



METODY HODNOCENÍ OBSAHU PROGESTERONU V MLÉCE PŘI DIAGNOSTICE BŘEZOSTI DOJNIC POMOCÍ PŘÍSTROJE FRIMTEC

Pavel Hering¹, Jan Říha¹, Jana Vachoušková²,
Hana Nejeschlebová¹, Martin Loukota³,
Zdeňka Hegedúšová⁴, Oto Hanuš⁵

¹ Bentley Czech, s.r.o., Praha, ² Úněšovský statek, a.s.,

³ AG Produkt, a.s., ⁴ Taura ET s.r.o., Litomyšl,

⁵ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

Methods of evaluation of progesterone content in milk in diagnosis of pregnancy in dairy cows by FrimTec instrumentation

Abstrakt

Progesteron (PG) je hlavním hormonem žlutého tělíska (corpus luteum) a patří mezi gestageny. Hormon připravuje děložní sliznici pro přijetí vajíčka, zabraňuje děložním stahům a tím chrání graviditu. Na vaječnicích progesteron inhibuje za gravidity dozrávání nových vajíček a tím blokuje nástup dalších říjí a ovulací. Metoda progesteronového testu je založena na sledování kolísání hladiny hormonu progesteronu v samičím organismu během estrálního cyklu. V období říje je hladina progesteronu nízká, po zabřeznutí se hladina progesteronu zvyšuje a zůstává vysoká po celou dobu březosti. Ke stanovení progesteronu se využívá metody ELISA, která umožní zjištění obsahu progesteronu během několika minut. První vzorek mléka se odebírá v den inseminace, další v období kolem 21. dne březosti, další možný odběr vzorku je v období kolem 42. dne březosti, kdy se vysokým obsahem progesteronu vyloučí případná embryonální mortalita. V chovech byly odebrány vzorky od 43 dojnic. Byly použity 3 metody hodnocení výsledků progesteronového testu – 2 s použitím diskriminačních limitů pro hodnocení březosti pro obsah progesteronu ve dni inseminace a 21. dni po inseminaci (metoda 1),

resp. pro obsah progesteronu v 21. dni po inseminaci (metoda 2) a hodnocení výsledků obsahu progesteronu ve dni inseminace a 21. den po inseminaci pomocí algoritmu strojového učení (metoda 3). Sensitivita metod kolísá od 0,75 do 0,96 a specifita od 0,58 do 0,84. Jako nejpoužitelnější v praxi se ukazují metoda 2 a 3 s následným re-testem u skupin výsledků s nižší spolehlivostí.

Klíčová slova: progesteron, dojnice, vzorek mléka, inseminace, říje, březost

Abstract

Progesterone (PG) is the main hormone of the corpus luteum and is one of the gestagens. This hormone prepares the uterine mucosa for egg intake, prevents uterine contractions and thereby protects pregnancy. On the ovaries, progesterone inhibits the maturation of new eggs during pregnancy, thereby blocking the onset of further heat and ovulation. The progesterone test method is based on monitoring of fluctuations in the level of the hormone progesterone in the female organism during the oestral cycle. Progesterone levels are low during the heat season, and after pregnancy the progesterone level increases and remains high throughout pregnancy. For the determination of progesterone, an ELISA method is used which allows the determination of the progesterone content within a few minutes. The first milk sample is taken on the day of insemination, the next one around the 21st day of pregnancy, another possible sample is around the 42nd day of pregnancy, when a high content of progesterone excludes possible embryonic mortality. Samples from 43 dairy cows were sampled. Three different methods for progesterone content have been evaluated. Two of them use different discrimination limits for pregnancy evaluation using data from the day of insemination and 21st day after insemination (method 1), data from 21st day after insemination (method 2). The third method applies a machine learning algorithm for induction of decision trees on the results of the test in the both dates. Sensitivity of methods ranges from 0.75 – 0.96 and specificity from 0.58 – 0.84. Based on results, methods 2 and 3 are recommended for practical usage once groups of

results with lower reliability are recommended to be re-tested again for better results.

Keywords: progesterone, dairy cow, milk sample, insemination, heat, pregnancy

Úvod

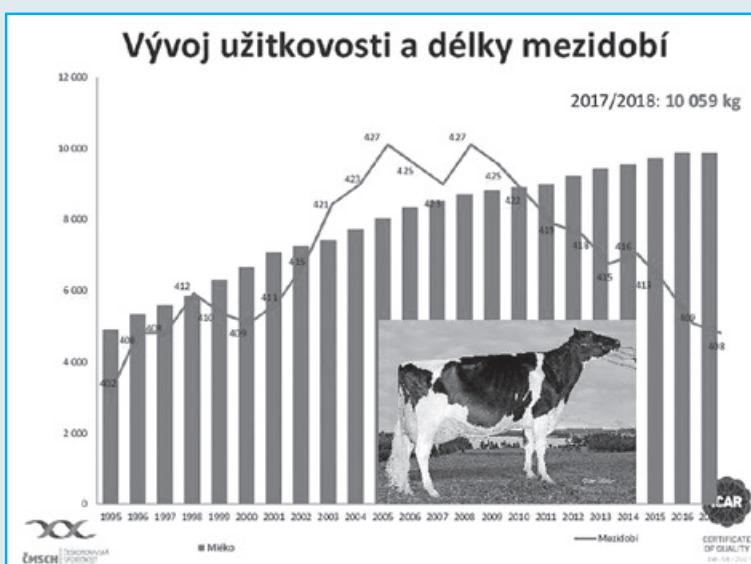
Rámec problému a současný stav

V chovu dojeného skotu dochází již několik let ke koncentraci zvířat do větších stájí, kde je možno využít nejmodernější stájovou a dojící techniku, čímž se výrazně zlepšují ekonomické ukazatele výroby syrového kravského mléka. Spolu s tím se neustále zvyšuje užitkovost dojnic. Co se však dlouho zhoršovalo a nyní se jen pozvolna zlepšuje, jsou jejich reprodukční ukazatele. Zatímco v kontrolním roce 1999 - 2000 průměrná délka mezidobí vykazovala hodnotu pod 400 dní, následující léta se délky mezidobí pohybovaly již nad tuto hranici. S rostoucí dojivostí se tedy dlouhodobě zhoršovaly ukazatele reprodukce krav (mezidobí, servis perioda, inseminační index; KVAPILÍK et al., 2007, 2014) a prodlžovaly laktace. Zmíněné ukazatele se však již přibližně deset let (9 až 12) u majoritně dojených plemen zase zlepšují (mezidobí o 4,8 %), což je jednoznačně pozitivní informace (Holštýn o 4,4 %, tzn. o 19 dní, z 427 na 408 dní; České strakaté o 5,2 % a 21 dní, z 401 na 390 dní; KVAPILÍK et al., 2017, 2019; KUČERA, 2018 (Obr. 1 a 2)). Tato skutečnost naznačuje lepší se zdraví a zvládnutí fyziologických požadavků zvířat, lepší welfare a všechny technologické podmínky jejich chovu. V tomto trendu je však třeba dále pokračovat a jednou z cest je i zlepšování technologie procesu kontroly reprodukce dojnic, např. vyhledávání říje a potvrzování březosti.

Jedním ze základních atributů pro zlepšení výsledků reprodukce je inseminace provedená ve správném okamžiku estrálního cyklu, tedy v období říje, v tzv. folikulární fázi. Ve stájích s vysokou koncentrací dojnic je již složitější vyhledávat zvířata v říji, vnější projevy říje nebývají tak výrazné. V současné době se k odhalení říje využívají některé stájové technologie např. spojené s měřením pohybové aktivity jednotlivých dojnic, často je vyvolání říje řešeno medikamentózně. Jednou z možností jak získat přehled o průběhu estrálního cyklu je využití progesteronového testu.

Hormon progesteron se řadí mezi gestageny. Jedná se o hormon žlutého tělíska (corpus luteum), má za úkol v době gravidity inhibovat dozrávání nových vajíček a tím brání vzniku nových ovulací a říjí, dále připravuje děložní sliznici k příjmu vajíčka a zabraňuje děložním stahům, čímž chrání graviditu. Progesteron se začíná tvořit po ovulaci folikulu, je uvolňován

do krve a následně je transportován i do dalších tělních sekretů, také do mléčné žlázy, což umožňuje detekci hormonu i z mléčných vzorků. Jak známo z obecného studia savců, mléko je biologicky a nutričně úžasná fyziologická tekutina a materiál umožňující nejen složkové, resp. živinové, analýzy pro nutriční účely, ale i analytickou kontrolu zdraví, energetické bilance a reprodukce krav metodou odběru neinvazivní analýzy. Z hlediska získávání materiálu pro analýzy je to výhodnější, protože mléko k analýze lze získat při běžném každodenním dojení. Odběr krevních vzorků nebo moče, jako invazivní monitoring, s určitým zdravotním rizikem pro zvíře, je také podstatně složitější a nákladnější. Koncentrace hormonu progesteronu v průběhu estrálního cyklu kolísá, což je podstatou vlastního progesteronového testu. V období říje, tzv. folikulární fázi, se obsah progesteronu nachází blízko nulové hodnoty, zatímco v období březosti je koncentrace progesteronu vysoká, řádově v desítkách ng/ml.



Obr. 1 Vývoj dojivosti a plodnosti krav plemene Holštýn v ČR v KU (Podle: KUČERA, J.- LIPOVSKÝ, D.- URBAN, P.: 2018, Dny prvovýroby mléka, Hustopeče.)

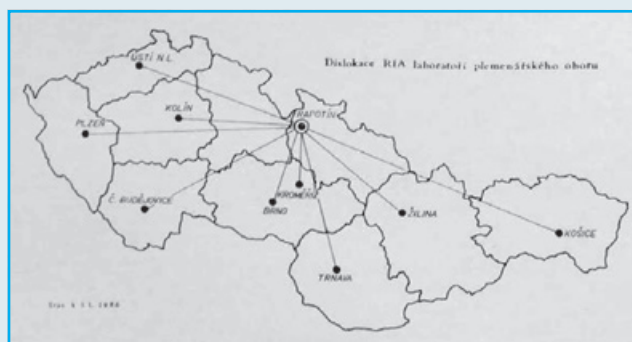


Obr. 2 Vývoj dojivosti a plodnosti krav plemene České strakaté v ČR v KU (Podle: KUČERA, J.- LIPOVSKÝ, D.- URBAN, P.: 2018, Dny prvovýroby mléka, Hustopeče.)

Sledováním hladiny progesteronu tak získáme přehled o průběhu celého estrálního cyklu dojnice.

Historie sledování obsahu progesteronu v mléce v ČR

V minulosti byl v ČR z důvodu zlepšení reprodukčních ukazatelů dojnic zaveden systém sledování koncentrace progesteronu ve vybraných chovech, kde byly zjištěny problémy s reprodukcí. Hladina progesteronu byla tehdy zjišťována metodou radioimunoanalýzy (RIA). Metoda RIA pro potřeby zemědělské prvovýroby byla rozpracována ve Výzkumném ústavu živočišné výroby v Uhřetěvsi MVDr. Píchovou, CSc a Ing. Píchou, CSc., v roce 1977. Protože stanovení obsahu progesteronu z mléčných vzorků se týkala problémů reprodukce, byla tato problematika svěřena plemenářské službě. V roce 1978 byla Státními plemenářskými podniky ve spolupráci s Vysokou školou zemědělskou v Brně vybudována první RIA laboratoř pod vedením RNDr. M. Pöschla, CSc. O rok později byla zahájena spolupráce s oddělením radioimunologie VÚCHS Rapotín, které zahájilo činnost 1.7.1983 a kde byla v té době budována centrální RIA laboratoř. Plný provoz centrální laboratoře byl zahájen v říjnu roku 1983 (ZAORAL, 1987). Od roku 1984 byl postupně vybudován systém specializovaných laboratoří při jednotlivých krajských plemenářských podnicích (Státní plemenářské podniky, nyníější Českomoravská společnost chovatelů a.s.). Pro Středočeský kraj byla RIA laboratoř vybudována v Kolíně, pro Jižní Čechy v Českých Budějovicích, pro Západočeský kraj byla laboratoř zbudována jako součást Laboratoře pro rozbor mléka v Plzni. Podobně byla situace řešena v Severočeském kraji, kde byla RIA laboratoř umístěna v budově LRM v Ústí nad Labem. Krajský plemenářský podnik v Brně využíval laboratoř v Kroměříži a KPP Olomouc využíval služeb centrální laboratoře v Rapotíně. Na Slovensku pracovaly RIA laboratoře v Trnavě, Žilině a Košicích (Obr. 3). Pracovníci nově otevíraných RIA laboratoří absolvovali školení v již provozovaných laboratořích a také v podnikové RIA laboratoři JZD Potěhy (okres Kutná Hora), která pracovala pod vedením Dr. Proška. Tato podniková RIA laboratoř zpracovávala jednak vzorky dojnic vlastního chovu, ale i vzorky několika podniků okolních. Odběr vzorků byl organizován ve spolupráci inseminačních techniků a faremních zootechniků. Co se týkalo materiálního zabezpečení, vzorkovnice a přepravní boxy byly totožné s kontrolou užitkovosti. Metodicky byly tyto laboratoře řízeny centrální laboratoří ve Výzkumném ústavu chovu skotu v Rapotíně, kde se také konaly celostátní pravidelné porady zainteresovaných pracovníků plemenářské služby. Oddělení sloužilo i jako centrum pro výzkum a vývoj metodiky analýz i jako distribuční centrum zásobující krajské RIA laboratoře analytickým materiálem (KRŇÁVEK, 1987, 1988; ZAORAL, 1987, 1991; LÍZAL, 1988). Jak se však ukázalo, měla metoda RIA řadu nevýhod. Byla to zejména značná náročnost na přístrojové a materiální vybavení a stavební úpravy. Rovněž měřicí přístroje vyráběné ve Spišské Nové Vsi



Obr. 3 Dislokace RIA laboratoří plemenářského oboru (ZAORAL, 1987)

musely být servisovány ve výrobním podniku, čímž vznikaly nemalé, zejména logistické problémy a tím zvýšené náklady. Pro vzdálenější laboratoře představovala taková oprava několikadenní přerušení práce se všemi souvisejícími důsledky. Také zpracování vzorků mléka bylo poměrně složité, analýza vzorků se prováděla dva dny. Bylo nutné dodržovat zvýšená bezpečnostní a hygienická opatření, protože se pracovalo s radioizotopem I125. Z těchto důvodů byla činnost RIA laboratoří po čase ukončena.

Současnost progesteronového testu

OPSOMER et al., (2000) uvedli stanovení koncentrace progesteronu v mléce jako vhodný indikátor cyklických změn na vaječniku pro dojnice se slabými estrálními symptomy bez nutnosti elektronické identifikace. V současné době je pro stanovení koncentrace progesteronu v mléce nejčastěji využívána metoda ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), což umožní i příznivé cenové relace provedených rozborů. Metoda ELISA využívá principu imunokomplexu, což znamená imobilizaci jedné ze složek imunokomplexu na pevnou fázi. Značený a neznačený progesteron kompetují o omezený počet vazebných míst protilátek sorbovaných na stěnách jamek mikrotitrační desky. Navázané a volné reagenty jsou pak odděleny jednoduchým promytím. Pokud je množství protilátek konstantní, je množství vázaného značeného progesteronu, tzv. traceru, tím větší, čím menší je množství neznačeného progesteronu ve stanovovaném vzorku a naopak. Pomocí standardů o známé koncentraci lze vyjádřit vztah mezi množstvím neznačeného antigenu v komplexu progesteron-protilátka a barevnou odezvou jamky. Po proběhnutí imunoreakce je do reakčních jamek přidán substrát reagující s tracerem, který je vázán na protilátku navázanou na stěně jamek za tvorby žlutě zbarveného produktu. Absorbance tohoto zabarvení je nepřímo závislá na množství progesteronu ve vzorku. Barevná odezva jednotlivých jamek je poté změřena pomocí vertikálního spektrofotometru (STRNAD a SIMERSKÝ, 2005). Výhodami této metody jsou jednoduchost, dostatečná přesnost a zejména rychlost, výsledky jsou známé do 30 minut od zahájení analýzy. Na tomto principu pracuje také přístroj firmy FrimTec. Vzorky mléka

od neplodných dojníc byly testovány (PRAKASH et al., 1988) na koncentraci progesteronu dvakrát týdně pomocí paralelních RIA a EIA (enzyme immuno assay) metody. Byla získána dobrá korelace 0,98 a odhadované hodnoty byly v obou technikách podobné. Cílem této studie je vyhodnocení výsledků analýz na přístroji FrimTec.

Typy progesteronového testu

Progesteronové testy lze rozdělit do dvou skupin. Základem je kompletní test, který sestává z analýzy 4 vzorků. Dále lze provést tzv. zkrácený test, to znamená analýzu pouze 2 vzorků.

1. Kompletní test

Kompletní test se skládá z analýzy celkem 4 vzorků. Analýzou hodnot všech čtyř vzorků dostaneme úplný přehled o průběhu estrálního cyklu krávy a lze indikovat i některé poruchy estrálního cyklu (Tab. 1; Obr. 4 a 5), případně čas vhodný k inseminaci (v případě kontinuálního testování s využitím výsledků předchozího cyklu). První vzorek mléka se odebírá v den inseminace. Tento vzorek slouží k potvrzení správnosti doby inseminace. Pokud je obsah progesteronu na nízké úrovni, byla zvolena správná doba pro inseminaci a naopak. Druhý vzorek se odebírá v období mezi 8. - 11. dnem po inseminaci. Pokud byla v době inseminace hladina progesteronu nízká, slouží tento vzorek k indikaci správného počátku estrálního cyklu. To v případě, když má koncentrace progesteronu stoupající tendenci. Pokud je hodnota progesteronu i u druhého vzorku nízká, lze předpokládat u dojnice anestrus. Třetí vzorek se odebírá



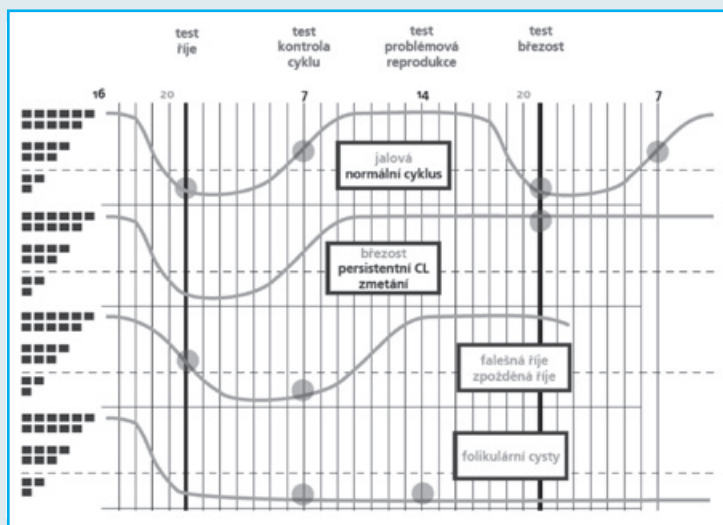
Obr. 4 Barevná reakce po provedení kvantitativního testu na obsah progesteronu v mléce pomocí přístroje eProCheck® 2.0.

v období kolem 21. dne po inseminaci. Pokud je koncentrace progesteronu vysoká, lze při pozitivních hodnotách prvního a druhého vzorku předpokládat s vysokou pravděpodobností březost. Pokud bude hodnota nízká, kráva z různých důvodů nezabřezla. Poslední, čtvrtý vzorek se odebírá v období kolem 42. dne po inseminaci. Je to jakési potvrzení březosti, pokud je hladina progesteronu u tohoto vzorku mléka vysoká. Když klesne, jedná se zřejmě o případ rané embryonální mortality (Obr. 6).

Tab. 1 Monitoring a diagnostika estrálního cyklu dojnice prostřednictvím plnohodnotného progesteronového testu

Hladina progesteronu a den po inseminaci				Stav estrálního cyklu
0	8-11	21-25	40-45	
N	V	V	V	Březost
N	V	N	-	Jalová
N	N	-	-	Anestrus, folikulární cysta
V	V	-	-	Perzistující CL
N	V	V	N	Embryonální mortalita
V	N	V	-	Inseminace v nesprávném termínu

V = vysoká; N = nízká hladina progesteronu; CL = corpus luteum.



Obr. 5 Možná interpretace testování hladiny progesteronu v mléce pomocí přístroje Frimtec při monitoringu estrálního cyklu dojníc (semikvantitativní test)

2. Zkrácený test

Zkrácený test sestává z odběru pouze 2 vzorků, první v den inseminace a druhý v období 21 dnů po inseminaci. Tento test slouží k potvrzení správnosti inseminace (první vzorek) a ke zjištění pravděpodobné březosti v případě, že hodnota prvního vzorku je nízká a druhého vzorku vysoká. Tento test je provozně jednodušší, nelze však diagnostikovat některé poruchy estrálního cyklu, např. anestrus. Vyhodnocení spolehlivosti zkráceného testu podle různých metod hodnocení bylo cílem této studie. Možnosti a výhody využití progesteronového testu k řízení reprodukce dojníc v kombinaci s nově zavedeným chladovým svozem vzorků mléka v kontrole mléčné užitkovosti v ČR rozvedli HERING (2005) a SKYVA (2005).

Materiál a metody

Vzorky mléka

Individuální vzorky mléka určené k analýze na stanovení koncentrace progesteronu byly odebrány ve 2 chovech v Plzeňském kraji.

První z nich se nachází v okrese Plzeň-sever. Zemědělský podnik hospodaří na 7 000 ha půdy, z toho 4 700 ha



Obr. 6 Obecné schéma průběhů hladin progesteronu v mléce během fyziologicky modifikovaného estrálního cyklu dojnice

orné. Ve stáji je chováno 430 dojnic holštýnského plemene (H100). V kontrolním roce 2017 - 2018 byly v chovu uzavřeny 403 laktace s průměrnou užitkovostí 12 173 kg mléka s obsahem tuku 3,58 %, což představuje produkci 436 kg tuku. Obsah bílkovin 3,29 % znamená produkci 400 kg bílkovin. Stáj je vybavena rybinovou dojírnou Fullwood 2x12, identifikace zvířat na dojírně je řešena pomocí pedometrů s čtením ve vstupních branách. Stájová evidence je vedena podle ušních čísel. Druhý chov je lokalizován v okrese Plzeň-jih. V chovu je ustájeno 100 dojnic převážně českého strakatého plemene (C82H12). V kontrolním roce 2017 - 2018 v 79 uzávěrkách chov vykázal průměrnou užitkovost 8 022 kg mléka, tučnost 3,91 % (produkce 314 kg mléčného tuku) a obsahu bílkovin 3,55 % (285 kg bílkovin). Stáj je vybavena autotandemem Wesfalia s identifikací zvířat na dojícím stání. Stájová evidence je řešena obojkem.

Vzorky byly analyzovány na přístroji FrimTec eProCheck 2.0 (Obr. 7). Přístroj eProCheck® 2.0 je automatizovaný analyzátor fungující na principu ELISA testu. ELISA test je založen na specifické reakci antigenu s pro-



Obr. 7 Přístroj eProCheck® 2.0

tilátkou, jejímž výsledkem je barevný produkt. Intenzita této barevné změny je v případě přístroje eProCheck® 2.0 snímána kontrastním senzorem a vyhodnocována integrovaným počítačem. První vzorek byl odebírán v den inseminace, druhý vzorek 21. den po inseminaci (zkrácený test). Vzorky mléka nebyly konzervovány, byly uchovávány v chladovém režimu.

Výhodou při analýze mléka pomocí přístroje Frimtec eProCheck® 2.0 je snadné provedení testu – potřebné chemikálie jsou uloženy uvnitř přístroje a všechny kroky samotného ELISA testu (dávkování reagensů, promývání, regulace teploty, mixování/protřepání, vyhodnocení, atd.) jsou automatizovány samotným zařízením. Provedení testu je pak otázkou 6 minut (kvantitativní test), resp. dvou minut v případě semikvantitativního testu. Pro uživatele je tak jediným krokem potřebným k provedení testu napipetování 50 µl mléka (konzervovaného či čerstvého) a standardů/ů do mikrozkušavky, vložení mikrozkušavek (1 – 22 + 2 x standard) do přístroje a spuštění zvoleného testu. To jej předurčuje nejen pro laboratorní diagnostiku, ale přímo pro terénní využití. Přístroj samotný umožňuje provedení následujících testů:

- progesteron test – kvantitativní – v mléce, krvi;
- progesteron test – semikvantitativní – v mléce, krvi;
- test obsahu haptoglobulinu – kvantitativní – v mléce, krvi;

pro různé druhy zvířat (skot, pes, ovce, ...).

Metody hodnocení výsledků zkráceného progesteronového testu

Datový soubor byl tvořen identifikací dojnic, obsahem progesteronu (ng/ml mléka) v den inseminace a 21. dni po inseminaci, výsledky tří hodnocení výsledků progesteronového testu a konfirmací březosti podle klasického vyšetření.

Metoda 1.

Metoda hodnocení výsledků kvantitativního progesteronového testu z hlediska březosti dojnic je založena na porovnání úrovně progesteronu v mléce v den inseminace a 21. dni po inseminaci. Pokud je úroveň progesteronu ve dnu cyklu nízká a v 21. dni po inseminaci vysoká, je podle této metody dojnice považována za březí (pozitivní výsledek), ve všech dalších případech za jalovou (negativní výsledek). Pro účely této studie byla na základě literatury (WITTEN et al., 2007; FRANK et al., 2016) zvolena diskriminační hladina obsahu progesteronu v mléce na úrovni 3 ng/ml (≤ 3 ng/ml = nízká hladina progesteronu, > 3 ng/ml = vysoká hladina progesteronu).

Metoda 2.

Metoda byla vytvořena na základě dosažených výsledků pro kvantitativní určení obsahu progesteronu v mléce v 21. dni po inseminaci. Byly stanoveny dvě diskriminační hranice obsahu progesteronu – 3 ng/ml a 10 ng/ml. Dojnice, v jejichž mléce byl obsah progesteronu menší než 3 ng/ml byly označeny podle této me-

tody jako jalové (negativní výsledek), dojnice s obsahem vyšším než 10 ng/ml mléka byly označeny jako březí (pozitivní výsledek).

Metoda 3.

Výsledky určení obsahu progesteronu v mléce v den inseminace a 21. den po inseminaci byly spolu s informací o výsledku klasického vyšetření (březí/jalová) podrobeny analýze pomocí algoritmu strojového učení (REPTree, WEKA, 2007). Tento algoritmus odvozuje na základě dat pomocí indukce tzv. rozhodovací stromy, za účelem nejlepšího pokrytí multinominální diskretní proměnné. Ve výsledku tak dělí datový prostor diskretních či kontinuálních proměnných pomocí přímek tak, aby co nejlépe pokryl vlastnosti dané klasifikační proměnnou.

Algoritmem byl odvozen rozhodovací strom, který klasifikuje na základě odvozených hladin progesteronu v den inseminace a 21. den po inseminaci dojnice jako březí (pozitivní výsledek) nebo jalové (negativní výsledek).

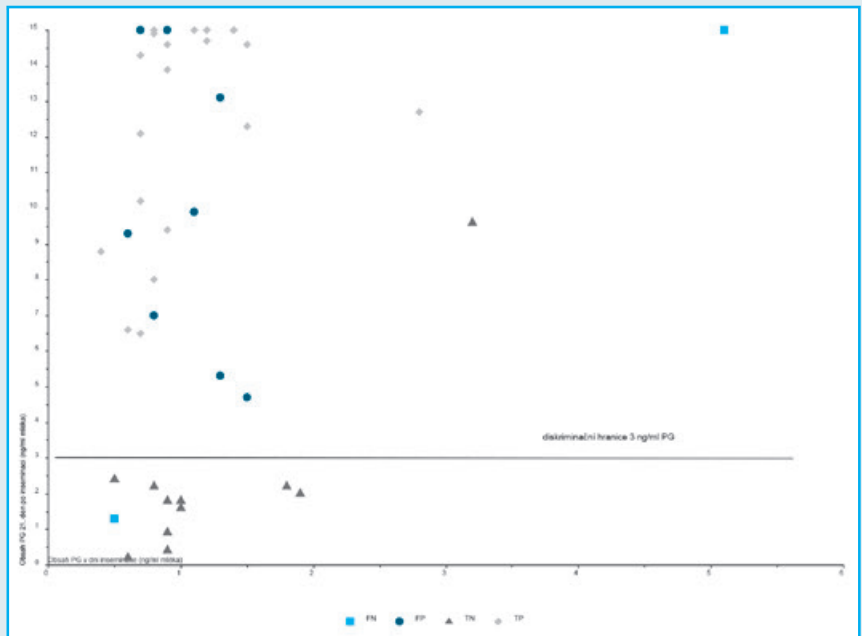
Výsledky a diskuse

V popsáných chovech tak byly odebrány vzorky od 43 dojnic. Přístrojem eProCheck® 2.0 byl kvantitativním testem stanoven obsah progesteronu v mléce v den inseminace a 21. den po inseminaci. Výsledky získané provedením kvantitativního progesteronového testu u souboru 43 dojnic jsou shrnuty v Tab. 2. Klasickým vyšetřením pak byla potvrzena březost u 24 dojnic, 19 bylo označeno za jalové.

Tab. 2 Základní charakteristiky vyhodnocení výsledků kvantitativního progesteronového testu

	Obsah progesteronu v mléce (ng/ml)	
	v den inseminace	21. den po inseminaci
Průměr	1,177	9,286
Min	0,4	0,2
Max	5,1	15
StdDev	0,823	5,48

Pro účely vyhodnocení všech tří metod jsou použity 4 třídy zavedené podle výsledku jednotlivých metod a shody s výsledkem klasického vyšetření březosti (True Positive – TP, True Negative – TN, False Positive – FP, False Negative – FN), kde za pozitivní výsledek každé z metod hodnocení je považována kategorie „březí“ a za negativní kategorie „jalová“, jelikož z podstaty testu se jedná o testování březosti.



Obr. 8 Grafická interpretace výsledků kvantitativního progesteronového testu podle metody 1

Tab. 3 Výsledky hodnocení kvantitativního progesteronového testu podle metody 1

TP	22
FP	8
TN	11
FN	2
Specificity	0,58
Sensitivity	0,92

Metoda 1.

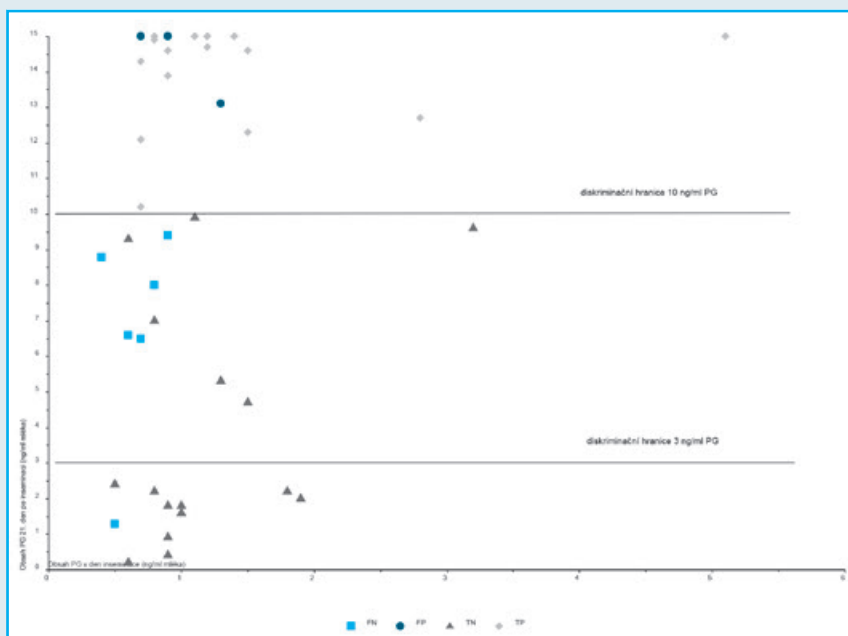
Výsledky hodnocení podle metody 1 jsou tabelovány v Tab. 3. a zobrazeny na Obr. 8.

Hodnocení podle této metody vykazuje několik problematických oblastí – poměrně nízkou specificitu, a vysoký počet falešně pozitivních případů. To je způsobeno poměrně nízkou hladinou diskriminačního intervalu pro obsah progesteronu - 3 ng/ml mléka. Na druhou stranu tato metoda vykazuje poměrně vysokou senzitivitu – tedy detekci březosti, což je způsobeno stejným důvodem. Právě z důvodu výše uvedených skutečností byly zavedeny další metody hodnocení výsledků testu. Je otázkou, zda přes využití informace o obsahu progesteronu v mléce provedeným ve dvou časových bodech je právě tato metoda vhodná pro použití v praxi.

Metoda 2.

Výsledky hodnocení podle metody 2 jsou tabelovány v Tab. 4 a zobrazeny na Obr. 9.

Při využití dvou diskriminačních limitů (3 a 10 ng PG/ml mléka) a informace o obsahu progesteronu (PG) pouze v 21. dni po inseminaci vzrostla hodnota specificity testu oproti metodě 1 – detekce „jalovosti“, naopak klesla hodnota senzitivity testu – to je dáno právě



Obr. 9 Grafická interpretace výsledků kvantitativního progesteronového testu podle metody 2

Tab. 4 Výsledky hodnocení kvantitativního progesteronového testu podle metody 2

TP	18
FP	3
TN	16
FN	6
Specificity	0,84
Sensitivity	0,75

použitím dvou diskriminačních intervalů. Zvážíme-li však fakt, že provedením progesteronového testu se apriori snažíme potvrdit březost, jedná se o akceptovatelný výsledek. Kdybychom stanovili metodiku hodnocení ve smyslu re-testu po několika dnech u skupiny dojnic s výsledkem obsahu progesteronu v mléce mezi 3 – 10 ng/ml, je velmi pravděpodobné, že by výrazně klesl počet falešně negativních případů – byla by potvrzena březost. Pořád by však tento test byl ekonomicky výhodnější proti metodě 1 – 2. měření by proběhlo pouze u vybraných zvířat.

Metoda 3.

Pomocí algoritmu REPTree byl odvozen následující klasifikační strom na základě výsledků určení obsahu progesteronu, kde u jednotlivých listů stromu jsou

uvedeny v závorkách počty správně, resp. špatně klasifikovaných případů, což umožňuje např. detekci skupin případů, u nichž je ke confirmaci březosti vyžadován další test:

REPTree

=====

```

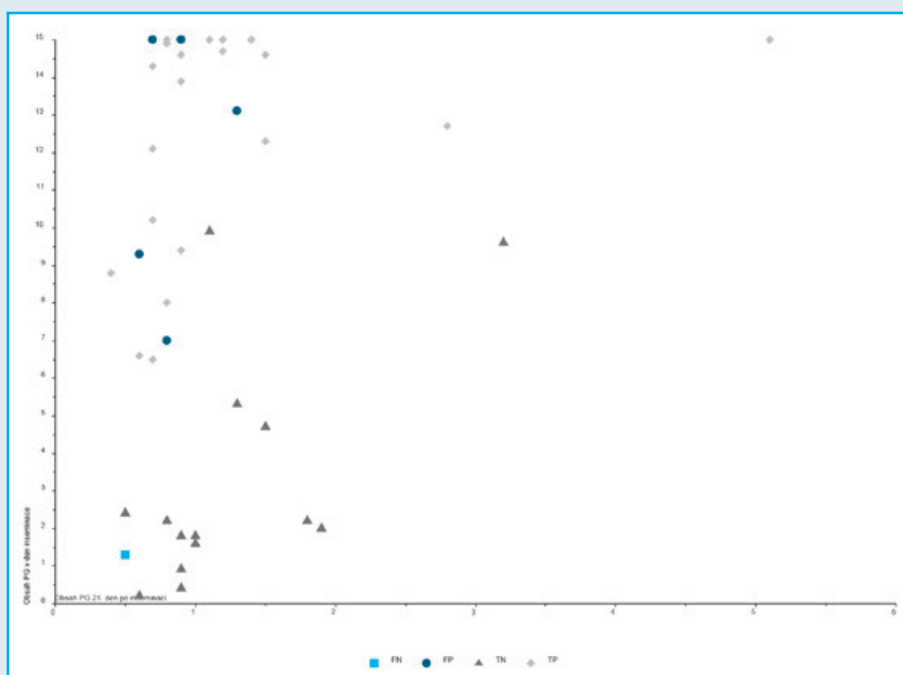
obsah PG (2) < 5,9
| obsah PG(1) < 0,55 : J (2/1)
| obsah PG(1) >= 0,55 : J (11/0)
obsah PG (2) >= 5,9
| obsah PG (2) < 10,05
| | obsah PG(1) < 1
| | | obsah PG (2) < 6,8 : B (2/0)
| | | obsah PG (2) >= 6,8 : B (5/2)
| | obsah PG(1) >= 1 : J (2/0)
| obsah PG (2) >= 10,05
| | obsah PG(1) < 1,35 : B (15/3)
| | obsah PG(1) >= 1,35 : B (6/0)

```

Výsledky hodnocení podle metody 3 jsou tabelovány v Tab. 5 a zobrazeny na Obr. 10.

Tab. 5 Výsledky hodnocení kvantitativního progesteronového testu podle metody 3

TP	23
FP	5
TN	14
FN	1
Specificity	0,74
Sensitivity	0,96



Obr. 10 Grafická interpretace výsledků kvantitativního progesteronového testu podle metody 3

Ze všech tří použitých metod má tato metoda hodnocení testu nejvyšší senzitivitu 0,96. Lze tedy tvrdit, že nejlépe zachycuje výskyt testovaného jevu – březosti – při zachování rozumné úrovně specifity 0,74. Dá se říci, že použití rozhodovacího stromu dobře filtruje nevýhody obou předchozích metod – např. volbu diskriminačních limitů, nebo samotné metodiky hodnocení (kdy např. u metody 1 je dojnice považována automaticky za jalovou v případě nevhodného načasování inseminace – což může a nemusí být pravda) a klasifikuje správně i případy, které byly za použití metody 1 a 2 zařazeny špatně – pouze 1 falešně negativní případ (hodnoty obsahu progesteronu 0,5 v době inseminace a 1,3 21. den po inseminaci).

Na základě popsáných výsledků je možné doporučit po zootechnickou praxi především využití metod 2 a 3 s následným re-testem pro potvrzení březosti u skupin dojníc s nižší spolehlivostí výsledků.

HÄRTLOVÁ et al. (2011) sledovali vliv doby odběru (před a po dojení), vliv skladování vzorků (12 hodin při 4 °C) a vliv zamražení stabilizovaných vzorků na výsledky progesteronového testu Ovucheck Rapid Tube. Spolehlivost byla ověřena kvantitativním stanovením metodou ELISA. Závěrem uvedli, že test je vhodný pro odhad funkce žlutého tělíska vyšetřením poměrných vzorků po dojení přímo ve stáji. Progesteron lze také použít injekčně jako součást hormonální terapie k indukci plnohodnotného estru u anestrických nebo subestrických zvířat (HONPARKHE et al., 2008). Efektivní indikace estru a včasná iniciace postpartální ovariální aktivity podporují reprodukční efektivitu stád dojníc stejně jako efektivitu v mlékařství (SAKAGUCHI et al., 2004; THATCHER et al., 2006; HONPARKHE et al., 2008) tak, že redukuje počet inseminací, zejména těch provedených v nevhodnou periodu. K tomu SHEARER (1992, 2003) popsal optimální stav reprodukční anatomie a fyziologie pro úspěšné rozmnožování u dojníc. Podobně popsali (THATCHER et al., 2008) dopady laktace do průběhu reprodukce dojníc. Rizikové faktory (AUNGIER et al., 2014) spojené s dosažením dobrých reprodukčních cílů závisejí na:

- 1) zvýšené metabolické aktivitě jater (zvýšená glutamát dehydrogenáza při otelení a zvýšená gama-glutamyl transpeptidáza ve 4. týdnu post partum (pp));
- 2) kompetentním imunitním systémem (zvýšené neutrofily v 1. týdnu, snížený alfa1-kyselý glykoprotein v 1., 2. a 3. týdnu);
- 3) endokrinním systémem, který je schopen reagovat produkcí dostatečného trijodthyroninu ve 2. týdnu a zvýšením inzulínu podobného růstového faktoru I ve 3. a 4. týdnu;
- 4) nižší negativní stav energetické bilance (snížená koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin v 1. týdnu, snížená koncentrace beta-hydroxybutyrátu ve 2. týdnu, ztráta kondičního tělesného score (BCS) mezi otelením a 28. dnem pp < 0,5);
- 5) dobré zdraví reprodukčního traktu (normální sken dělohy ve 45. dnu pp, jasný výtok vaginálního hlenu

při první ovulaci a 45. dnu pp, obnovená cykličnost vaječníků do konce dobrovolné čekací doby (≥ 35 . den pp);

- 6) přiměřená dieta (pro zajištění zvýšené glutathionperoxidázy v 2. a 3. týdnu a zvýšení hořčíku ve 4. týdnu pp).

Závěr

Cílem studie bylo posouzení účinnosti zkrácené verze progesteronového testu ELISA metodou prostřednictvím instrumentace FrimTec eProCheck 2.0. Byla zjišťována míra použitelnosti zkráceného testu v provozní praxi pomocí tří různých metod hodnocení výsledků. Výsledky testu a metod jeho hodnocení prokázaly skutečnost, že využití této verze testu pro zootechnickou práci má své opodstatnění. Velkou výhodou je zejména malá pracnost a časová náročnost spočívající v odběru pouze 2 vzorků (případně jednoho – metoda 2), které se odebírají odsávkou před dojením. Výsledky vyšetření hladin progesteronu je možné získat během velmi krátké doby. Test umožňuje ranou diagnostiku březosti už v 21 dnech s poměrně vyhovující pravděpodobností. Z těchto důvodů je možné označit zkrácený PG test jako vhodný doplněk zootechnické praxe na úseku reprodukce skotu, přesto je nutné zdůraznit, že kontinuální monitoring estrálního cyklu by pravděpodobně přinesl výrazné zlepšení prezentovaných výsledků a navíc např. možnosti detekce reprodukčního zdraví.

Poděkování

Vyhodnocení výsledků studie bylo podporováno prostředky projektu MZe RO1419.

Literatura

- AUNGIER, S. P. M., ROCHE, J. F., DISKIN, M. G., CROWE, M. A. (2014): Risk factors that affect reproductive target achievement in fertile dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97, 6, s. 3472-3487. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7404>
- FRANK, E., HALL, M. A., WITTEN, I. H. (2016): The WEKA Workbench. Online Appendix for "Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques", Morgan Kaufmann, Fourth Edition.
- HÄRTLOVÁ, H., HERING, P., VODKOVÁ, Z., KMOCHOVÁ, B., SLAVÍK, P., RAJMON, R. (2011): Ověřování pravosti říje u dojníc pomocí progesteronového testu OVUCHECK. *Náš Chov*, 3, s. 19-21.
- HERING, P. (2005): Problém reprodukce dojníc a jeho řešení prostřednictvím nově vyvinuté metody mléčného progesteronového testu. Sborník příspěvků: Možnosti využití molekulární a populační genetiky pro šlechtění skotu na vyšší kvalitu produktů. Výzkumný ústav pro chov skotu, Rapotín, listopad, ISBN: 80-903142-5-2, s. 55-67.
- HONPARKHE, M., SINGH, J., DADARWAL, D., DHALIWAL, G. S., KUMAR, A. (2008): Estrus induction and fertility rates in response to exogenous hormonal administration in postpartum anestrous and subestrus bovines and buffaloes. *Theriogenology, Journal of Veterinary Medicine Science*, 70, 12, s. 1327-1331.
- KRŇÁVEK, B. (1987): Radioimunologie v chovu skotu. Základní principy radioimunoanalýzy. Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, 2, ISSN 0139-7265, s. 43-44.
- KRŇÁVEK, B. (1988): Využití imunoanalýz v živočišné výrobě. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, 3, ISSN 0139-7265, s. 62-64.

- KUČERA, J. (2018): Aktuality z provádění terénní a laboratorní kontroly mléčné užitkovosti skotu. Dny prvovýroby mléka, ČMSCH a.s., Hustopeče, 8. a 9. 11. 2018. <https://www.cmsch.cz/laboratore/lrm-laboratore-pro-rozbor-mleka/nabidka-sluzeb-lrm/dny-prvovyroby-mleka-2018-seznam-referatu/>
- KVAPILÍK, J., BUCEK, P., KUČERA, J. et al. (2019): Chov skotu v České republice. Ročenka 2018. ČMSCH a.s. Praha, s. 78.
- KVAPILÍK, J., KUČERA, J., BUCEK, P. et al. (2017): Chov skotu v České republice. Ročenka 2016. ČMSCH a.s. Praha, s. 106.
- KVAPILÍK, J., PYTLOUN, J., BUCEK, P. et al. (2007): Chov skotu v České republice. Ročenka 2006. ČMSCH a.s. Praha, s. 98.
- KVAPILÍK, J., RŮŽIČKA, Z., BUCEK, P. et al. (2014): Chov skotu v České republice. Ročenka 2013. ČMSCH a.s. Praha, s. 96.
- LÍZAL, F. (1988): Využití imunoanalýz v chovu hospodářských zvířat. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, 2, ISSN 0139-7265, s. 20-22.
- OPSOMER, F., GRÖHN, Y. T., HERTL, J., CORYN, M., DE KRUIF, A. (2000): Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: A field study. *Elsevier Sci. Inc.*, 53, s. 841-857.
- PRAKASH, B. S., MEYER, H. H. D., VAN DE WIEL, D. F. M. (1988): Sensitive enzyme immunoassay of progesterone in skim milk using second-antibody technique. *Animal Reproduction Science*, 16, s. 225-235. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(88\)90016-4](https://doi.org/10.1016/0378-4320(88)90016-4)
- SAKAGUCHI, M., SASAMOTO, Y., SUZUKI, T., TAKAHASHI, Y., YAMADA, Y. (2004): Postpartum ovarian follicular dynamics and estrous activity in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87, 7, s. 2114-2121. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70030-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70030-2)
- SHEARER, J. K. (2003): Reproductive anatomy and physiology of dairy cattle. University of Florida, IFAS Extension, DS 57, 1992, s. 4. <https://ufdc.ufl.edu/IR00004752/00001>
- SKYVA, J. (2005): Detekce a stanovení progesteronu v kravském mléce – metoda AGROS ELISA KIT. Sborník příspěvků: Možnosti využití molekulární a populační genetiky pro šlechtění skotu na vyšší kvalitu produktů. Výzkumný ústav pro chov skotu, Rapotín, listopad, ISBN: 80-903142-5-2, s. 133-136.
- STRNAD, M., SIMERSKÝ, T. (2005): AGROS ELISA KIT, Validace metody, Ústav experimentální botaniky AV ČR, Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého Olomouc, 16. 5. 2005, s. 7.
- THATCHER, W. W., SILVESTRE, F. T., SANTOS, J. E. P., STAPLES, C. R. (2008): The Impact of lactation on reproductive performance. *WCDS Advances in Dairy Technology*, 20, s. 17-31. <http://www.dairyweb.ca/Resources/WCDS2008/Thatcher.pdf>
- THATCHER, W. W., BILBY, T. R., BARTOLOME, J. A., SILVESTRE, F., STAPLES, C. R., SANTOS, J. E. P. (2006): Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology*, 65, 7, s. 30-44. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.004>
- WITTEN, I. H. et al. (2007): WEKA: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Third Edition.
- ZAORAL, J. (1987): Základní principy radioimunoanalýzy. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, 2, ISSN 0139-7265, s. 60-62.
- ZAORAL, J. (1991): Nabídka oddělení radioimunologie. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, 4, ISSN 0139-7265, s. 27-28.

Korespondující autor: Dr. Ing. Oto Hanuš,
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke dvoru 12a,
160 00 Praha 6, e-mail: hanus.oto@seznam.cz

Přijato do tisku: 20. 2. 2020

Lektorováno: 16. 3. 2020

PSYCHROTROFNÍ MIKRO-ORGANISMY JAKO PRODUCENTI NEŽÁDOUCÍCH ENZYMŮ V SYROVÁTCE PRO DALŠÍ POTRAVINÁŘSKÉ ZPRACOVÁNÍ

Irena Němečková, Šárka Havlíková, Jana Smolová
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Psychrotrophic microorganisms as producers of undesirable enzymes in whey for further food processing

Abstrakt

Psychrotrofní mikroorganismy, jako např. příslušníci rodu *Pseudomonas*, jsou významnými původci technologických problémů při zpracování mléka a kažení finálních mléčných výrobků díky jejich schopnosti růst při chladírenských teplotách a produkovat vysoce termostabilní proteolytické a lipolytické enzymy. Otázkou však je, zda k podobným problémům může docházet také v syrovátce určené pro další potravinářské zpracování. V této práci jsme ze syrovátky vyizolovali šest potenciálně rizikových kmenů a otestovali jejich růst za podmínek modelujících skladování syrovátky při 5; 10 a 15 °C před pasterací a následným zahušťováním. Dynamika růstu jednotlivých kmenů byla rozdílná, přesto lze formulovat doporučení, aby byla syrovátka postupně sbírána z jednotlivých šarží výroby sýrů zpasterována nejpozději během 48 h, lépe však během 24 h.

Klíčová slova: zpracování sladké syrovátky, *Pseudomonas* spp., proteolýza, lipolýza, mikrobiální růst

Abstract

Psychrotrophic microorganisms, as e.g. strains of genus *Pseudomonas*, are important causes of technological problems during milk processing and spoilage of final dairy products due to their ability to grow at refrigerating temperatures and produce highly heat-stable proteolytic and lipolytic enzymes. Our question is whether similar problems can also set in whey for further food processing. In this work, we isolated six potentially hazardous strains and tested their growth under the conditions simulating whey storage at 5; 10 and 15 °C before pasteurization and subsequent concentration. The growth dynamics of particular strains differed. Nevertheless, it can be recommended to pasteurize successively collected whey from particular cheesemaking batches utmost within 48 hrs, optimally within 24 hrs.

Keywords: sweet whey processing, *Pseudomonas* spp., proteolysis, lipolysis, microbial growth