

Wageningen UR Livestock Research

Partner in livestock innovations



Rapport 747

Vroege detectie van dracht bij koeien door Proteomics Biomerkers in melk

Februari 2014



LIVESTOCK RESEARCH
WAGENINGEN UR



Colofon

Uitgever

Wageningen UR Livestock Research
Postbus 65, 8200 AB Lelystad
Telefoon 0320 - 238238
Fax 0320 - 238050
E-mail info.livestockresearch@wur.nl
Internet <http://www.livestockresearch.wur.nl>

Redactie

Communication Services

Copyright

© Wageningen UR Livestock Research, onderdeel van Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, 2014

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

Aansprakelijkheid

Wageningen UR Livestock Research aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Wageningen UR Livestock Research en Central Veterinary Institute, beiden onderdeel van Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek vormen samen met het Departement Dierwetenschappen van Wageningen University de Animal Sciences Group van Wageningen UR (University & Research centre).

Losse nummers zijn te verkrijgen via de website.



De certificering volgens ISO 9001 door DNV onderstreept ons kwaliteitsniveau. Op al onze onderzoeksopdrachten zijn de Algemene Voorwaarden van de Animal Sciences Group van toepassing. Deze zijn gedeponeerd bij de Arrondissementsrechtbank Zwolle.

Referaat

ISSN 1570 - 8616

Auteur(s)

M. te Pas
L. Kruijt
A. de Wit
I. Hulsegge
J. van Riel
J.J. Heeres
H. Sulkers
H. Woelders

Titel

Vroege detectie van dracht bij koeien door Proteomics Biomerkers in melk

Rapport 747

Rapport 747

Vroege detectie van dracht bij koeien door Proteomics Biomerkers in melk

Early Pregnancy detection using proteomics biomarkers in milk

M. te Pas

L. Kruijt

A. de Wit

I. Hulsegge

J. van Riel

J.J. Heeres

H. Sulkers

H. Woelders

Februari 2014

**Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van Ministerie EZ
(Kennisbasis thema KBVII Technologie Ontwikkeling 2012) KB-17-003.02-005.**

Voorwoord

In opdracht van Ministerie EZ (Kennisbasis thema KBVII Technologie Ontwikkeling 2012). De doelstelling van dit project is het ontwikkelen en verbeteren van technologieën voor het detecteren, analyseren en gebruiken van biomerkers in melk. Dit project richt zich op biomerkers voor het detecteren van dracht bij melkvee en is uitgevoerd in samenwerking met CRV, met de contactpersonen Hiemke Knijn en Erwin Koenen en QLIP, met de contactpersonen Jan Rademaker, Nisha Shetty en Harrie van den Bijgaart. We willen genoemde personen bedanken voor de prettige en constructieve samenwerking binnen dit project.

Samenvatting

Een goed reproductie-management is belangrijk voor een melkveebedrijf. Bij verlenging van de periode tussen twee afkalvingen wordt de melkproductie per koe lager. Daarom is het van groot belang om dracht van de koe vroegtijdig vast te stellen. Bij een negatieve testuitslag kan de koe bij de eerstvolgende tochtigheid weer worden geïnsemineerd.

Bestaande methoden van drachtdetectie zijn echoscopie rond dag 35 of invoelen rond dag 42 na inseminatie. Ook is het in principe mogelijk de dracht te bepalen aan de hand van progesteronwaarden in de melk, maar hiervoor moet progesteron in een serie frequente melkmonsters worden gemeten en is het percentage correcte voorspelling (te) laag. Andere beschikbare methoden van drachtdetectie zijn onbetrouwbaar en relatief laat; met een cyclus van circa 21 dagen zal er bij afwezigheid van dracht een cyclus verloren gaan voor herinseminatie. Daarom biedt een test op vóór dag 19 na inseminatie voordelen.

In bestaande drachtigheidstesten wordt uitgegaan van reeds bekende factoren (zoals EPF en PSPB). Een alternatieve strategie is om naar alle melkeiwitten te kijken en 'blind' te zoeken naar eiwitten of andere merkers die associëren met dracht/niet dracht. Dit kan nog niet eerder gevonden merkers voor dracht opleveren. Zo kan dan bovendien door informatie van meerdere merkers te combineren mogelijk de accuraatheid van de test verbeterd worden. In een pilotstudie uitgevoerd door Wageningen UR Livestock Research zijn door middel van SELDI-TOF (Surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight) massa spectrometrie 780 eiwitten uit melk gekwantificeerd en hun associatie met dracht bepaald. Vijf eiwitten werden gevonden die een potentiële voorspeller bleken te zijn voor dracht/niet dracht.

Deze resultaten waren aanleiding voor het huidige onderzoek in samenwerking met QLIP en CRV, met een grotere groep dieren en een gevoeliger spectrometrie methode (Fourier-transform massa spectrometrie, FTMS). Doel van dit project is het ontwikkelen van een accurate, snelle, goedkope en betrouwbare test om vóór dag 35 na inseminatie dracht van melkkoeien te kunnen vaststellen aan de hand van merkers in de melk. Uiteindelijk doel is te komen tot een toepasbare methode voor de praktijk.

In 2012 is gestart met het werven van melkveehouders. Vervolgens zijn in de 2e helft van 2012 melkmonsters verzameld van 233 melkkoeien op dag 19, dag 28 en op dag 35 (dieren die weer in bronst kwamen), c.q. op de dag dat de dieren gescand zijn (dag 35-38). Van alle koeien en melkmonsters zijn de mid infra-red (MIR) profielen door QLIP geanalyseerd en is het progesteron op eigen lab gemeten. Eiwitfracties uit melkserum en melkvet zijn geïsoleerd. In de melkserum en melkvetfracties van 60 koeien (30 drachtige en 30 niet-drachtige, gebalanceerd over de bedrijven) zijn eiwitanalyses uitgevoerd met FTMS. We hebben ons in eerste instantie gericht op melk van dag 19 omdat intussen een commerciële drachttest voor dag 35 melk beschikbaar is gekomen. In de dag 19 melkserum monsters werden 236 eiwitten gemeten en in de melkvetfractie 747 eiwitten. Van alle eiwitten is de mate van associatie met dracht / niet-dracht bepaald. Het MIR profiel had geen toegevoegde waarde voor het voorspellen van dracht. Uit de 100 eiwitten met de sterkste associatie met dracht zijn 32 eiwitten nader geselecteerd op basis van een mogelijke relatie met dracht volgens functionele annotatie databases en literatuur. Combinaties van deze 32 eiwitten (alleen of in combinatie met progesteron) werden gevalideerd wat betreft het vermogen om dracht en niet dracht te voorspellen. Op basis hiervan werden de beste twee combinaties (één met en één zonder progesteron) in een extra validatie getest. Sensitiviteit en specificiteit lagen hoger dan 80%.

Deze studie toont aan dat er zeker perspectief is voor het ontwikkelen van een melktest voor het bepalen van dracht op dag 19 na inseminatie. Ondanks het positieve (tussen)resultaat wordt het project niet in samenwerking met CRV en QLIP voortgezet. De recent beschikbaar gekomen melktest voor dag 35 wordt momenteel door CRV en QLIP voor hun melkveehouders geïmplementeerd en CRV en QLIP zien nu geen meerwaarde voor vroegere detectie dan dag 35 mede omdat dit niet aansluit bij de huidige logistiek van de melkproductie registratie (MPR) melkmonsters.

Summary

An optimal reproduction management is important for a dairy farm. An increased calving interval leads to lower milk production per cow. Therefore, early pregnancy diagnosis is vital. If tested negative, the cow can be serviced again in the first next heat.

Existing methods of pregnancy diagnosis are ultrasound scanning around day 35 or palpation around day 42 post insemination. Also a milk progesterone test may be used, but a series of milk samples extending into day 24 post insemination need to be tested in order to accurately predict pregnancy. Also other existing methods are either unreliable or can only be used relatively late after insemination. Thus, one cycle may be lost as cows cannot be serviced in the first next cycle. Therefore, a pregnancy test for day 19 milk post insemination has a strong advantage.

Existing pregnancy marker tests are based on already known proteins (e.g. EPF en PSPB). An alternative strategy would be to use proteomics, i.e. proteome-wide 'blind' search for proteins that have an association with pregnancy. In this way one may find yet unknown markers. If several markers are indeed found one may combine these markers to develop a test with enhanced accuracy. In a pilot study by Wageningen UR Livestock Research, SELDI-TOF (Surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight) mass spectrometry was used to quantify 780 milk proteins and then their association with pregnancy was determined. Five proteins were found that appeared to predict pregnancy adequately. These results motivated the current research, undertaken in collaboration with QLIP and CRV, in which a larger number of cows were used and a more advanced method of protein analysis (Fourier-transform mass spectrometry, FTMS). The aim is to develop an accurate, fast, cheap, and reliable test to detect pregnancy before day 35 on the basis of markers in milk. The ultimate goal is to have a method that can be implemented in a practical setting.

In the first half of 2012, farmers were asked to participate in the project. Then, milk samples of 233 cows (inseminated in June-August) were collected on days 19, 28 and 35. Milk progesterone values were determined of all milk samples. Also, mid infra-red (MIR) profiles were analysed (by QLIP). Protein fractions from milk serum and milk fat were isolated. For the proteomics analysis we focussed on day 19 samples, as during the course of this project a commercial milk pregnancy test for day 35 became available. Proteins were analysed and quantified by FTMS in the milk serum and milk fat protein fractions of 60 cows (30 pregnant and 30 non-pregnant, balanced over farms), finding 236 proteins in the serum and 747 proteins in the fat fraction, respectively. The associations of the proteins with pregnancy/non-pregnancy was determined. The MIR profile had no added value for the prediction of pregnancy. A functional annotation analysis was performed on the 100 proteins with strongest association with pregnancy and on the basis thereof, 32 proteins were selected. Cross validation of combinations of these proteins (alone or in combination with progesterone) was performed to test their ability to predict pregnancy/non-pregnancy. The two combinations with highest sensitivity and specificity (one combination with progesterone and one without) were selected for an additional validation test. Sensitivity and specificity were higher than 80%.

The results of the current study showed that there may be a real possibility for developing a milk test to determine the pregnancy of dairy cows as soon as day 19 post insemination. Despite this encouraging result, this project will not be continued in collaboration with QLIP and CRV. The pregnancy test for day 35 milk that recently became available is currently offered by CRV and QLIP to their associated dairy farmers and CRV and QLIP at this point do not see added value in an earlier test before day 35 as that would not have a ready application within the current logistic framework of the milk production registration (MPR).

Inhoudsopgave

Voorwoord

Samenvatting

Summary

1	Inleiding	1
2	Materiaal en Methoden	3
2.1	Selectie melkveebedrijven	3
2.2	Data en melkmonsters verzameld op melkveebedrijf	3
2.2.1	Inseminatiegegevens	3
2.2.2	Melkmonsters.....	3
2.3	Opwerking en analyse van de melkmonsters	4
2.3.1	Opwerking melkmonsters	4
2.3.2	Analyses	4
2.4	Biologische analyse Proteomics data	5
2.5	Statistische analyse	5
3	Resultaten	7
4	Discussie	8
5	Conclusies	9
	Literatuur	10

1 Inleiding

Een goed reproductie-management is belangrijk voor een melkveebedrijf. Bij verlenging van de periode tussen twee afkalvingen wordt de melkproductie per koe lager. Daarom is het van groot belang om dracht van de koe vroegtijdig vast te stellen. Bij een negatieve testuitslag kan de koe bij de eerstvolgende bronst weer worden geïnsemineerd.

Bestaande methoden van drachtdetectie zijn echoscopie rond dag 35 of invoelen rond dag 42 na inseminatie. Ook is het in principe mogelijk de dracht te bepalen aan de hand van progesteronwaarden in de melk, maar hiervoor moet progesteron in een serie frequente melkmonsters worden gemeten. Zelfs met een serie van meetpunten voor (bloedserum) progesteron vonden Han et al. 2006 slechts een 64% correcte voorspelling van niet drachtige koeien. In bloed zijn er verschillende biomerkers beschreven. Bijvoorbeeld de “early pregnancy factor” (EPF). Deze zou al zeer vroeg, enkele dagen na inseminatie, een indicatie geven van dracht. Echter een commerciële test voor EPF in bloed of in melk bleek een onvoldoende betrouwbaarheid en nauwkeurigheid te hebben (Ambrose et al., 2007, Cordoba et al., 2001, Gandy et al., 2001). Daarnaast bestaat een commerciële test voor een drachteiwit (Pregnancy-Specific Protein B (PSPB)) in bloedserum vanaf dag 28 na inseminatie (Biopryn®), maar recent onderzoek (Romano, and Larson (2010) *Theriogenology* 74(6): 932-939) liet zien dat de betrouwbaarheid tussen dag 28 en 35 lager is dan met transrectale echoscopie. In de meeste hierboven genoemde methoden van drachtdetectie is bovendien de detectie relatief laat; met een cyclus van circa 21 dagen zal er bij afwezigheid van dracht een cyclus verloren gaan voor herinseminatie. Ook kunnen drachtige dieren tochtigheidsverschijnselen tonen, wat tot inseminatie van een drachtig dier kan leiden (wat weer kan leiden tot abortus). Daarom biedt een test op of vóór dag 19 na inseminatie voordelen.

In bestaande tests wordt uitgegaan van reeds bekende factoren (zoals EPF en PSPB). Een alternatieve strategie is om naar alle melkeiwitten te kijken en ‘blind’ te zoeken naar eiwitten of andere merkers die associëren met dracht/niet dracht. Dit kan nog niet eerder gevonden merkers voor dracht opleveren. Zo kan dan bovendien door informatie van meerdere merkers te combineren mogelijk de accuraatheid van de test verbeterd worden. In een pilotstudie uitgevoerd door Wageningen UR Livestock Research zijn door middel van SELDI-TOF (Surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight) massa spectrometrie 780 eiwitten uit melk gekwantificeerd en hun associatie met dracht bepaald. Vijf eiwitten (ongeïdentificeerde pieken) werden gevonden die een potentiële voorspeller bleken te zijn voor dracht/niet dracht.

Deze resultaten waren aanleiding voor het huidige onderzoek in samenwerking met QLIP en CRV, met een grotere groep dieren en een gevoeliger spectrometrie methode (Fourier-transform massa spectrometrie (FTMS)). Doel van dit project is het ontwikkelen van een accurate, snelle, goedkope en betrouwbare test om vóór dag 35 na inseminatie dracht van melkkoeien te kunnen vaststellen aan de hand van merkers in de melk. Uiteindelijk doel is te komen tot een toepasbare methode voor de praktijk.

Doelstelling

Doel van dit project is het ontwikkelen van een accurate, snelle, goedkope en betrouwbare test om vóór dag 35 na inseminatie dracht van melkkoeien te kunnen meten aan de hand van merkers in de melk. Uiteindelijk doel is te komen tot een toepasbare methode voor de praktijk.

Tijdpad

Het project is gestart begin 2012 met het verder in detail uitwerken van het plan en het werven van melkveehouders. Vervolgens zijn in de 2e helft van 2012 de melkmonsters verzameld, de koeien op dracht gescand en de MIR (mid infra rood) profielen in melk geanalyseerd. Het opwerken van de monsters en de FTMS (Fourier-transform massa spectrometrie) analyses zijn uitgevoerd in de 1e helft van 2013. Op basis van deze resultaten zijn statistische analyses uitgevoerd en is in de literatuur nagegaan welke eiwitten een fysiologische relatie hebben met dracht, resp. geen dracht. De rapportage heeft betrekking op de hier boven beschreven activiteiten t/m het formuleren van een Go/No-go.

2 Materiaal en Methoden

2.1 Selectie melkveebedrijven

Het werven van de melkveebedrijven is in samenwerking met CRV uitgevoerd. Melkveebedrijven in de buurt van Lelystad zijn aangeschreven met het verzoek om mee te werken aan dit onderzoek. De bedrijven die positief gereageerd hebben zijn vervolgens bezocht om specifieke afspraken te maken over uitvoering van de werkzaamheden in combinatie met de specifieke melkinstallatie en melkstal die ze op hun bedrijf gebruiken. In totaal hebben 10 bedrijven deelgenomen aan dit project. De bedrijven waren gesitueerd in de driehoek Lelystad – Biddinghuizen – Swifterbant. Het percentage Holsteinbloed in de dieren was minimaal 87.5 %. De bedrijvengrootte varieerde van ongeveer 50 tot 200 melkkoeien. Als melksysteem hadden de bedrijven het DeLaval melksysteem. Op 13 november 2012 is er een informatiebijeenkomst voor de deelnemende melkveebedrijven gehouden over de voortgang en achtergrond van het project.

2.2 Data en melkmonsters verzameld op melkveebedrijf

2.2.1 Inseminatiegegevens

Diernummer en datum van inseminatie zijn door de melkveehouder per e-mail doorgegeven. Deze gegevens zijn opgeslagen in een database. Op basis van de gegevens uit de database zijn automatisch e-mails naar de melkveehouders gestuurd met informatie over van welke dieren de volgende ochtend melkmonsters genomen moesten worden. Tevens werden er automatisch mails gestuurd met de vraag of een bepaalde koe wel of geen her-inseminatie heeft gehad op of rond dag 21 (uiterlijk op dag 24) na eerste inseminatie.

2.2.2 Melkmonsters

Op tien bedrijven zijn melkmonsters (ochtendmelkmaal) van 233 geïnsemineerde koeien verzameld op drie verschillende dagen na inseminatie: dag 19, dag 28 en op dag 35 (dieren die weer in bronst kwamen), c.q. op de dag dat de dieren gescand zijn (dag 35-38). De koeien waren geïnsemineerd tussen 22 juni en 25 augustus. De betreffende inseminatie was een 1e of 2e inseminatie. Melkmonsters na een 2^e inseminatie werden alleen genomen als er van die dieren nog geen melkmonsters waren verzameld na de 1e inseminatie. Het aantal koeien per bedrijf varieerde van 10 tot 66, met uitzondering van 1 bedrijf dat slecht melkmonsters van 1 koe heeft aangeleverd. Van de koeien die niet in bronst kwamen werd op dag 35-38 door middel van transrectale echoscopie vastgesteld of zij op dat moment (nog) drachtig waren. Dit gebeurde op de eerste dinsdag of vrijdag die viel op of na dag 35, dus op dinsdag, dag 35-38 of op vrijdag, dag 35-37. De monsters zijn tijdelijk in een koelkast op het bedrijf bewaard. Tweemaal per week heeft een koerier de melkmonsters bij de bedrijven opgehaald en gekoeld naar het laboratorium in Lelystad gebracht.

2.3 Opwerking en analyse van de melkmonsters

2.3.1 Opwerking melkmonsters

Direct na binnenkomst op het laboratorium zijn alle melkmonsters verdeeld over verschillende buizen voor verschillende analyses: Proteomics, melkproductie registratie analyses (MPR), MIR en melkprogesteron. De proteomics monsters van melk van dag 28 werden ingevroren opgeslagen bij $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en de proteomics monsters van melk van dag 19 en dag 35-38 werden direct na binnenkomst opgewerkt. Hiervoor zijn de melkmonsters gecentrifugeerd in een normale centrifuge, waardoor het melkvet werd gescheiden van de rest van de melk. Deze melk (zonder vet) is overgebracht naar buizen voor de Ultra Speed centrifuge, waarbij het caseïne is neergeslagen om vervolgens het melkserum te krijgen.

Het melkvet bestaat uit bolletjes met een membraan. Deze membraan (Milk fat globule membrane (MFGM)) bevat eiwitten. De eiwitten in het vet zijn geïsoleerd door de vetlaag te verdunnen met een TRIS buffer met het detergens SDS (natrium dodecylsulfaat). Door ultrasoon te trillen komen eiwitten vrij uit de membraan en in oplossing. Melkserum en de eiwitfractie uit de melkvet membraan zijn opgeslagen bij $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ voor verdere analyses.

2.3.2 Analyses

In alle verzamelde melkmonsters zijn de MPR-analyses (Vet(%), Eiwit (%), Lactose (%), Ureum, Aceton, BHB en celgetal), MIR (Mid Infra Red) profielen en progesteron bepaald. De MPR-analyses en MIR-profielen zijn uitgevoerd door QLIP. De progesteron niveaus zijn bepaald in het eigen laboratorium.

Zestig van de 233 koeien zijn geselecteerd voor proteomics (FTMS) analyses van de melkfracties van dag 19 en dag 35-38 melk. De selectiecriteria voor de koeien waren:

- 30 drachtig, 30 niet-drachtig
- Drachtige koeien waren drachtig volgens echoscopie op dag 35-38) en hadden melkprogesteron niveaus op dag 19, 28 en 35 $\geq 9,5\text{ ng/ml}$.
- Niet drachtige koeien zijn koeien die in bronst kwamen, en (op 1 dier na) opnieuw werden geïnsemineerd, of koeien die niet in bronst kwamen (mogelijk stille bronst) en op dag 35-38 niet drachtig bleken volgens echoscopie, én een progesteron niveau hadden $< 5\text{ ng/ml}$ in de melk op dag 19 of 28.
- Gelijkmatische verdeling van drachtige- en niet drachtige koeien over de verschillende bedrijven (voor zover mogelijk, afhankelijk van geleverde monsters).
- Inseminatiedatum drachtige en niet drachtige dieren dicht bij elkaar.

Van de 60 melkserum en 60 melkmembraan monsters van de geselecteerde koeien zijn de hoeveelheden eiwit bepaald. Een vaste absolute hoeveelheid eiwit is gebruikt voor verdere opwerking van de monsters voor de FTMS analyses. De monsters zijn gereduceerd, gealkyleerd, en vervolgens gedigesteerd met Trypsine.

De peptiden zijn gescheiden met een *reverse phase* kolom en vervolgens gemeten met een LTQ-Orbitrap.

Ter vergelijking zijn de Pregnancy Associated Glycoproteins (PAGs) met een commercieel verkrijgbare ELISA gemeten in onbewerkte melk. Van de 30 drachtige koeien (volgens echoscopie dag 35-38) was de PAG waarde correct (PAG absorbance > 0.6) in de melk van dag 35-38 van 28 koeien, maar was PAG niet detecteerbaar in de melk van 2 koeien (sensitiviteit = $28/30 = 93\%$). Van alle 30 niet-drachtig/herinseminatie koeien was de PAG waarde in de melk van dag 35-38 niet detecteerbaar of laag (absorbance < 0.2). In dag 19 melk waren PAG waarden van alle koeien laag behalve van één drachtige koe.

2.4 Biologische analyse Proteomics data

Doel van deze analyse was de biologische functies van de betrokken eiwitten te verzamelen en op grond daarvan de eiwitten die mogelijk betrokken zijn bij dracht van de koe te selecteren.

De functionele analyse werd gedaan voor 100 eiwitten die waren geselecteerd op basis van statistische screening (zie 2.5 stap 1; de zogenoemde 'top-100'). De proteomics informatie bevatte o.a. eiwitnummers die werden gebruikt om per eiwit biologische informatie te verzamelen in de UniProt database (<http://www.uniprot.org/>), de Panther database (<http://www.pantherdb.org/>), de KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg/>, met name gericht op de pathways database: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) en de Gene Ontology database (<http://www.geneontology.org/>).

De eiwitten met biologische functies die mogelijk gerelateerd zijn aan een (zich ontwikkelende) dracht werden geselecteerd en terug gerapporteerd aan de statisticus.

2.5 Statistische analyse

Per koe zijn twee records (dag 19 en 35) opgesteld met elk 747 eiwitten in de melkvetfractie, 236 eiwitten in de melkserumfractie, de mid-infrarede (MIR) data, en de progesteron waarde. Alle statistische bewerkingen zijn uitgevoerd met het statistisch pakket Genstat (2006). Alleen de data van de melkmonsters van dag 19 na inseminatie zijn gebruikt. Analyse is uitgevoerd in vier stappen.

Stap 1: statistische screening

Allereerst is een statistische screening uitgevoerd om te bepalen welke kenmerken naast progesteron (eiwitten en MIR kenmerken) op individuele basis een goede statistische relatie hebben met het binomiale kenmerk drachtigheid. Hiertoe is een logistisch regressiemodel gebruikt, waarbij per eiwit of ander kenmerk X het volgende model is gebruikt:

$$\text{Logit}(p) = b_0 + b_1 \cdot X.$$

Waarbij p de kans is op dracht, X is de waarde van een eiwit of ander kenmerk. De kenmerken zijn vervolgens gerangschikt op grond van de residual deviance (een maat voor de 'goodness of fit') van het model.

Stap 2: Biologische analyse

Voor totaal 100 eiwitten met de beste voorspellende waarde van het kenmerk drachtigheid (de top-100) is aan de hand van proteïn databases onderzocht of de biologische functie mogelijk gerelateerd zijn aan dracht.

Stap 3: Statistische selectie van kenmerken

In stap 2 zijn 32 eiwitten geselecteerd. In stap 3 is vervolgens getest welke combinaties van eiwitten van deze 32 (alleen eiwitmerkers of gecombineerd met progesteron) de beste voorspelling gaf van dracht.

De selectie van combinaties van merkers is uitgevoerd met behulp van stapsgewijze selectie binnen een discriminant analyse (DISCRIMINATE) (Mardia et al., 1979). In 2 rondes werd per ronde een aselect gekozen groep (kalibratieset) van 42 (70%) koeien (21 drachtige en 21 niet-drachtige) gebruikt om de associatie van de combinatie van merkers met het kenmerk dracht in de kalibratieset te bepalen, om vervolgens het voorspellend vermogen van de combinatie van eiwitten te valideren aan de hand van de voorspelling van dracht in de overige 18 (30%) koeien (de validatieset). In alle gevallen is de analyse uitgevoerd met 2 crossvalidatie methoden (cross validatie en bootstrap), om na te gaan of dit een grote invloed heeft gehad. Het gemiddelde van de twee rondes werd gebruikt als criterium voor ranking van de combinaties merkers. Van de combinaties die best scoorden was de overeenstemming in beide rondes heel goed.

Stap 4: Cross validatie van de twee beste combinaties van merkers

Van de beste combinatie van eiwitmerkers en de beste combinatie van eiwitmerkers/progesteron is een cross validatie gedaan in 10 rondes, waarbij per ronde aselect 90 procent (27 drachtige en 27 niet-drachtige) van de koeien is gebruikt voor kalibratie, ter voorspelling van de dracht van de overige 10% (3 drachtige en 3 niet-drachtige) van de koeien (de validatieset). De gemiddelde sensitiviteit en specificiteit van de voorspelling van de validatieset koeien zijn berekend over de 10 rondes als belangrijkste maat voor kwaliteit van de combinatie merkers.

Hierbij geldt:

Sensitiviteit

= aantal terecht positieven / (aantal terecht positieven + aantal fout negatieven)

= aantal als drachtig geteste drachtige koeien / totaal drachtige koeien

In woorden: kans op een positieve uitslag, gegeven dat de koe drachtig is.

Of: Vermogen van de test om de drachtige koeien correct te herkennen.

Specificiteit

= aantal terecht negatieven / (aantal terecht negatieven + aantal fout positieven)

= aantal als niet drachtig geteste niet drachtige koeien/ totaal niet drachtige koeien

In woorden: kans op een negatieve uitslag, gegeven dat de koe niet drachtig is.

Of: Vermogen van de test om de niet-drachtige koeien correct te herkennen.

3 Resultaten

In de melkserum monsters zijn 236 eiwitten gemeten en in de melkvet (MFGM) monsters zijn 747 eiwitten gemeten. Er was een betrekkelijk kleine variatie in de expressie van de eiwitten tussen de koeien (binnen een groep), wat wijst op weinig 'ruis' door biologische variatie of door de melkvoorbereiding en eiwitanalyse. Van de 100 eiwitten met de beste associatie met dracht (de top-100) werd allereerst de uniekheid van de aangeleverde proteomics data onderzocht. Van twee eiwitpieken was identificatie niet mogelijk omdat ze elk aan twee verschillende eiwitten konden worden toegeschreven, en van een derde piek kon geen gegevens worden gevonden. Deze werden van verdere analyse uitgesloten. Van één eiwit waren geen biologische data aanwezig. Van 5 eiwitpieken in de melkserumfractie bleek dat ze hetzelfde eiwit waren als vijf eiwitpieken in de melkvetfractie. In totaal werd dus voor 91 eiwitten functionele analyse gedaan.

Op basis van de functionele analyse zijn eiwitten geselecteerd die ofwel potentieel betrokken zijn bij de ontwikkeling van een embryo, of bij lactatie. De gedachte bij de laatste categorie was dat als er een plotselinge verandering in de expressie van die eiwitten optreedt dit waarschijnlijk te maken heeft met een zich ontwikkelende dracht (dus een andere plotselinge verandering). In totaal werden 24 eiwitten gevonden met informatie gerelateerd aan een ontwikkelend embryo en 8 eiwitten die functioneel gerelateerd zijn aan lactatie en secretie.

Met de 32 geselecteerd eiwitmarkers zijn vervolgens de combinaties van alleen eiwitten en combinaties van eiwitten en progesteron getest en zijn de beste twee combinaties geselecteerd (één alleen eiwitmarkers, één eiwitmarkers met progesteron) (stap 3). Deze twee combinaties zijn vervolgens in een extra crossvalidatie getest (stap 4). De specificiteit en sensitiviteit van deze twee combinaties in de crossvalidatie en bootstrapping (stap 3) en de extra crossvalidatie (stap 4) worden getoond in tabel 1.

Tabel 1. Sensitiviteit en specificiteit van de in stap 1-3 (zie sectie 2.5) geselecteerde combinaties van markers.

Methode	Combinatie 1		Combinatie 2	
	Sensitiviteit	Specificiteit	Sensitiviteit	Specificiteit
Crossvalidatie (stap 3)	89%	73%	78%	83%
Bootstrap (stap 3)	87%	74%	76%	84%
Crossvalidatie (stap 4)	87%	73%	80%	87%

De merkercombinatie met progesteron (combinatie 1) heeft een redelijk hoge sensitiviteit, maar wel een relatief lage specificiteit, dus niet drachtige koeien worden relatief vaak incorrect als drachtig gescoord. Drachtige koeien hebben altijd hoge progesteronwaarden, maar niet drachtige koeien soms ook (in de luteale fase). Daardoor zal de test mét progesteron (combinatie 1) drachtige koeien relatief vaak correct scoren (hoge sensitiviteit) maar kan niet drachtige koeien op basis van de progesteron waarde soms incorrect als drachtig scoren (lagere specificiteit).

4 Discussie

In dit onderzoek werden aan de hand van eiwitexpressieniveaus in FTMS analyse eiwitten uit melkvet en melkserum geïdentificeerd die een duidelijk associatie hadden met dracht/niet dracht. De mid infrared (MIR) analyses leverde geen kenmerken met een associatie met dracht op..

Omdat een groot aantal kenmerken (eiwitten) is onderzocht kan een deel van de in stap 1 gevonden associaties voortkomen uit statistische ruis (multiple testing). De waarde van een associatie (als gevonden in stap 1) moet blijken uit (cross) validatie. Om de meest waarschijnlijke potentiële eiwitmarkers te selecteren uit de 'top 100' van eiwitten met een associatie met het kenmerk dracht is (in aanvulling op het projectplan) als tussenstap een analyse uitgevoerd om inzicht te krijgen in die eiwitten die biologisch mogelijk van betekenis zijn bij een zich ontwikkelende dracht. Hierdoor werd een preselectie van 32 potentiële eiwitmarkers geselecteerd voor verdere (cross) validatie. In de validatiestap (stap 3) werden de twee beste combinaties van markers (één met en één zonder progesteron) geselecteerd en deze twee werden in stap 4 nader gevalideerd.

De specificiteit en sensitiviteit komen afhankelijk van de combinatie aan biomarkers uit op resp. max. 83-87% en 87-89%. In het project is voor go/no-go een minimum grens voor de specificiteit en/of sensitiviteit van 80% aangegeven. Voor alle zeven biomarkers zijn commercieel beschikbare ELISA kits aanwezig voor het rund. Wel moeten de antilichamen voor de eiwitmarkers nog geschikt worden gemaakt voor melk. De te ontwikkelen drachttest moet dan nog laten zien hoe de sensitiviteit en specificiteit van deze test dan uitpakt.

Voor een aantal eiwitten lag de hoeveelheid eiwit in de melk van sommige melkmonsters onder de detectiegrens. In dat geval is er niet gekozen om een 'missing value' te noteren, maar is de detectiegrens als waarde genomen, vooral omdat missing values problemen opleveren bij de dataverwerking. Ook bij drie van de geselecteerde eiwitten in de uiteindelijk gekozen twee markercombinaties had een heel klein aantal melkmonsters een eiwitwaarde onder de detectiegrens.

Inmiddels beschikt CRV over een drachttest werkzaam vanaf 35 dagen na kalven op basis van Pregnancy Associated Glycoproteins (PAGs) gemeten in de routine MPR-melkmonsters door QLIP. Dit was voor het project de reden om voor het ontwikkelen van een test geheel op dag 19 te focussen. Alhoewel beide bedrijfsleven partijen positief zijn over de verkregen resultaten zien zij op dit moment voor de toepassing op het melkveebedrijf uitgaande van de huidige logistiek van monsternamen en analyse geen toegevoegde waarde voor een verder te ontwikkelen drachttest op dag 19 na inseminatie. Dit betekent dat daarmee het project een No-Go heeft gekregen en moet worden beëindigd. Binnen Livestock Research zal worden gekeken of en op welke wijze de verkregen kennis verder kan worden gebracht. Het 'In-line' meten van dracht in melk gekoppeld aan bijvoorbeeld een melkrobot kan mogelijk perspectief bieden boven de huidige progesteron-test die een lagere betrouwbaarheid kent.

5 Conclusies

- Met de FTMS eiwitanalyse werden specifieke eiwitten uit melkvet en melkserum geïdentificeerd die een duidelijk associatie hadden met dracht/niet dracht.
- De mid infrarood (MIR) analyses leverde geen kenmerken met een associatie met dracht op.
- Twee combinaties van eiwitten, waarvan één met progesteron, laten zien dat de specificiteit en sensitiviteit van deze sets van biomerkers boven de 80% uitkomen. Voor alle 6 geïdentificeerde eiwitten is een ELISA test voor rund (bloed) beschikbaar.

Literatuur

- Ambrose, D. J., B. Radke, P. A. Pitney, and L. A. Goonewardene. 2007. Evaluation of early conception factor lateral flow test to determine nonpregnancy in dairy cattle. *Can Vet J* 48(8):831-835.
- Cordoba, M. C., R. Sartori, and P. M. Fricke. 2001. Assessment of a commercially available early conception factor (ECF) test for determining pregnancy status of dairy cattle. *J Dairy Sci* 84(8):1884-1889.
- Gandy, B., W. Tucker, P. Ryan, A. Williams, A. Tucker, A. Moore, R. Godfrey, and S. Willard. 2001. Evaluation of the early conception factor (ECF) test for the detection of nonpregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 56(4):637-647.
- Genstat Committee, 2006. *Genstat Release 9 Reference Manual*. Published by VSN International.
- Han, H., K. J. Austin, L. A. Rempel, and T. R. Hansen. 2006. Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. *J Endocrinol* 191(2):505-512.
- Mardia, K.V. , Kent, J.T. & Bibby, J.M. (1979). *Multivariate Analysis*. Academic Press, London.
- Romano, J. E. and J. E. Larson. 2010. Accuracy of pregnancy specific protein-B test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Theriogenology* 74(6):932-939.



Wageningen UR Livestock Research

Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad T 0320 238238 F 0320 238050

E info.livestockresearch@wur.nl | www.livestockresearch.wur.nl