BENTLEY INSTRUMENTS

The Next Generation of Milk Analysis

Využití laktoferinu jako ukazatele pro predikci mastitid a nové směry analýzy mléka

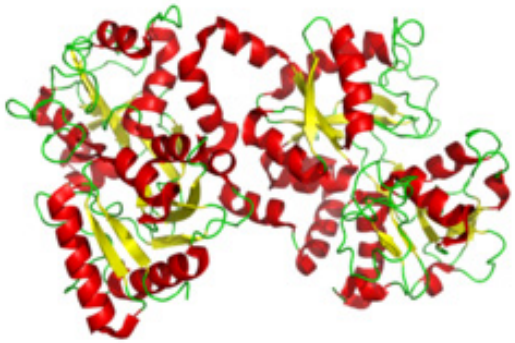
DPM, Hustopeče, 6. 11. 2014
Jan Říha, M.Sc., Ph.D.

Laktoferin – Lactoferrin – Lactotransferrin – LF - LFe



- Protein ze skupiny tzv. transferrinů
  - Globulární glycoprotein přítomný v tělesných tekutinách savců – mléko, sliny, slzy, nosní hlen, krevní plazma, …
- Izolace z mléka savců, rekombinantní syntéza
- Nejvyšší obsah v kolostru, dále v mateřském mléku
  - Lidské kolostrum resp. mléko (3100 – 6700 mg/l resp. 1000 – 3200 mg/l) (Levay and Viljoen, 1995)
  - Kravské mléko (1.15 – 485.63 mg/l) (Hagiwara et al., 2003)

Laktoferin – Lactoferrin – Lactotransferrin – LF - LFe



- Izolován z mléka v roce 1939, první detailní studie 1960
- Schopnost vázat Fe^{3+} ionty – volné železo v těle
  - ~700 aminokyselin, dvě globulární domény – N & C, stabilita asociovaná s úrovní glykolýzy
  - V monomerní či tetrametrní formě, každá molekula schopnost vázat 2 ionty volných kovů

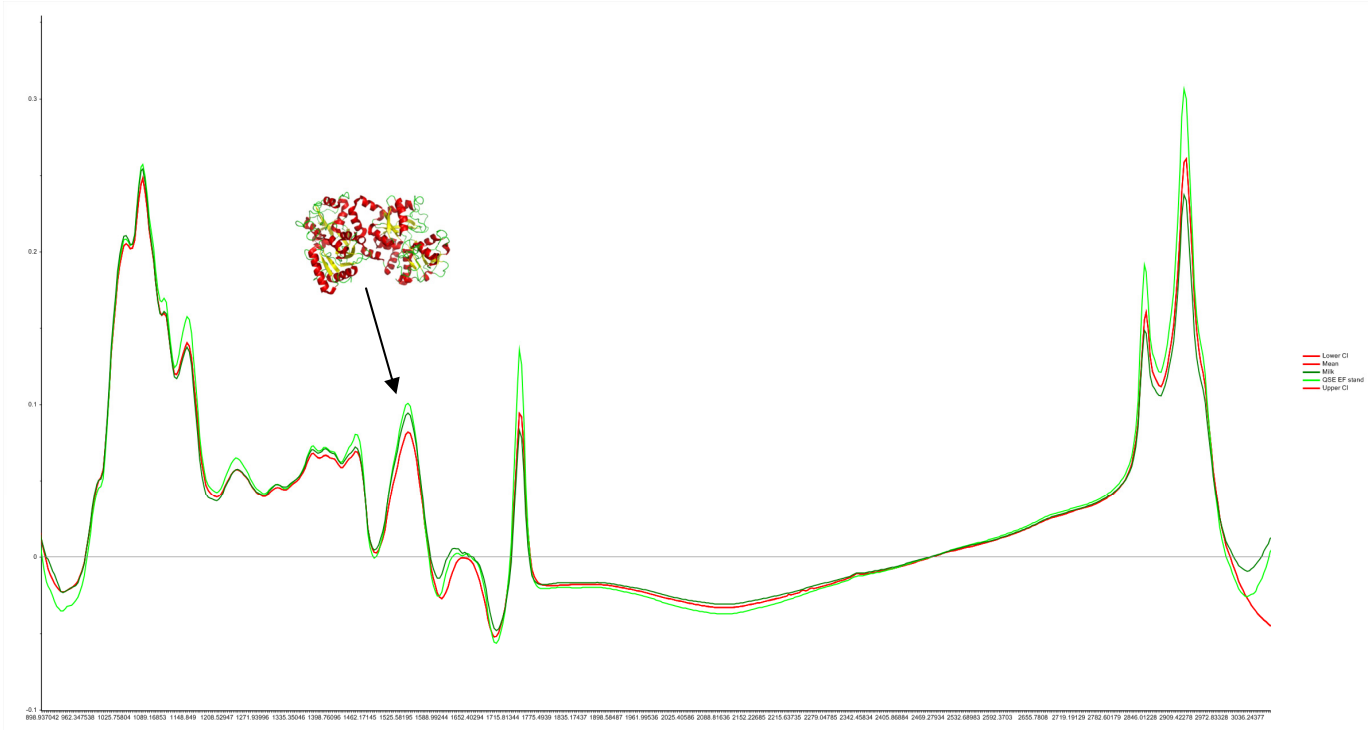
Laktoferin – funkce



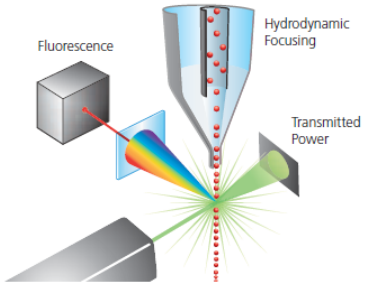
- Součástí přirozeného imunitního systému, „start“ imunitního systému po narození
- Kromě hlavní biologické fce – schopnosti vázat a transportovat volné ionty železa
  - Antibakteriální,
  - Antivirální & -fungální,
  - Antiparasitické,
  - Katalytické,
  - Protirakovinné,
  - Antialergické,
  - Radioprotektivní účinky
  - A další – viz obezita, kostní tkáň, …
- (Adlerová, Bartošková, Faldyna, Lactoferrin: a review, 2008), Google Scholar, WOS, …

Laktoferin & FTIR

- Součást proteinového komplexu







Laktoferin – indikátor mastitid

- Konstrukce hypotézy
  - Předpoklady
    - Počet SB je indikátorem mastitid
    - Zvýšená produkce laktoferinu je odpovědí imunitního systému na zánětlivé onemocnění
    - Ke zvýšení produkce laktoferinu a jeho sekreci do mléka dochází dříve, než nastanou klinické příznaky onemocnění
  - Hypotéza
    - Laktoferin je možno využít jako raný indikátor mastitidního onemocnění dojnic
  - Omezení
    - Časová platnost dat resp. doba jejich sběru vs. zvýšená sekrece laktoferinu
    - Levná analytická metoda

Laktoferin – pilotní studie

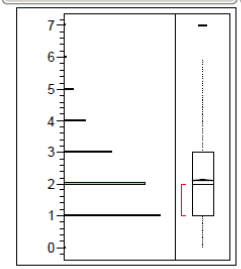
- 11 442 vzorků mléka z KU, 1 farma, data za 12 měsíců

	Vývoj počtu SB												
	2-2013	4-2013	5-2013	6-2013	7-2013	8-2013	9-2013	10-2013	11-2013	12-2013	1-2014	2-2014	3-2014
Počet dojnic v KU	10	984	972	972	924	881	906	930	938	950	974	977	1005
Podíl dojnic SB < 100	30.00	58.03	58.95	56.79	58.12	63.34	59.60	59.46	67.91	68.32	70.53	69.19	65.67
Podíl dojnic SB > 1000	20.00	4.88	5.97	6.48	7.79	6.24	6.18	5.91	4.37	4.11	3.90	3.89	5.37
Průměr SB	498	263	285	363	351	298	297	282	194	244	193	226	261
Průměr SB < 100	38	43	38	38	38	37	41	40	38	40	39	38	41
Průměr SB < 1000	134	146	135	151	145	123	133	132	113	113	104	103	118
Průměr SB > 1000	1954	2550	2645	3416	2786	2922	2787	2673	1966	3288	2380	3263	2773

- Základní složky, močovina, SCC, LFe
- SW modifikace MR-Report (Říha, Seydlová, Hanuš) – www.mastitis.cz – ing. Provazníková pro info
  - Pro skupiny dojnic: 100tis. SB, 1000tis. SB
  - Vývoj počtu SB
  - Rozptyl SB
  - Vývoj dojivosti, laktózy, tuku, bílkoviny
  - Individuální časový report s vizualizací problémových zvířat
- Příklad

Laktoferin – distribuce parametrů I

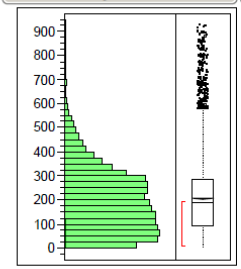
Lactation no



Quantiles		
100.0%	maximum	7.0000
99.5%		6.0000
97.5%		5.0000
90.0%		4.0000
75.0%	quartile	3.0000
50.0%	median	2.0000
25.0%	quartile	1.0000
10.0%		1.0000
2.5%		1.0000
0.5%		0.0000
0.0%	minimum	0.0000

Moments	
Mean	2.1236672
Std Dev	1.1955842
Std Err Mean	0.0111771
upper 95% Mean	2.1455762
lower 95% Mean	2.1017582
N	11442

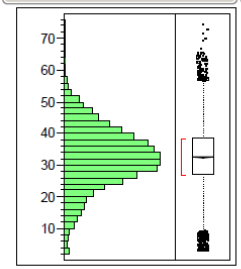
Lactation Day



Quantiles		
100.0%	maximum	926.00
99.5%		788.35
97.5%		546.00
90.0%		386.00
75.0%	quartile	287.00
50.0%	median	186.00
25.0%	quartile	93.00
10.0%		40.30
2.5%		14.00
0.5%		0.00
0.0%	minimum	0.00

Moments	
Mean	205.81463
Std Dev	143.75284
Std Err Mean	1.3438954
upper 95% Mean	208.4489
lower 95% Mean	203.18037
N	11442

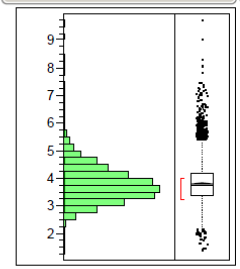
Milk Yield



Quantiles		
100.0%	maximum	74.200
99.5%		57.978
97.5%		51.000
90.0%		44.700
75.0%	quartile	38.700
50.0%	median	32.700
25.0%	quartile	26.900
10.0%		20.200
2.5%		11.800
0.5%		4.222
0.0%	minimum	3.000

Moments	
Mean	32.543568
Std Dev	9.6853161
Std Err Mean	0.0905447
upper 95% Mean	32.721051
lower 95% Mean	32.366085
N	11442

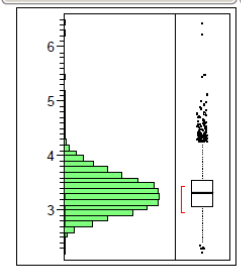
Fat



Quantiles		
100.0%	maximum	9.6900
99.5%		6.0800
97.5%		5.3000
90.0%		4.6400
75.0%	quartile	4.1500
50.0%	median	3.7200
25.0%	quartile	3.3400
10.0%		3.0400
2.5%		2.7000
0.5%		2.3121
0.0%	minimum	1.3700

Moments	
Mean	3.7935466
Std Dev	0.6681642
Std Err Mean	0.0062464
upper 95% Mean	3.8057907
lower 95% Mean	3.7813025
N	11442

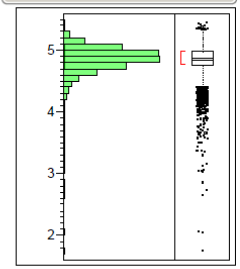
Protein



Quantiles		
100.0%	maximum	6.4200
99.5%		4.3878
97.5%		4.0400
90.0%		3.7800
75.0%	quartile	3.5400
50.0%	median	3.3000
25.0%	quartile	3.0700
10.0%		2.8900
2.5%		2.7100
0.5%		2.5421
0.0%	minimum	2.2100

Moments	
Mean	3.3191496
Std Dev	0.3531894
Std Err Mean	0.0033018
upper 95% Mean	3.3256218
lower 95% Mean	3.3126774
N	11442

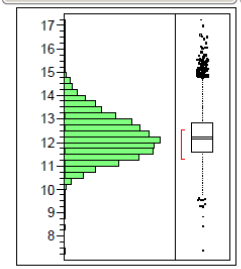
Lactose



Quantiles		
100.0%	maximum	5.4400
99.5%		5.2778
97.5%		5.1700
90.0%		5.0700
75.0%	quartile	4.9800
50.0%	median	4.8700
25.0%	quartile	4.7500
10.0%		4.6100
2.5%		4.3400
0.5%		3.9322
0.0%	minimum	1.7500

Moments	
Mean	4.8455794
Std Dev	0.2169549
Std Err Mean	0.0020282
upper 95% Mean	4.8495551
lower 95% Mean	4.8416038
N	11442

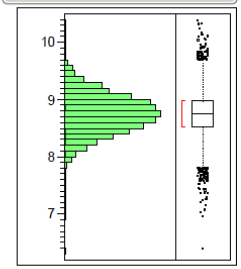
Solids



Quantiles		
100.0%	maximum	17.220
99.5%		15.178
97.5%		14.320
90.0%		13.510
75.0%	quartile	12.840
50.0%	median	12.170
25.0%	quartile	11.570
10.0%		11.110
2.5%		10.621
0.5%		10.152
0.0%	minimum	7.370

Moments	
Mean	12.246522
Std Dev	0.9524004
Std Err Mean	0.0089037
upper 95% Mean	12.263975
lower 95% Mean	12.22907
N	11442

SNF

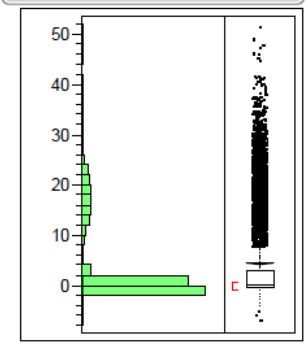


Quantiles		
100.0%	maximum	10.370
99.5%		9.688
97.5%		9.450
90.0%		9.200
75.0%	quartile	8.980
50.0%	median	8.750
25.0%	quartile	8.510
10.0%		8.290
2.5%		8.040
0.5%		7.730
0.0%	minimum	6.380

Moments	
Mean	8.7457359
Std Dev	0.3607133
Std Err Mean	0.0033722
upper 95% Mean	8.7523459
lower 95% Mean	8.7391258
N	11442

Laktoferin – distribuce parametrů II

FFa



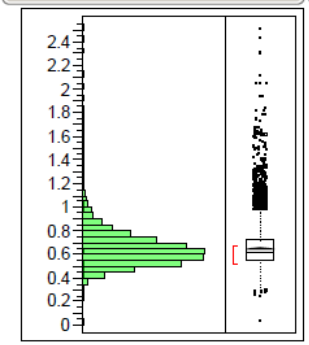
Quantiles

100.0%	maximum	51.16
99.5%		34.35
97.5%		26.54
90.0%		19.01
75.0%	quartile	2.77
50.0%	median	0.30
25.0%	quartile	-0.38
10.0%		-0.85
2.5%		-1.41
0.5%		-2.04
0.0%	minimum	-7.30

Moments

Mean	4.4048715
Std Dev	8.4499484
Std Err Mean	0.0789956
upper 95% Mean	4.5597165
lower 95% Mean	4.2500265
N	11442

OA



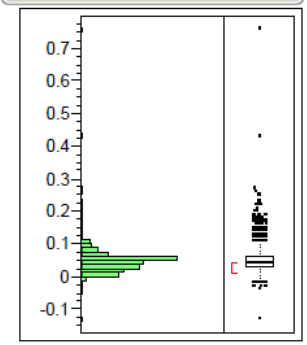
Quantiles

100.0%	maximum	2.5000
99.5%		1.3400
97.5%		1.0400
90.0%		0.8300
75.0%	quartile	0.7200
50.0%	median	0.6200
25.0%	quartile	0.5500
10.0%		0.4900
2.5%		0.4200
0.5%		0.3621
0.0%	minimum	0.0300

Moments

Mean	0.6484513
Std Dev	0.1615236
Std Err Mean	0.00151
upper 95% Mean	0.6514112
lower 95% Mean	0.6454914
N	11442

Acetone



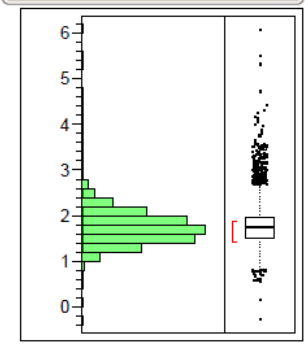
Quantiles

100.0%	maximum	0.7600
99.5%		0.1600
97.5%		0.1100
90.0%		0.0800
75.0%	quartile	0.0600
50.0%	median	0.0400
25.0%	quartile	0.0300
10.0%		0.0100
2.5%		0.0000
0.5%		-0.0200
0.0%	minimum	-0.1300

Moments

Mean	0.0449275
Std Dev	0.0297271
Std Err Mean	0.0002779
upper 95% Mean	0.0454722
lower 95% Mean	0.0443827
N	11442

BHBB



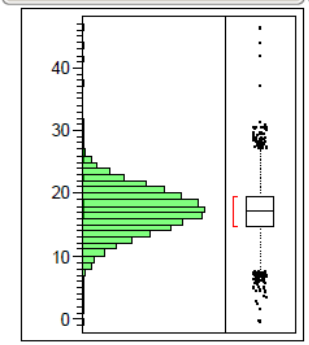
Quantiles

100.0%	maximum	6.040
99.5%		3.256
97.5%		2.600
90.0%		2.220
75.0%	quartile	1.970
50.0%	median	1.720
25.0%	quartile	1.500
10.0%		1.320
2.5%		1.110
0.5%		0.920
0.0%	minimum	-0.290

Moments

Mean	1.7548776
Std Dev	0.3884713
Std Err Mean	0.0036317
upper 95% Mean	1.7619964
lower 95% Mean	1.7477589
N	11442

BHB (mg/kg)



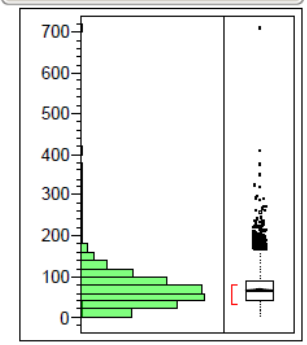
Quantiles

100.0%	maximum	46.20
99.5%		27.21
97.5%		24.39
90.0%		21.89
75.0%	quartile	19.70
50.0%	median	17.27
25.0%	quartile	14.78
10.0%		12.42
2.5%		9.70
0.5%		7.09
0.0%	minimum	-0.56

Moments

Mean	17.227102
Std Dev	3.7661857
Std Err Mean	0.0352088
upper 95% Mean	17.296117
lower 95% Mean	17.158087
N	11442

LFe 2



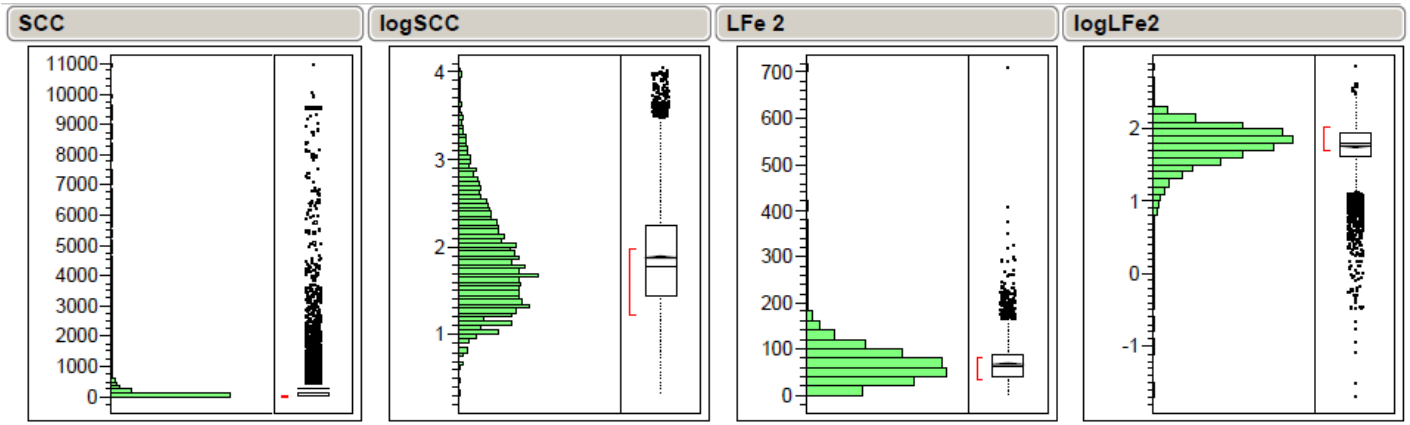
Quantiles

100.0%	maximum	707.99
99.5%		201.02
97.5%		154.80
90.0%		117.34
75.0%	quartile	89.67
50.0%	median	63.14
25.0%	quartile	39.84
10.0%		21.82
2.5%		3.08
0.5%		0.00
0.0%	minimum	0.00

Moments

Mean	67.397387
Std Dev	39.325232
Std Err Mean	0.3676379
upper 95% Mean	68.11802
lower 95% Mean	66.676753
N	11442

Laktoferin – indikátory mastitid



Quantiles		
100.0%	maximum	10921
99.5%		6583
97.5%		2046
90.0%		535
75.0%	quartile	176
50.0%	median	61
25.0%	quartile	27
10.0%		15
2.5%		9
0.5%		5
0.0%	minimum	0

Moments	
Mean	270.70426
Std Dev	815.04888
Std Err Mean	7.6206081
upper 95% Mean	285.64196
lower 95% Mean	255.76656
N	11439

Quantiles		
100.0%	maximum	4.0383
99.5%		3.8185
97.5%		3.3109
90.0%		2.7284
75.0%	quartile	2.2455
50.0%	median	1.7853
25.0%	quartile	1.4314
10.0%		1.1761
2.5%		0.9542
0.5%		0.6990
0.0%	minimum	0.3010

Moments	
Mean	1.879514
Std Dev	0.6104527
Std Err Mean	0.0057079
upper 95% Mean	1.8907024
lower 95% Mean	1.8683255
N	11438

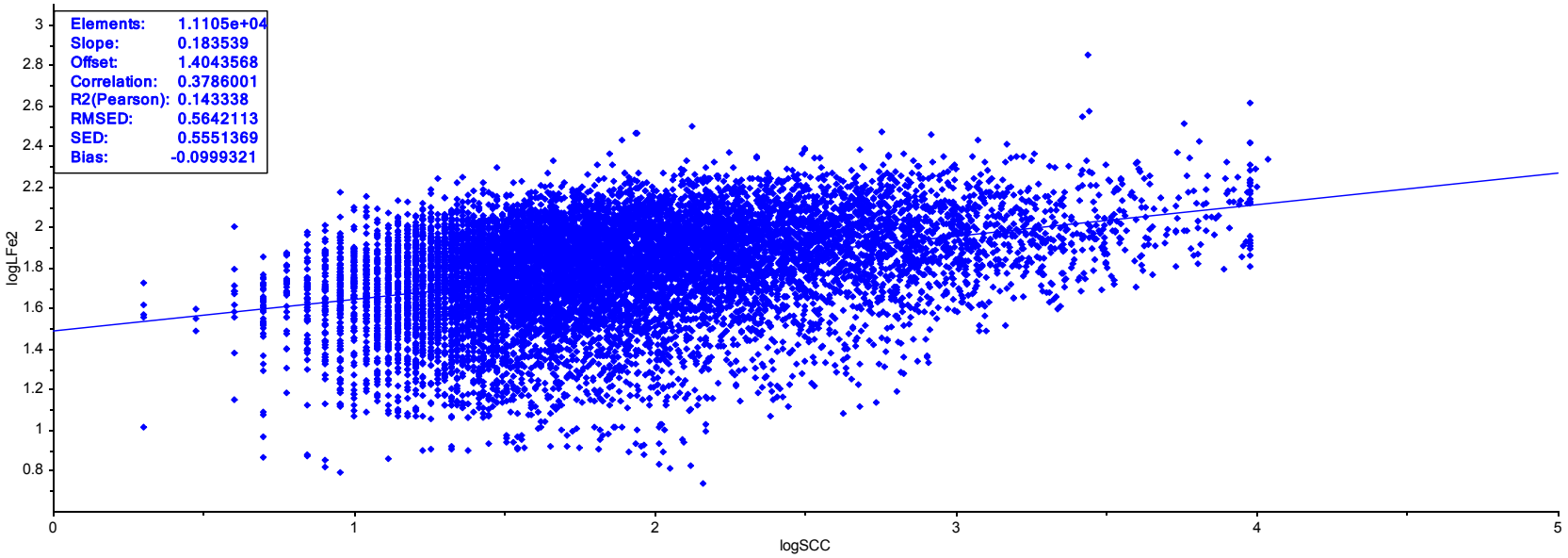
Quantiles		
100.0%	maximum	707.99
99.5%		201.02
97.5%		154.80
90.0%		117.34
75.0%	quartile	89.67
50.0%	median	63.14
25.0%	quartile	39.84
10.0%		21.82
2.5%		3.08
0.5%		0.00
0.0%	minimum	0.00

Moments	
Mean	67.397387
Std Dev	39.325232
Std Err Mean	0.3676379
upper 95% Mean	68.11802
lower 95% Mean	66.676753
N	11442

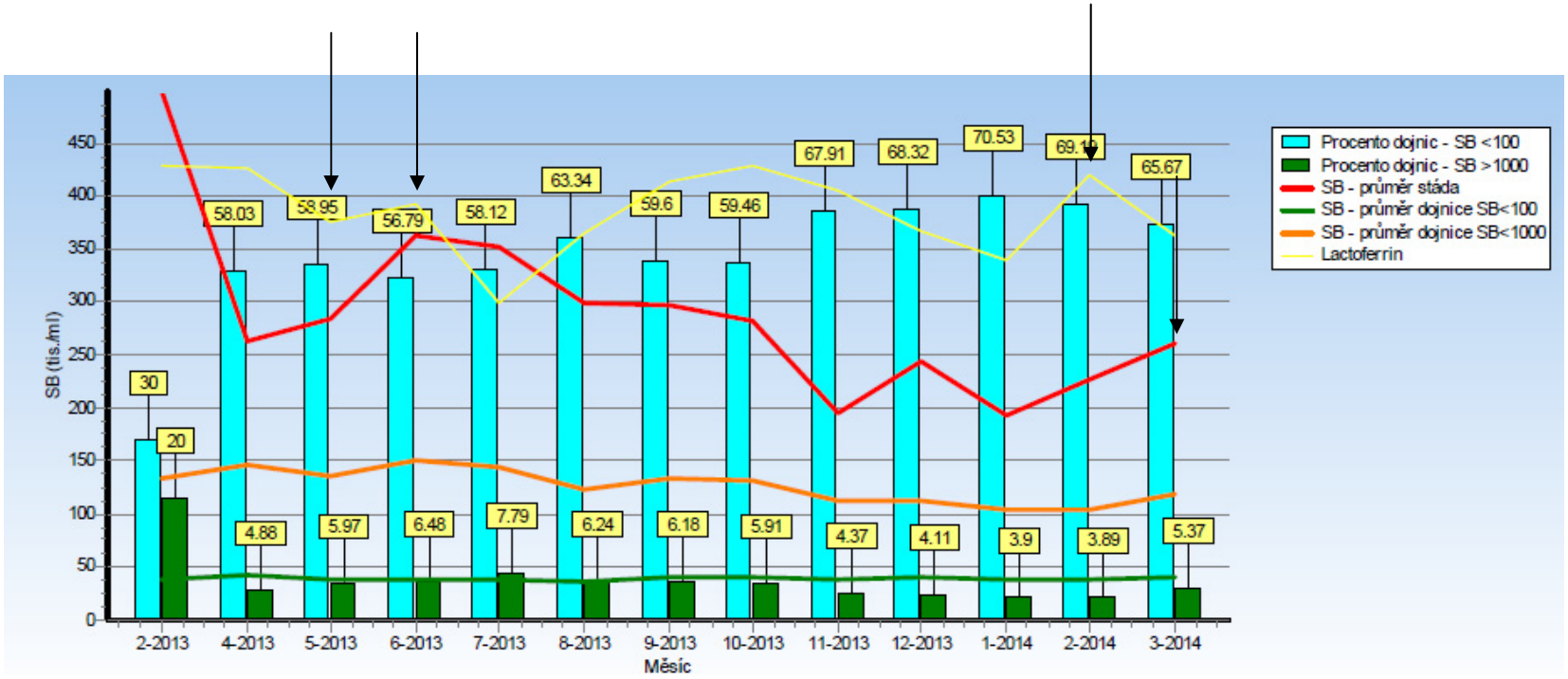
Quantiles		
100.0%	maximum	2.850
99.5%		2.304
97.5%		2.191
90.0%		2.071
75.0%	quartile	1.956
50.0%	median	1.807
25.0%	quartile	1.613
10.0%		1.388
2.5%		0.982
0.5%		0.396
0.0%	minimum	-1.699

Moments	
Mean	1.7525746
Std Dev	0.3159824
Std Err Mean	0.0029824
upper 95% Mean	1.7584207
lower 95% Mean	1.7467285
N	11225

Laktoferin vs. počet SB

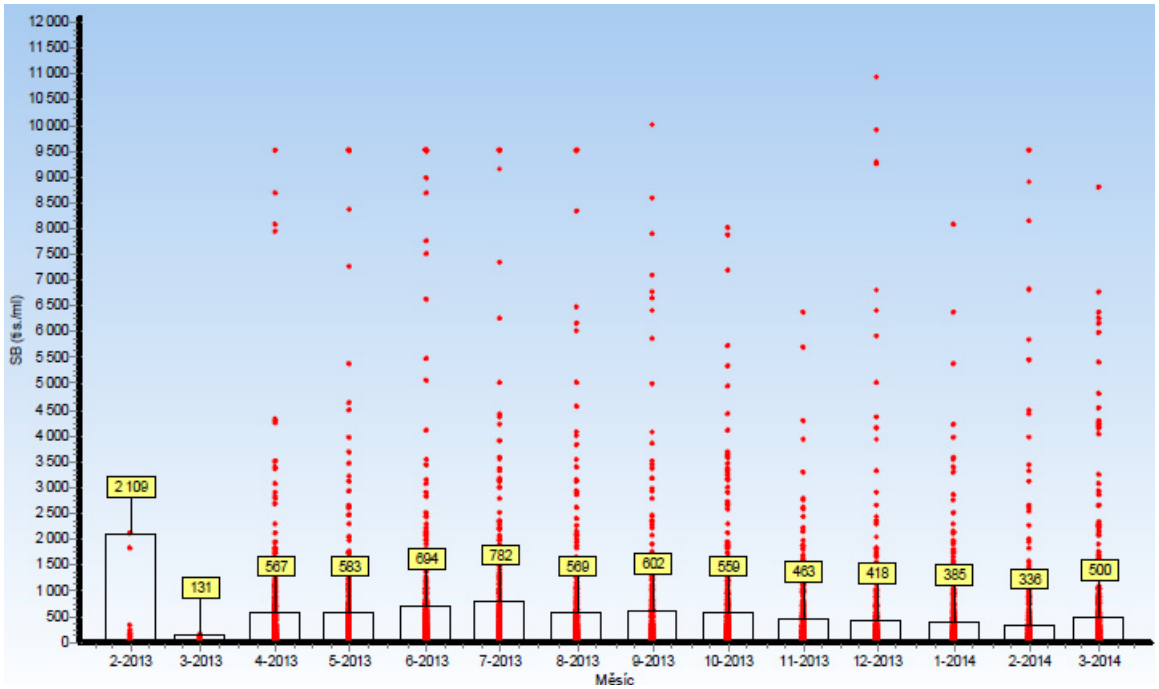


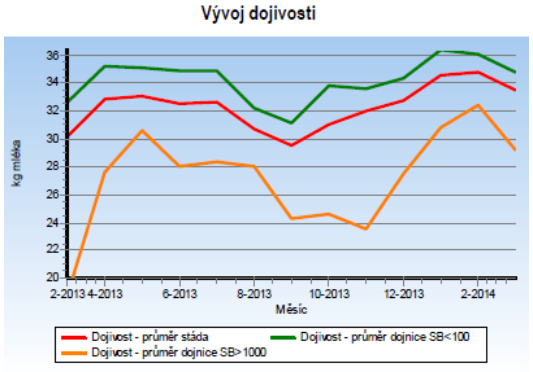
Data – vývoj v čase

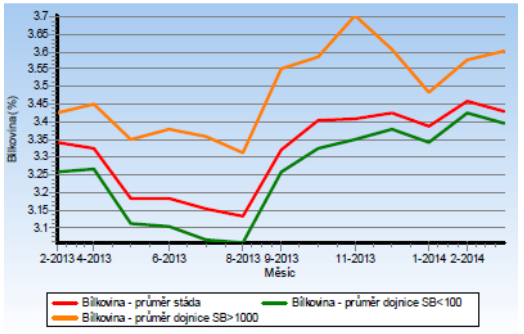


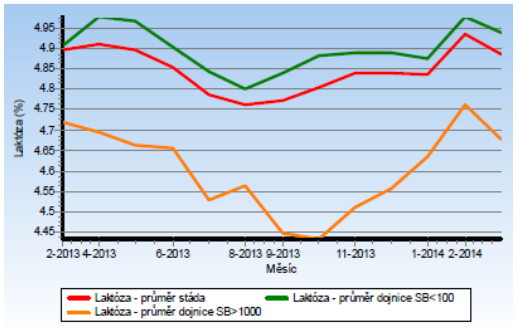
- souhrnná data – jsou dost popisná?
- nemohou být – individuální schopnost produkce LFe daná geneticky, …

Data – vývoj v čase







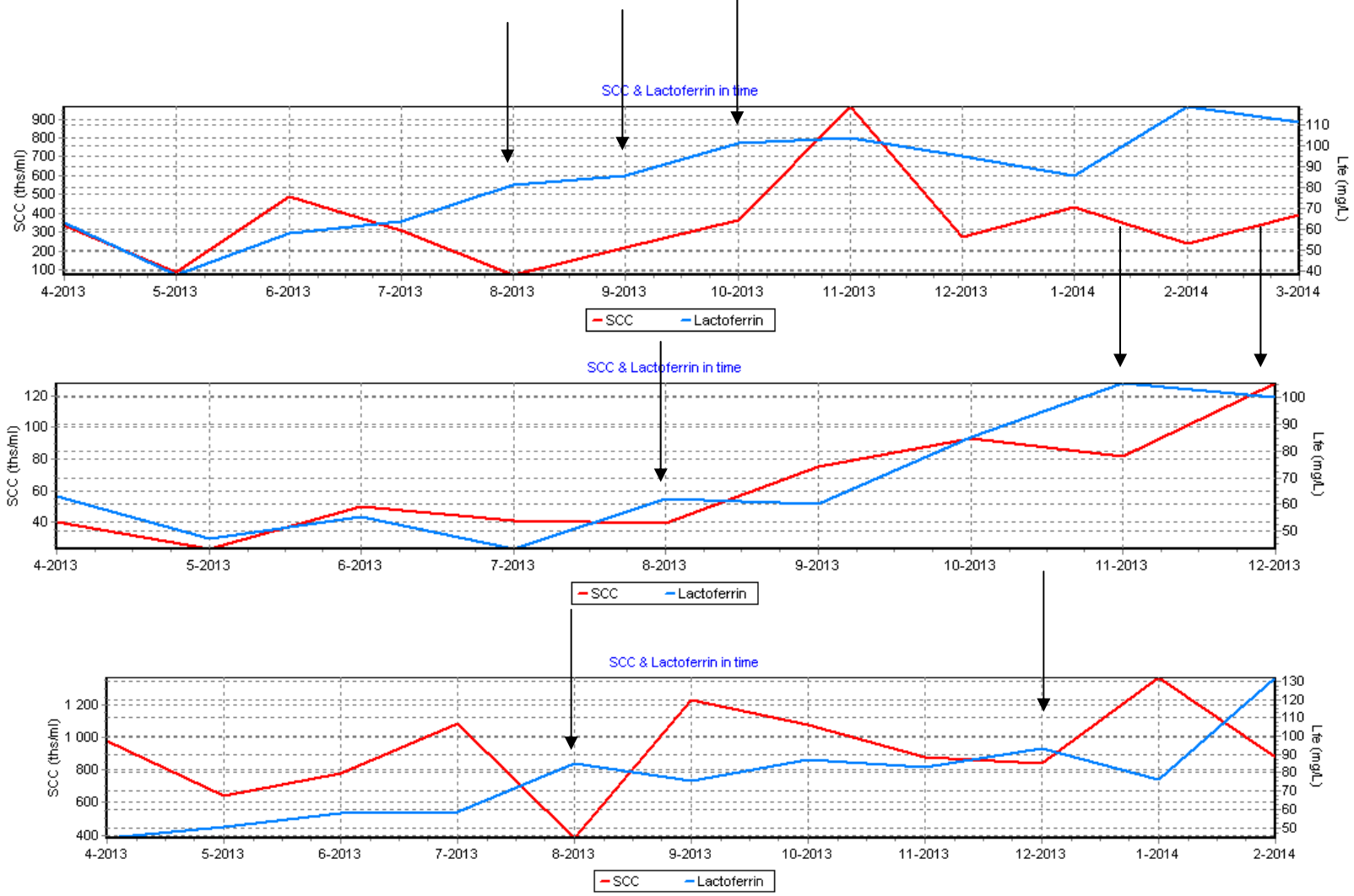


Data – individuální výsledky



LFE		DATUM													
DOJNICE		02.2013	03.2013	04.2013	05.2013	06.2013	07.2013	08.2013	09.2013	10.2013	11.2013	12.2013	01.2014	02.2014	03.2014	Průměrný počet SB
CZ0001394369	SB	N/A	N/A	85	563	323	317	338	596	1432	4280	10921	N/A	N/A	N/A	2095
	LFE	N/A	N/A	58	66	104	81	89	113	147	111	217	N/A	N/A	N/A	110
CZ0001633079	SB	N/A	N/A	N/A	N/A	21	10	3371	9995	301	407	408	37	44	N/A	1622
	LFE	N/A	N/A	N/A	N/A	11	4	94	157	79	78	62	67	90	N/A	71
CZ0001634249	SB	N/A	N/A	1363	1712	1197	402	N/A	594	147	104	9884	781	933	745	1624
	LFE	N/A	N/A	92	91	125	163	N/A	37	41	39	193	79	84	85	93
CZ0001561539	SB	N/A	N/A	784	334	197	9500	485	296	527	67	313	424	477	N/A	1219
	LFE	N/A	N/A	126	74	106	259	103	101	102	136	181	167	140	N/A	136
CZ0001501129	SB	N/A	N/A	2665	1103	1952	4344	9500	2926	3675	1677	N/A	N/A	N/A	N/A	3480
	LFE	N/A	N/A	59	68	71	82	132	102	96	101	N/A	N/A	N/A	N/A	89
CZ0001560879	SB	N/A	N/A	305	9500	6612	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	5472
	LFE	N/A	N/A	53	189	129	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	124
CZ0001561969	SB	N/A	N/A	62	240	9500	1318	625	1876	2992	463	447	1168	739	1410	1737
	LFE	N/A	N/A	80	63	151	121	113	164	143	134	112	117	106	99	117

Laktoferin – indikátor mastitid na individuální úrovni



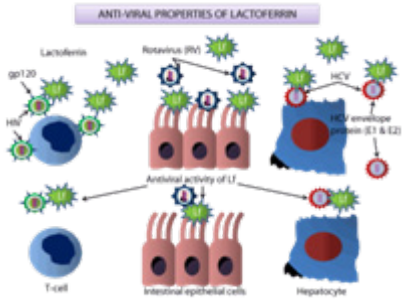
Laktoferin – indikátor mastitid

- **Konstrukce hypotézy**
  - **Předpoklady**
    - **Počet SB je indikátorem mastitid**
    - **Zvýšená produkce laktoferinu je odpovědí imunitního systému na zánětlivé onemocnění**
    - **Ke zvýšení produkce laktoferinu a jeho sekreci do mléka dochází dříve, než nastanou klinické příznaky onemocnění**
  - **Hypotéza**
    - **Laktoferin je možno využít jako ranný indikátor mastitidního onemocnění dojnic na individuální úrovni**
  - **Podhypotéza**
    - **Pro normované měsíční hodnoty počtu SB a množství LFe v individuálním vzorku mléka platí, že pokud je normovaná hodnota LFe v předchouím měsíci vyšší než normovaná hodnota počtu SB a zároveň vyšší, než v měsíci předešlém, pak hodnota počtu SB v měsíci následujícím je vyšší, než v akutálním.**
  - **Výsledek – laktoferin je možno využít jako individuální raný indikátor mastitidního onemocnění dojnic.**

Laktoferin – indikátor mastitid a dále?

- Raný indikátor mastitid na individuální úrovni
- „Funkční/zdravé“ mléko
  - Vysoké SB/vysoký LFe – mastitita
  - Nízké SB/vysoký LFe – genetika
  - Vysoké SB/nízký LFe – genetika
  - Nízké SB/nízký LFe – bez problémů

Life Extension Magazine
Life Extension Magazine May 2014
REPORT
Weight Loss Benefits of Lactoferrin

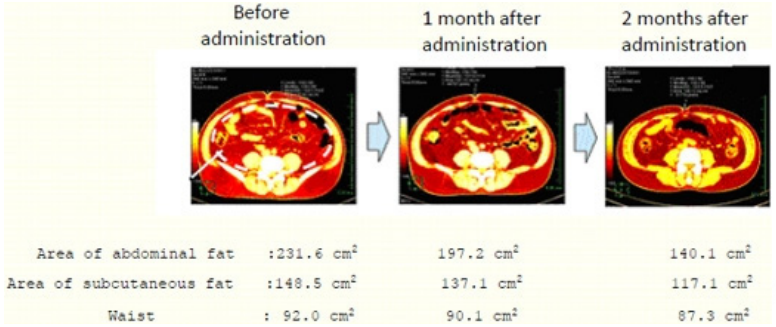














Nové směry?

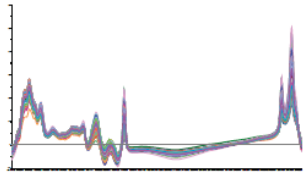
- Maximální využití informace ze vzorku mléka přesnými analytickými metodami
- Minimalizace nákladů na vzorkování, analýzu

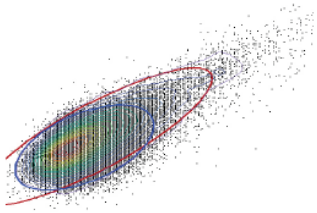
- Služby, které umožní informace používat

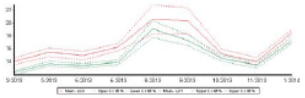
- příklad

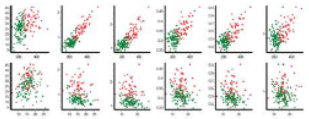
Nové směry - ketózy?

- **Pravděpodobnostní systém detekce ketóz z FTIR analýzy mléka (pat. pending)**













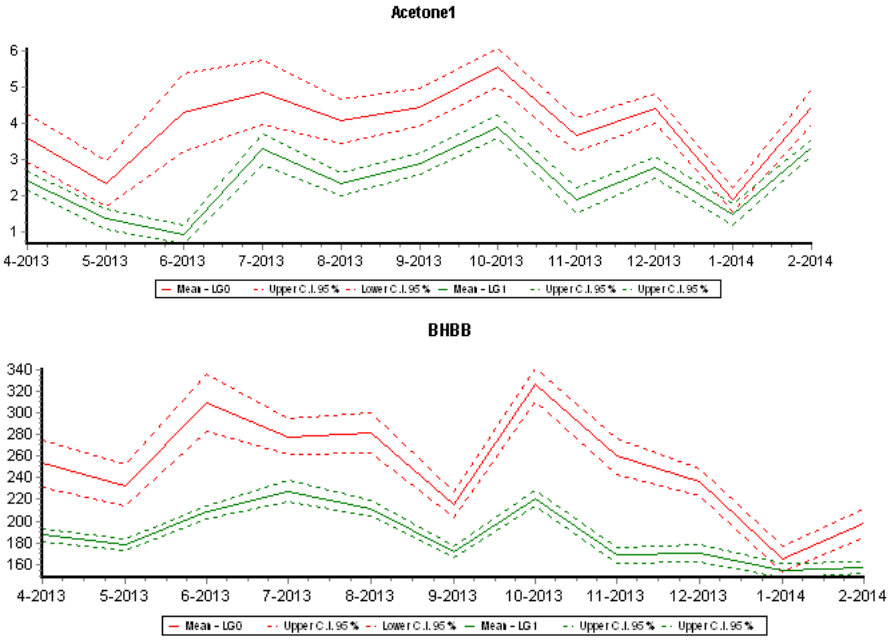
- Eliminace efektu stáda, vzorkování, sezóny
- Robustní a vyčíslitelná pravděpodobnost detekce ketózy
- Snadná interpretace výsledků
- Časový přehled vývoje
- Využití vzorků z KU

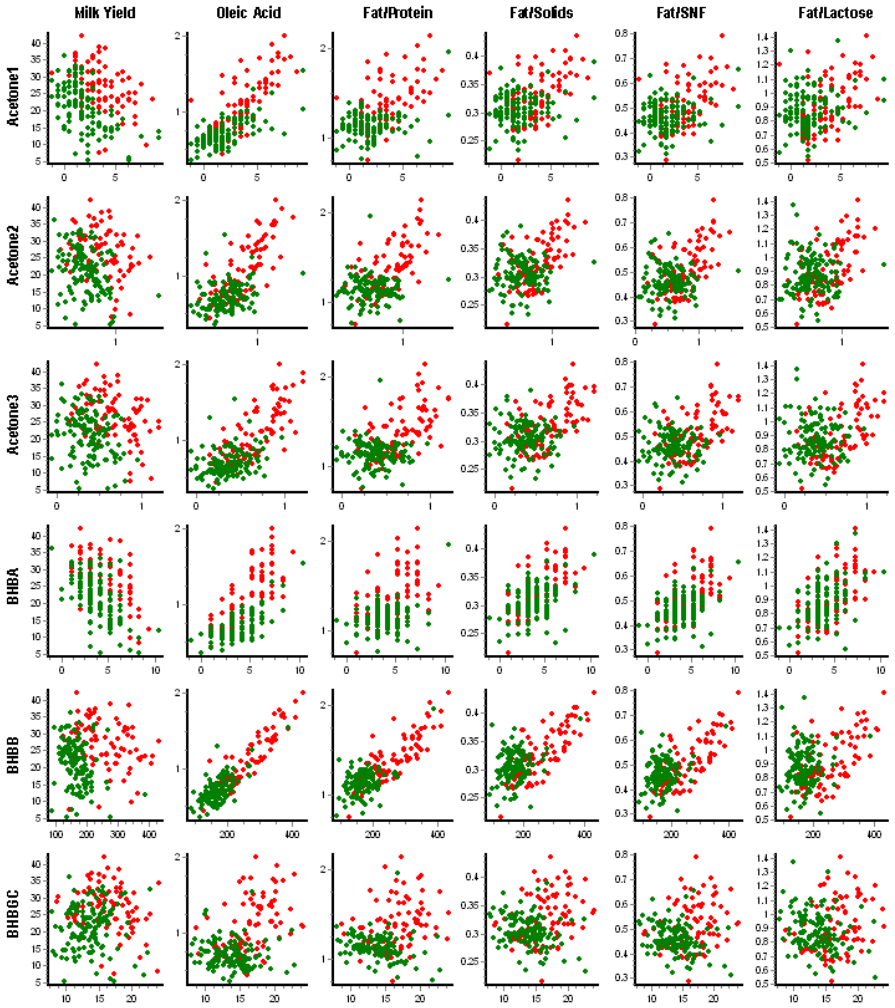
Ketosis Detection

Calibrations • Algorithms • System • Probabilistic Prediction • Detection • Data Presentation

Nové směry - ketózy?

- Pravděpodobnostní systém detekce ketóz z FTIR analýzy mléka





Nové směry?

- ***Pravděpodobnostní systém detekce ketóz z FTIR analýzy mléka***

ID												
	OA	F/P	F/S	F/SNF	F/L	[redacted]						Lact. Day
CZ000[redacted]	0.87	1.32	0.32	0.48	0.84	2.90	13.58	10.03	3.12	208.20	17.67	46
CZ000[redacted]	2.00	2.13	0.44	0.79	1.41	7.55	17.91	8.90	7.29	434.10	17.31	27
CZ000[redacted]	0.82	1.26	0.29	0.43	0.72	1.16	8.16	3.77	3.12	234.23	18.35	54
CZ000[redacted]	0.63	1.13	0.30	0.44	0.82	0.58	3.56	2.57	3.12	150.95	18.29	74
CZ000[redacted]	1.08	1.51	0.34	0.53	0.91	2.32	5.30	3.68	7.29	295.64	24.08	38
CZ000[redacted]	0.81	0.98	0.27	0.39	0.73	3.49	4.03	2.95	3.12	163.44	11.45	67
CZ000[redacted]	1.54	1.63	0.38	0.64	1.18	4.07	13.21	8.94	7.29	342.49	20.12	13
CZ000[redacted]	1.70	1.90	0.41	0.71	1.27	5.23	17.93	7.33	5.20	368.51	19.73	10
CZ000[redacted]	1.35	1.69	0.37	0.59	1.02	4.07	6.31	3.62	6.25	339.37	18.05	30
CZ000[redacted]	1.14	1.45	0.37	0.61	1.20	-1.16	4.26	3.21	3.12	195.71	14.31	8
CZ000[redacted]	1.68	1.93	0.40	0.67	1.15	3.49	16.11	8.13	7.29	410.15	20.20	46

- ***Blízká budoucnost:* Cloudová služba**

Probabilistic prediction of ketosis.

(pat. pending)

- **Elimination of sampling, farm, season effect but also robustness**
  - Sophisticated prediction function
- **Calculated and high probability of ketosis detection**
  - Including calibrations limitations, limitations of parameters used for on-farm detection
- **Special data presentation method**
  - Easy-to-use farm report
  - Historical overview
  - Multidimensional data presentation

System for complete solution using Bentley Instruments equipment

Děkuji za pozornost!