



Original Research Paper

Evaluation of cervical cytology in estrous postpartum anestrous cows has been treated according to CoSynch protocol with normal dairy cows

*Behrooz Mihandoost**, *Meisam Makki*, *Saad Gooraninejad*

Department of clinical science, Faculty of veterinary medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Key Words

Cytological examination
Cervical discharge
CoSynch protocol
Heat day
Dairy cow

Abstract

Introduction: Cytological examination of the reproductive tract is often used to evaluate possible reproductive lesions in humans and domestic animals. Cytological method has been used to determination of the subclinical endometritis in the cattle. There was no information about cytological cervical cervix in anestrous cow. The aim of this study was to compare cervical cytology between normal postpartum and anestrus cow that treat by ovulation synchronization in heat day.

Materials & Methods: This prospective cohort study was performed on 50 estrous Holstein cows with various days in milk (DIM) and parity (2-4), in a moderate commercial dairy herd in susangerd, of Ahvaz province, southern Iran, from April to December 2022. Cervical mucus was aspirated with a pipette. Giemsa stain Cytological assessment determined the percent neutrophils (percentage PMN) by counting a minimum of 100 cells at 400× magnification, in order to provide a quantitative assessment of ratio %PMN to % epithelial cell.

Results: No significant differences were observed in ratio % PMN with %epithelial cell in smears of cows between anestrus cow that treatment by CoSynch and control in heat day. As well as, in our study the mean neutrophil percentage according to the parity of cows between the two groups done. Although the neutrophil percentage was higher in parity 2 in the CoSynch group, this difference was not significant ($p \geq 0.05$).

Conclusion: The findings indicate that anestrus dairy cow treated with synchronization of ovulation protocols in estrus day no difference of % PMN with %epithelial cell ratio in cytological smears.

* Corresponding Author's email: behrooz.mihandoost@scu.ac.ir

Received: 28 January 2023; Reviewed: 16 March 2023; Revised: 1 May 2023; Accepted: 3 June 2023

(DOI): [10.22034/AEJ.2023.392724.2957](https://doi.org/10.22034/AEJ.2023.392724.2957)

مقاله پژوهشی

ارزیابی مقایسه‌ای سیتولوژی دهانه رحم در روز فحلی در گاوهای آنستروس پس از زایمان که با پروتوکول کوسینک فحل شده با گاوهایی که به‌طور طبیعی فحل شده‌اند

بهروز میهن‌دوست^{۱*}، میثم مکی^۲، سعید گورانی‌نژاد^۲

^۱ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

مقدمه: آزمایش سیتولوژی دستگاه تناسلی اغلب برای ارزیابی ضایعات احتمالی تولیدمثلی در انسان و حیوانات اهلی استفاده می‌شود. برای تعیین اندومتریت تحت بالینی در گاو از روش سیتولوژیک استفاده شده است. اطلاعاتی در مورد سیتولوژی دهانه رحم در گاو آنستروس وجود ندارد. هدف از این مطالعه مقایسه سیتولوژی دهانه رحم در روز فحلی بین گاوهای طبیعی پس از زایمان و گاوهای آنستروسی است که با همگام سازی تخمک‌گذاری فحل شده‌اند، می‌باشد.

ارزیابی سیتولوژی پروتوکول کوسینک ترشحات گردن رحم روز فحلی گاوشیری

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی گاوهای شیری هلستاین فریزین در گله‌های نیمه‌صنعتی مجتمع گاوداری‌های جلیزی در شهرستان سوسنگرد در استان خوزستان از اردیبهشت ماه تا دی ماه ۱۴۰۱ صورت پذیرفت. حیوانات مورد مطالعه در شکم‌های زایش ۲ الی ۴ با جیره یکسان با استاندارد NRC ۲۰۰۱ انتخاب شدند. مخاط گردن رحم حیوانات مورد آزمایش توسط پپیت و سرنگ اخذ گردید و بر روی لام قرار داده شد. سپس توسط متانول فیکس شده و در آزمایشگاه به‌روش گیمسا رنگ‌آمیزی شد. حداقل ۱۰۰ سلول به‌منظور ارزیابی کمی نسبت سلول‌های اپیتلیال و نوتروفیل‌ها لام‌های رنگ شده با بزرگ‌نمایی $\times 400$ شمارش شد.

نتایج: تفاوت معنی‌داری بین درصد سلول‌های اپیتلیال و درصد نوتروفیل‌های گروه شاهد و درمانی دیده نشد. هم‌چنین در گروه‌های مورد مطالعه، میانگین درصد نوتروفیل‌ها به شکم زایش در گروه شاهد ۲ برابر گروه درمانی بود، اما اختلاف معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: یافته‌های این تحقیق نشان داد که سیتولوژی مخاط گردن رحم بین گاوهایی که با پروتوکول کوسینک فحل شده با گاوهای طبیعی در روز فحل اختلاف معنی‌داری ندارند.

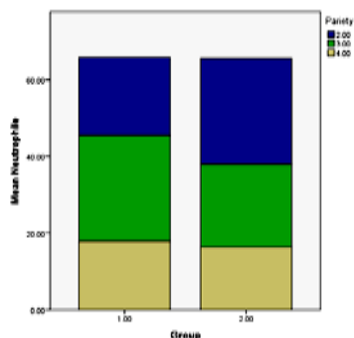
مقدمه

ارزیابی سیتولوژی دستگاه تناسلی اغلب برای ارزیابی ضایعات احتمالی باروری در انسان و حیوانات اهلی استفاده می‌شود. بررسی سیتولوژیک دهانه رحم در زنان (۱) و بررسی سیتولوژیک آندومتر در مادیان (۲) و گاوها (۳) فن‌آوری‌های تشخیصی پذیرفته شده‌ای هستند. سلول‌های آندومتر و سلول‌های التهابی ممکن است توسط سوآپ پنبه‌ای (۴) بیوپسی از رحم (۵،۴) می‌تواند جمع‌آوری شود. روش سیتولوژیک برای تعیین آندومتریس تحت بالینی در گاو استفاده شده است (۶، ۷). همبستگی منفی معنی‌داری بین درصد نوتروفیل در مخاط دهانه رحم و روزهای پس از زایمان وجود داشت (۸). ارزیابی سیتولوژی دهانه رحم در گاو تازه‌زا برای تشخیص آندومتریس تحت بالینی، برنامه‌ریزی برای درمان و پیش‌آگهی باروری پس از دوره انتظار اختیاری در گاوهای شیری مناسب است. تفاوت معنی‌داری بین اسمیر دهانه رحم و رحم‌های کشتارگاهی در گاوهای سالم و مبتلا به آندومتریس وجود نداشت (۹). در مطالعه Makki و همکاران یکی از مهم‌ترین عوامل مستعدکننده برای سایر بیماری‌های بعد از زایمان و در نتیجه آن ناباروری می‌باشد، ارتباط آن با عواملی چون تغذیه، تعداد شکم‌زایش، جفت ماندگی و متریس از طریق آزمون مربع کای بررسی و نسبت خط رو نسبت شانس برای هر عامل تعیین گردید (۱۰). عنوان پروتوکل Ovsynch توسط Pursley پیشنهاد شد که به معنای همگام‌سازی تخمک‌گذاری، پس از آن زمان مورد استفاده قرار گرفت (۱۱). روش اوسینک بدین شکل در گاوهای مورد استفاده قرار می‌گیرد که یک دوز GnRH در روز صفر و بعد تزریق PGF2 α در روز هفتم و دو روز بعد GNRH تزریق و سپس بین ۱۶ الی ۲۴ ساعت بعد تلقیح انجام می‌شود. این پروتوکل معنای القای تخمک‌گذاری را به‌خوبی نشان می‌دهد (۱۲). بیش از نیم‌قرن از این پروتوکل در گاوهای شیری برای مقاصد مختلف درمانی استفاده می‌شود و این پروتوکل در طی این سال‌های متمادی تکامل پیدا کرده و روش‌های هم‌زمان‌سازی از دل این پروتوکل بیرون آمده‌است. یکی از این روش‌ها CoSynch می‌باشد که درست مشابه روش قبلی است با این تفاوت پس از تزریق GnRH دوم (روز ۹) هم‌زمان تلقیح صورت می‌گیرد (۱۱)، (۱۲). نرخ آبستنی حاصل از این روش‌ها توسط Pursley و همکاران گزارش شده است (۱۳). مطالعاتی در مورد سیتولوژی دهانه رحم در گاو آنتروسی وجود ندارد. هدف از این مطالعه مقایسه سیتولوژی دهانه‌رحم در روز فحلی بین گاوهای طبیعی پس از زایمان و گاوهای آنتروسی است که با همگام‌سازی تخمک‌گذاری فحل شده‌اند، می‌باشد.

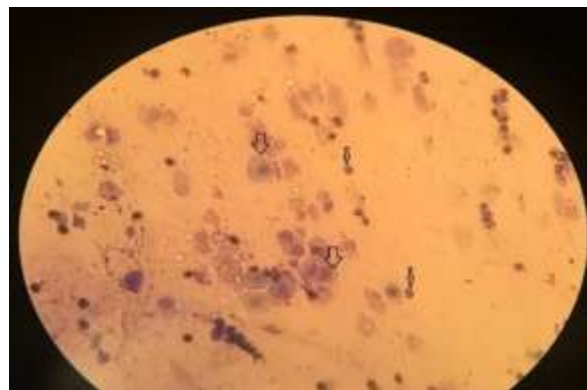
مواد و روش‌ها

حیوانات: مطالعه حاضر بر روی گاوهای شیری هلشتاین فریزین در گله‌های نیمه‌صنعتی مجتمع گاوداری‌های جلیزی واقع در شهرستان سوسنگرد استان خوزستان، از اردیبهشت‌ماه تا دی‌ماه ۱۴۰۱ صورت پذیرفت. حیوانات مورد مطالعه در شکم‌های زایش ۲ الی ۴ انتخاب شدند. این منطقه دارای آب و هوای گرم با چهار فصل متمایز، با دمای اوج در تابستان حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سردترین دما در زمستان زیر صفر می‌باشد. گاوها جیره متعادل برابر با استاندارد NRC ۲۰۰۱ دریافت می‌کردند. جیره گاوها شامل یونجه خشک، سیلو ذرت، کنسانتره (شامل دانه ذرت و جو، سیوس، گندم، ویتامین‌ها و مواد معدنی) بود و به‌صورت مخلوط در بین بهاربندها پخش می‌شد. حیوانات در سیستم گروهی باز حیاطدار نگاه‌داری می‌شدند. در این مطالعه، ۵۰ راس گاو شیری شامل ۲۵ راس سالم (فاقد اختلالات و بیماری‌های بالینی) و ۲۵ راس گاو که دچار آنتروتوس بودند انتخاب شدند. چرخه‌های تولیدمثلی حیوانات غیرفصلی و در تمام طول سال وجود داشت. گاوهای آنتروتوس با دو بار معاینه سونوگرافی و عدم فحلی بالای دو بار مشخص شده و گاوهای آنتروتوسی که به درمان پاسخ داده بودند برای این مطالعه در نظر گرفته شدند. اطلاعات حیوانات مورد مطالعه در روز معاینه فحلی از قبیل شماره بدنی (۱۴)، نوع فحلی (طبیعی یا با استفاده از پروتوکل هورمونی)، تاریخ معاینه، ساعت مشاهده علائم فحلی و نیز تعداد شکم (گاوهای این مطالعه در محدوده شکم زایش ۲ تا ۴ بودند) ثبت شد. سیاست کلی گله‌ها تلقیح مصنوعی، تلقیح در زمان ثابت (با استفاده از پروتوکل‌های هم‌زمان‌سازی) و مشاهده فحلی توسط کارگر فحل‌یاب بود. علاوه بر کارگر فحل‌یاب از دوربین مداربسته نیز کمک گرفته می‌شد و گزارش‌های روز فحلی ثبت می‌شد. تلقیح مصنوعی توسط یک تکنیسین آموزش دیده انجام می‌شد.

سیتولوژی مخاط گردن رحم: پس از ضدعفونی کردن فرج دام با مواد ضدعفونی‌کننده، با استفاده از پپیت و سرنگ یک‌بار مصرف، مخاط گردن رحم جمع‌آوری شد. پس از تهیه گسترش از مخاط گردن رحم و تثبیت نمودن آن با استفاده از متانول روی لام به آزمایشگاه برای رنگ‌آمیزی گیمسارسال شد. با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی $\times 400$ به بررسی درصد نوتروفیل‌ها و سلول‌های اپیتلیال در دو گروه شاهد و درمانی پرداخته شد (شکل ۱). حداقل ۱۰۰ سلول به‌منظور ارزیابی کمی نسبت سلول‌های اپیتلیال و نوتروفیل‌ها لام‌های رنگ‌شده با بزرگ‌نمایی $\times 400$ شمارش شد (۱۵).



شکل ۲: نمودار میانگین درصد نوتروفیل‌ها براساس شکم زایش گاوه‌های مورد مطالعه در دو گروه شاهد (گروه ۱) و گروه درمانی (گروه ۲) در روز فحلی



شکل ۱: گسترش تهیه شده از سیتولوژی دهانه رحم در گاوه‌های شیری با رنگ آمیزی گیمسا اصلاح شده. نوتروفیل (پیکان باریک) سلول اپیتلیال (پیکان بزرگ) بزرگ‌نمایی $\times 400$

بحث

مهم‌ترین مرحله از چرخه تولیدمثلی در گاو فحلی است. این گامه از چرخه تولیدمثل در گاو شیری در گله‌های صنعتی حدود ۸ ساعت می‌باشد. در این گامه است که گاو ماده تلقیح می‌شود و آینده تولیدمثلی و تولید گوساله و تولید شیر به این مرحله بستگی دارد. حقیقتاً کاهش مقادیر باروری در اولین تلقیح در مقطعی از زمان، معیار با ارزشی است. در سال ۱۹۹۸، Butler در مقاله‌ای اطلاعات به‌دست آمده از گاوه‌های شیری نیویورک را بررسی کرده است که در آن کاهش معیار باروری در اولین تلقیح از ۶۵٪ در سال ۱۹۵۱ به ۴۰٪ در سال ۱۹۹۶ را نشان داده است (۱۶). در سال ۲۰۰۱، Lucy و همکاران در بررسی دیگری همین نتیجه را در همین بازه زمانی نشان داد (۱۷). بنابراین اکثر مطالعات نشان می‌دهد که مقادیر باروری در اولین تلقیح حدود ۴۵-۴۰٪ است. ارزیابی سیتولوژی دستگاه تناسلی اغلب برای ارزیابی ضایعات احتمالی باروری در انسان و حیوانات اهلی استفاده می‌شود. بررسی سیتولوژیک دهانه رحم در زنان (۱) و بررسی سیتولوژیک آندومتر در مادبان (۲) و گاوها (۳) فن‌آوری‌های تشخیصی پذیرفته شده‌ای هستند. در مطالعه اخیر، هیچ گونه تفاوت معنی‌داری در نسبت درصد نوتروفیل‌ها با درصد سلول‌های اپیتلیال در گسترش گاوها بین دو گروه در روز فحلی مشاهده نشد. در مطالعه Ahmadi و همکاران، همبستگی منفی معنی‌داری بین درصد نوتروفیل‌ها در مخاط دهانه رحم و روزهای پس از زایمان وجود داشت (۸). در مطالعه حاضر گاوها در روز فحلی مورد ارزیابی قرار گرفتند اما در مطالعات دیگران در دوران بارداری و پس از زایمان می‌باشد. در مقاله Makki و همکاران، تاثیر عواملی چون تعداد شکم زایش، فصل زایمان، وضعیت تغذیه، سخت‌زایی و جفت‌ماندگی به عنوان فاکتورهای مستعدکننده متریت بررسی شد (۱۰). هم‌چنین

تحلیل آماری: داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱؛ SPSS Inc., Chicago, USA) تجزیه و تحلیل شدند. داده‌های توصیفی به‌صورت میانگین و خطای استاندارد میانگین (SEM) ارائه شد. آزمایش سیتولوژیک با استفاده از آزمون ANOVA یک‌طرفه برای تعیین تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها انجام شد. میانگین تعداد نوتروفیل‌ها در گروه‌های تیمار مختلف براساس پاریته با استفاده از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه مقایسه شد.

نتایج

تفاوت معنی‌داری در نسبت درصد نوتروفیل‌ها نسبت به درصد سلول اپیتلیال در گسترش لام بین گاوه‌های انستروس که با پروتوکول کووسینک درمان شده بودند و گروه شاهد در روز فحلی مشاهده شد ($P=0/79$). میانگین درصد نوتروفیل براساس شکم زایش حیوانات در دو گروه را می‌توان با مشاهده شکل ۲ تجزیه و تحلیل کرد. اگر چه درصد نوتروفیل در شکم ۲ در گروه کووسینک بیش‌تر بود، اما این تفاوت معنی‌دار نبود ($P \geq 0/05$).

جدول ۱: میانگین (\pm انحراف معیار) درصد سلول‌های مخاط گردن رحم گاوه‌های پس از زایش بین دو گروه درمانی و شاهد در روز فحلی

گروه	تعداد	نوتروفیل	سلول اپیتلیال
شاهد	۲۵	$23/16 \pm 2/00$	$76/84 \pm 2/00$
درمان شده با پروتوکول کووسینک	۲۵	$21/80 \pm 1/6/87$	$78/20 \pm 1/6/87$

11. **Wiltbank, M.C. and Pursley, J.R., 2014.** The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology*. 81: 170-185.
12. **Pursley, J.R., Kosorok, M.R. and Wiltbank, M.C., 1997.** Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci*. 80: 301-306.
13. **Pursley, J.R., Wiltbank, M.C., Stevenson, J.S., Ottobre, J.S., Garverick, H.A. and Anderson, L.L., 1997.** Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci*. 80: 295-300.
14. **Kamali, S., Makki, M., Ahmadi, M., Pourmehdi, M., 2019.** Consideration the relationship between the decrease in body score after parturition, season, parity on incidence of clinical mastitis in dairy cows. *Journal of Animal Environment*. 12: 31-36. (In Persian)
15. **Jain, N.C., 1986.** Schalm's veterinary haematology. Philadelphia: Lea and Febiger.
16. **Butler, W.R., 1998.** Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 81(9): 2533-2539.
17. **Lucy, M.C., Jiang, H. and Kobayashi, Y., 2001.** Changes in the Somatotrophic Axis Associated with the Initiation of Lactation. *J Dairy Sci*. 84: 113-118.

مطالعه دیگری که بر روی ۷۱۹ گاو شیری پس از زایش در روز فحلی انجام شد، تفاوت معنی‌داری در نسبت درصد نوتروفیل‌ها به سلول‌های اپیتلیال در گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده دیده نشد (داده‌های منتشر نشده). ممکن است که تعداد گاوهای گروه‌های مورد مطالعه به اندازه کافی نبوده باشد. اگرچه یافتن گاو در روز فحلی در روزهای مختلف ماه بسیار دشوار و زمان بر است. هم‌چنین در مطالعه اخیر میانگین درصد نوتروفیل با توجه به شکم زایش گاوها بین دو گروه انجام شد. اگرچه درصد نوتروفیل در شکم ۲ در گروهی که با کوسینک درمان شده بودند بیشتر بود، اما این تفاوت معنی‌دار نبود ($P \geq 0.05$). یافته‌های حاضر نشان می‌دهد که گاو شیری آنستروس تحت درمان با پروتکل‌های هم‌زمان‌سازی تخمک‌گذاری، در روز فحلی تفاوت بین درصد نوتروفیل‌ها با نسبت درصد سلول‌های اپیتلیال در گسترش‌های سیتولوژیک ندارد.

منابع

1. **Glenthoj, A. and Bostofte, E.F.R., 1986.** Brush cytology from the uterine endocervix. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 65: 689-891.
2. **Digby, N.J., 1987.** The technique and clinical application of endometrial cytology in mares. *Equine Vet J*. 10: 176-180.
3. **Hammon, D.S., Holyoak, G.R. and Jensen, J.H.R.B., 2001.** Effects of endometritis at the beginning of the breeding period on reproductive performance in dairy cows. *Proc 34th Annu Conf Am Assoc Bov Pract, Vancouver*. 142-143.
4. **Studer, E.D.A.M., 1978.** Postpartum evaluation of bovine reproductive potential: Comparison of findings from genital tract examination per rectum, uterine culture and endometrial biopsy. *J Am Vet Med Assoc*. 172: 489-894.
5. **Bourke, M., Mills, J.N. and AL, B., 1997.** Collection of endometrial cells in the mare. *Aust Vet J*. 75(7): 8-55.
6. **Ahmadi, M.R., Tafti, A.K., Nazifi, S. and Ghaisari, H.R., 2005.** The comparative evaluation of uterine and cervical mucosa cytology with endometrial histopathology in cows. *Comp Clin Pathol*. 14: 90-94.
7. **Kasimanickam, R., Dueld, T.F., Foster, R.A., Gartley, C.J., Leslie, K.E. and Walton, J.S., 2004.** Endometrial cytology & ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 62: 9-23.
8. **Ahmadi, M.R., Nazifi, S. and Ahmadi, S., 2001.** Relationship of differential leukocyte count in uterine cervical mucus and blood with reproductive function of postpartum cows. *Iran J Vet Res*. 2: 107-117.
9. **Ahmadi, M.R., Nazifi, S. and Ghaisari, H.R., 2006.** Comparison of hormonal changes of estrus cycle with cytology of cervical mucosa and hematological parameters in dairy heifers. *Comp. Clin Pathol*. 15: 94-97.
10. **Makki, M., Gooraninejad, S. and Seyed Sadr, M.N.N., 2021.** Consideration the relationship between sub fertility & its predisposing factors in the referral cows of Veterinary Hospital of Shahid Chamran University of Ahvaz. *Journal of Animal Environment*. 13: 55-58. (In Persian)