlation after parturition and cooling the cows from the farm ($p \sim 0.01$). 72% of cows with the value N:L >1.05 were cooled from production for 12 months, versus 20% of excluded cows with N:L <0.5. The neutrophils to lymphocytes ratio in early lactation is a useful indicator for assessing the risk of cooling the cows from production.

Key words: dairy cows, puerperium, neutrophyle, lymphocyte, stress, risk

UVOD

Analiza leukograma kod goveda omogućuje procenu zdravlja, stresne opterećenosti, monitoring infekcija i slično. Odnos neutrofila i limfocita (N:L odnos) je značajan pokazatelj zdravlja i stresne opterećenosti životinja (Davis i sar., 2008). Fiziološki je ovaj odnos kod odraslih goveda $\sim 0,5:1$. U periodu oko teljenja kod krava postoji tipičan stresni leukogram, koji se odlikuje neutrofilijom, limfopenijom, eozinopenijom i varijabilnom monocitozom. Akutni stres i hiperkortizolemija dovode do porasta koncentracije neutrofila povlačenjem ovih ćelija u centralni pul krvotoka, dok limfociti migriraju ka periferiji, tako da dolazi do porasta odnosa neutrofila i limfocita (N:L odnos često preko 1) (Tornquist i Rigas, 2010). Posle adaptacije na stresne uslove N:L odnos se vraća na fiziološki nivo u periodu 2-7 dana (Lynch i sar., 2010).

Bertoni i sar. (2003) su našli smanjen odnos neutrofila i limfocita na farmama sa dobrom negom i dobrim medicinskim tretmanom krava. Novija istraživanja pokazuju da N/L odnos može biti veći od 1 kod potpuno zdravih krava (George i sar, 2010), pa se upotreba ovog indikatora mora vršiti uz sagledavanje njihovog kompletnog zdravlja i metabolizma.

Predpostavili smo da krave pod prolongiranim stresom posle teljenja (7-15 dana) imaju značajno višu vrednost N:L odnosa. Cilj ovog istraživanja je da se utvrdi granična vrednost i klinički značaj N:L odnosa u proceni isključenja krava iz proizvodnje u laktaciji koja sledi.

MATERIJAL I METODE

U toku rutinskog hematološkog pregleda kod 114 krava 7-15 dana posle partusa ispitivali smo broj neutrofila i limfocita kao i odnos neutrofila i limfocita. Analize su vršene automatski, pomoću uređaja *Hemavet 950*. Ove krave su praćene tokom laktacije, kako bi se utvrdilo da li su i kada isključene iz proizvodnje.

Određivanje granične vrednosti N:L odnosa, koja je značajan prediktor za isključenje krava iz proizvodnje, vršena je ROC analizom (*Receiver Operator Characteristic*). ROC analiza nam omogućuje da ispitamo odnos između senzitivnosti i specifičnosti upotrebe N:L odnosa u proceni isključenja krava iz proizvodnje tako što se bira ona vrednost N:L koja pokazuje najbolji odnos specifičnosti i senzitivnosti. Senzitivnost se definiše kao proporcija krava koje su isključene iz proizvodnje, a čija je vrednost N:L odnosa iznad određene granice (stvarno pozitivan nalaz), dok je specifičnost proporcija krava koje nisu isključene iz proizvodnje, a čija je vrednost odnosa ispod date granice (stvarno negativan nalaz). Interpretacija kritičke vrednosti bazirana je na osnovu površine ispod ROC krive (*AUC – area under the curve*), tako da je vrednost $AUC = 0,5$ smatrana beznačajnom, vrednost $0,5 < AUC \leq 0,7$ značajnom, $0,7 < AUC \leq 0,9$ veoma značajnom, $0,9 < AUC < 1$ visoko značajnom i $AUC = 1$ savršenom.

Formirana je Kaplan-Majerova kriva preživljavanja, tako da je vreme preživljavanja u našoj krivoj zapravo vreme od teljenja do isključenja krave iz proizvodnje.

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati istraživanja pokazuju da kod krava u periodu posle teljenja raste N:L odnos na taj način što raste broj neutrofila, a opada broj limfocita. Ovakav leukogram je tipičan u peripartalnom periodu (Belić i sar., 2011) i nastaje kao posledica delovanja kortizola (Detilleux i sar., 1995).

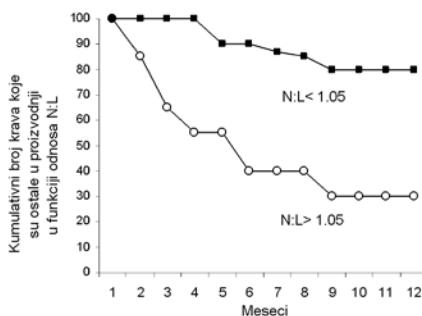
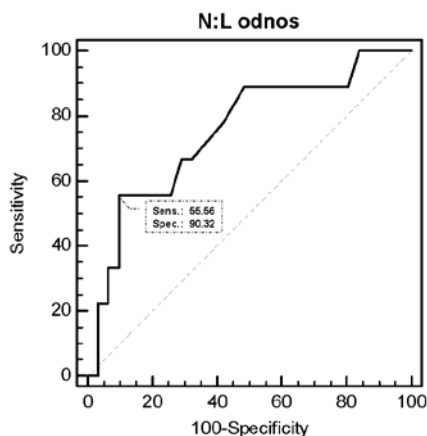
Granična vrednost N:L odnosa koja najbolje deli krave koje će biti isključene iz proizvodnje od onih koje će u proizvodnji ostati u laktaciji koja sledi je 1,05. Ako je N:L odnos na ovom nivou sa više od 90% (specifičnost 90,32) verovatnoće možemo tvrditi da će krave biti kasnije isključene iz proizvodnje. Ako je vrednost N:L odnosa oko 0,65 sa preko 90% sigurnosti možemo pretpostaviti da će krave ostati u zapatu (senzitivnost 90,92) (Tabela 1). Površina ispod ROC krive je 0,751, tj. u opsegu $0,7 < AUC \leq 0,9$, što potvrđuje veoma značajnu vezu između vrednosti N:L odnosa posle partusa i isključenja krava sa farmi ($p \sim 0,01$) (Tabela 2, Grafik 1). Drugi metod koji potvrđuje da je granična vrednost N:L od 1,05 značajna je grafik Kaplan-Majerove krive preživljavanje. 72% krava čija je vrednost N:L $> 1,05$ je bilo isključeno iz proizvodnje tokom narednih 12 meseci (Grafik 2). Sa druge strane, isključeno je 20% krava čiji je N:L odnos bio $< 1,05$. Ova razlika je signifikantna ($p < 0,01$). U hemogramu 80 ispitanih krava N:L odnos je bio ispod izračunate granične vrednosti, dok je vrednost iznad granične nađena kod 34 krave. Od 42 krave 16 je isključeno zbog mastitisa, 11 zbog endometritisa, 6 zbog bolesti akropodijuma, 4 zbog ketotičnih epizoda, 3 zbog dislokacije abomazuma i 2 zbog hemoragičnog jejunuma.

Tabela 1: Granične vrednost N:L odnosa i njihova specifičnost i senzitivnost u proceni isključenja krava iz proizvodnje

Kriterijum	Senzitivnost	Specifičnost
$>0,6$	100,00	16,13
$>1,05^*$	55,56	90,32
$>1,1$	33,33	90,32
$>1,15$	0,00	100,00

Tabela 2: Statistička značajnost upotrebe N:L odnosa kao indikatora u proceni isključenja krava iz proizvodnje

Površina ispod ROC krive (AUC)	0,751
Standardna greška	0,0985
95% interval pođdanosti	0,589 to 0,874
Z statistika	2,547
Nivo značajnosti P (površina=0,5)	0,0109



Grafik 1: ROC kriva za graničnu vrednost sa optimalnim odnosom specifičnosti i senzitivnosti

Grafik 2: Kaplan-Majerova kriva preživljavanja

Krave koje 7-15 dana posle teljenja imaju N:L odnos preko fizioloških vrednosti nalaze se u fazi prolongiranog stresa. Taj prolongirani stres može biti uzrokovan prolongiranim metaboličkim stresom sa povišenim vrednostima NEFA i BHB i sniženom vrednošću glikemije koji se javlja kod određenog broja krava posle teljenja. Koncentracija ovih metabolita značajno korelira sa N:L odnosom (Belić i sar., 2011a). Različite peripartalne upale, hirurška stanja i drugi poremećaji dovode do povišenog N:L odnosa (Tornquist i Rigas, 2010), što se može povezati sa kasnijim isključenjem krava iz proizvodnje. Poznato je da epizodno i kumulativno delovanje stresa dovodi do izmena i kompromitovanja imunog sistema i sklonosti ka upalama (Blecha, 2000). U jednom ogledu Thanasak-a i sar. (2004) su ispitali uticaj aplikacije deksametazona na funkciju limfocita u drugoj nedelji posle partusa. Aplikacija deksametazona dovela je do značajnog porasta N:L odnosa, koji je predhodno bio u okviru fizioloških granica, na račun porasta broja neutrofila. Dakle, veštačkim podražavanjem akutne stresne reakcije dolazi do značajnog porasta broja neutrofila u nedeljama posle partusa, što objašnjava našu predpostavku da krave sa povećanim N:L odnosom u periodu 7-14 dana posle partusa najverovatnije pate od prolongiranog stresa. Vrednost odnosa N:L preko 1 govori da su krave opterećene inflamacijom ili drugim stresorima (Latimer i sar., 2003), sa čime se približno slaže rezultat koji smo dobili.

ZAKLJUČAK

Optimalna granična vrednost N:L odnosa, dobijena iz uzorka krvi uzete 7-15 dana posle partusa, koja ukazuje da će krave biti isključene iz proizvodnje je 1,05. 72% krava čija je vrednost N:L >1,05 je bilo isključeno iz proizvodnje tokom 12 meseci. Odnos neutrofila i limfocita u ranoj laktaciji je koristan indikator za procenu rizika od isključenja krava iz proizvodnje. Ovim se potvrđuje da je N:L odnos značajan u proceni zdravlja i stresne opterećenosti krava.

LITERATURA

1. Belić B., Cincović M.R., Krčmar Lj., Vidović B.: Reference values and frequency distribution of hematological parameters in cows during lactation and in pregnancy. *Contemporary agriculture*, 60,1/2, 145-151, 2011.
2. Belić B., Cincović M.R., Stevančević M., Toholj B.: Parameters of negative energy balance (NEFA, BHB and glucose) and neutrophil to lymphocyte ratio in cows after calving – comparison of two indicators of stress. In: Proceedings, 12th Middle European Buiatric Congress, Pula, Croatia, May 18-22, 281-284, 2011.
3. Belić B., Cincović M.R., Stevančević M., Božić A., Stojanović D., Kovačević Z.: Peripartalni hematološki nalaz kod mlečnih krava u cilju predviđanja sklonosti ka nastanku metritisa i mastitisa. U: Zbornik XIX inovacije znanja u stočarstvu, Zemun, 54, 2010.
4. Bertoni G., Trevisi E., Ferrari A., Archetti I.: Preliminary studies on compatibility between high yield levels and the well-being of dairy cows. *Vet Res Commun*, 27(Suppl 1), 639-641, 2003.
5. Blecha F: Immune System Response to Stress, in: The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare, Moberg G.P. and Mench J.A. (editors), CABI Publishing, 111-121, 2000.
6. Davis A.K., Maney D.L., Maerzl J.C.: The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22, 760-772, 2008.
7. Dettleux J.C., Kehrl M.E., Stabel J.R., Freeman A.E., Kelley D.H.: Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Vet Immunol Immunopathol*, 44, 251-267, 1995.
8. George J.W., Snipes J., Lane V.M.: Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. *Vet Clin Pathol* 39, 2, 138-148, 2010.
9. Thanasak J., Jorritsma R., Hoek A., Noordhuizen J., Rutten V., Müller K.E.: The effects of a single injection of dexamethasone-21-isonicotinate on the

- lymphocyte functions of dairy cows at two weeks post partum. *Vet. Res.*, 35, 103–112, 2004.
10. Latimer K.S., Prasse K.W.: Leukocytes. In: Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW, eds. *Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology*. 4th ed. Ames, IA: Iowa State Press, 46–79, 2003.
 11. Lynch E.M., Earley B., McGee M., Doyle S.: Characterisation of physiological and immunological responses in beef cowsto abrupt weaning and subsequent housing. *BMC Veterinary Research*, 6, 37, 2010.
 12. Tornquist S.J., Rigas J.: Interpretation of Ruminant Leukocyte Responses, In: *Schalms veterinary hematology*. 6th edition, Weiss, D.J. (ed), Wardrop, K.J. (ed), Wiley-Blackwell, 307-313, 2010.

Primljeno: 15.02.2012.

Odobreno: 20.05.2012.