



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper, avd. för reproduktion

Reproduktionsstyrning med hjälp av progesteronmätning i mjölkbesättning

Validering och tillämpning av en portabel ELISA mätare

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Pontus Fällman', is positioned to the left of the printed name.

Pontus Fällman

Uppsala

2009

Heriberto Rodriguez-Martinez, Handledare, 2009-12-10

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:27*

SLU
Sveriges Lantbruksuniversitet

Reproduktionsstyrning med hjälp av progesteronmätning i mjölkbesättning

Validering och tillämpning av en portabel ELISA mätare

Pontus Fällman

*Handledare: Heriberto Rodriguez-Martinez,
Avd för reproduktion, Institutionen för kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Johanna Geust, Nötcenter Viken
Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2009
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper, avd för reproduktion
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

*Nyckelord: progesteron, "on farm", reproduktion, mjölkko, kviga, förstakalvare, MOET
Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:27*

Innehållsförteckning

Abstract	4
Sammanfattning	4
Inledning	5
Bakgrund	6
Mjölkkavkastning och brunstsinalering	6
Brunstpassning – trender och hjälpmedel	7
”On-farm” mätning av progesteron (P ₄)	8
Nya reproduktionstekniker – kan P ₄ mätningar on-farm vara ett bra hjälpmedel?	9
Studiens syfte	10
Material & metoder	11
Nötcenter Viken	11
Djurhållning och drift	11
Studiens upplägg och genomförande	12
AI djur	12
<i>Provtagning</i>	12
<i>Försöksgruppen</i>	13
MOET djur	13
<i>Hormonbehandlingar och rutiner</i>	13
<i>Provtagning av givar- och mottagardjur</i>	14
Hantering av prover	14
Mätning av progesteron i eProCheck®800	15
Statistiska metoder	15
Resultat	15
Delstudie 1: Validering av eProCheck®800	15
<i>Direkt validering – ‘assays’</i>	16
<i>Testning av P₄ nivåer på olika prov - parprover</i>	18
Delstudie 2: Tillämpning av eProCheck®800	20
<i>Progesteronmätningar vid AI - brunstpassning och dräktighetskontroll</i>	20
<i>MOET – progesteronmätningar av givar- och mottagardjur</i>	21
Diskussion	23
Delstudie 1: validering av eProCheck®800	23
Delstudie 2: tillämpning av eProCheck®800	24
<i>AI djur</i>	25
<i>MOET djur</i>	26
Slutsatser	27
Litteraturförteckning	28
Tack till	30

Abstract

There is a direct link between increasing milk yield in our dairy breeds SRB and SLB and some reproductive disorders. Problems linked to fertility are now the main cause of culling in dairy breeds. Higher levels of production lead to shorter and less detectable heat signs or even to absence of signs, and in first-parity cows, where the problem is mostly seen, it is associated with their delayed resumption of ovarian activity after calving. In other words, the importance of heat detection increases while the resources for so doing become scarcer. An aid to monitor oestrus detection and perform pregnancy diagnosis is offered by the measurement of P_4 (progesterone) concentrations in milk or blood. Therefore, in this study we have tested and used a portable and easy-to-use instrument for on-farm measurement of P_4 based on the ELISA technique. Our experimental herd comprised heifers and first-parity cows of breeds SRB and SLB (95 animals in total). Since new reproductive technologies such as embryo transfer (MOET) is widely used globally, we have also made measurements of P_4 in heifers used in a standardized MOET program. The instrument showed satisfactory accuracy for measuring P_4 in both blood serum, blood plasma and milk, although the degree of accuracy was lower in milk samples compared to blood. Measuring P_4 at day 0 of the oestrous cycle was a good complement to other methods for determining when insemination was to be performed. Measurements of P_4 on day 0 and 20 of the oestrous cycle had a positive correlation with the pregnancy outcome. There was also a correlation between the expected progesterone profiles and good embryo quality (morphology). Monitoring P_4 on-farm is a good complement for cow reproductive management.

Keywords: progesterone, on farm, reproduction, dairy cattle, heifer, first parity cows, MOET

Sammanfattning

Det finns en direkt koppling mellan den allt högre mjölkavkastningen hos våra mjölkkraser SRB och SLB och vissa reproduktionsstörningar. Posten fruktsamhet är idag den största utslagsorsaken i kokontrollen. Högre produktionsnivåer leder till kortare och mer svårupptäckta brunster eller t o m till att brunst helt uteblir. Det tar också längre tid för kon att komma i brunst efter kalvning. Allra tydligast ses detta hos gruppen förstakalvare. Vikten av brunstpassning blir m a o allt större samtidigt som resurserna att utföra densamma blir allt knappare. Ett hjälpmedel vid brunstpassning och dräktighetsdiagnostik är mätning av progesteron (P_4) koncentrationer i mjölk och blod. Därför har vi i denna studie utvärderat och tillämpat ett portabelt och lättanvänt instrument baserat på ELISA teknik för mätning on-farm av P_4 . I vår försöksgrupp har det ingått kvigor och förstakalvare av raserna SRB och SLB (sammanlagt 95 djur). Eftersom användningen av nya reproduktionstekniker såsom embryotransfer (MOET) har stor betydelse i ett globalt perspektiv har vi även gjort P_4 mätningar på kvigor som använts i ett standardiserat MOET program. Vår utvärdering av instrumentet har visat att mätnoggrannheten är tillfredställande för mätning av P_4 i såväl serum, plasma som mjölk. Bäst resultat ses på prover tagna i plasma och serum. Vi har också sett att mätning vid dag 0 i brunstcykeln av P_4 är ett bra komplement till andra metoder för att avgöra när insemination skall utföras. Mätningar av P_4 på dag 0 och 20 i brunstcykeln har ett positivt samband med dräktighetsutfallet. Vi fann även att god embryomorfologi hade en positiv korrelation med förväntade progesteron profiler. Sammanfattningsvis kan sägas att reproduktionsstyrning m h a P_4 mätning erbjuder ett gott komplement till andra hjälpmedel.

Inledning

Urval av mjölkboskap har under lång tid fokuserat på mjölkavkastning där snabba avelsframsteg har blivit möjliga tack vare användning av förfinade och nya reproduktionstekniker; alltifrån semin (AI) till embryo transfer (ET) (Scherzer et al., 2008). Det är dock idag ett vedertaget faktum att allt högre mjölkavkastning medför försämrad förmåga till reproduktion hos våra mjölkkor. Parallellt ses även påverkan på hälsa och djurvälstånd i största allmänhet. Exempelvis ses en försämring av samtliga nyckeltal som rör reproduktion; t ex högre kvot antal inseminationer/dräktighet, längre kalvningsintervall och ett sjunkande fruktsamhetsindex (Hans Gustafsson, pers. medd.). Orsakerna till försämrad fruktsamhet hos högavkastande kor är bl a embryonal död (både tidig, tom dag 20, och sen, tom dag 42), försämrad oocytkvalité, 'tysta brunster', förkortade brunsttider eller i värsta fall kor som inte kommer i brunst igen (anöstrala) (Rodriguez-Martinez et al., 2008). Ett ytterligare bevis för denna trend är att fertilitetsstörningar (tätt följd av juverhälsa) idag är den främsta utslagsorsaken i kokontrollens statistik (Hans Gustafsson, pers. medd.).

Högre mjölkavkastning är alltså inte bara av godo. Att upprätthålla hög produktion är förstås av vikt men var går gränsen? Det finns idag ett ökat medvetande om att denna utveckling inte är hållbar på sikt. Avelsmålet bör även inkludera mål för hälsa och fruktsamhet, på liknande sätt som idag sker i de nordiska länderna, samt att vikterna för de olika komponenterna justeras kontinuerligt. Det yttersta målet skall vara att uppnå en mer balanserad syn på vad som är rimligt att begära av en högavkastande ko, eller m a o hur man bäst kan uppnå en fortsatt hög produktion samtidigt som djurens hälsa inte åsidosätts. Liksom för all verksamhet som drivs i fri konkurrens och med ett vinstgivande syfte finns en praktisk och ekonomisk verklighet som näringsidkaren har att rätta sig efter. Ett bland många problem i detta sammanhang är de negativa konsekvenser som den allt högre produktionen får för korsk brunstförmåga (Rodriguez-Martinez et al., 2008). Allra tydligast blir detta för gruppen förstakalvare som därmed löper större risk att bli utslagna i ett tidigt skede.

En bland flertalet metoder som används för upptäckt av dräktigheter, brunst och reproduktionsstörningar är mätning av hormonet progesteron (P_4) i perifert blod alternativt mjölk. I denna studie utvärderas och tillämpas ett nytt och enkelt instrument som kan användas on-farm för mätning av P_4 -nivåer i blod (serum och plasma) och mjölk. Studien har omfattat kvigor och gruppen förstakalvare som inseminerats inom ramen för den vanliga driften vid Nötcenter Viken (Västra Götaland) samt även kvigor som används som givare och mottagare av embryon, MOET ('Multiple Ovulation and Embryo Transfer'). Besättningen karaktäriseras av högt selekterade djur med hög genetisk potential för mjölkavkastning med likvärdiga förhållanden gällande djurfoder- och skötsel.

Bakgrund

Mjölkkavkastning och brunstsignalering

Under en tioårsperiod (1998 – 2008) ökade den genomsnittliga mjölkkavkastningen i Sverige för raserna Svenskröd (SRB) och Svensk Lågländ (SLB) från ca 8 000 kg ECM till ca 10 000 kg ECM (www.svenskmjolk.com). Under samma period sjönk andelen lyckade insemineringar (DR% / AI) för SRB från 47 till 45 och för SLB från 46 till 43 % (Hans Gustafsson, pers. medd.). I en stor studie utförd i Nebraska, USA mellan 1951 och 1996 sågs en ökning i mjölkproduktion från 4000 till 10 000 kg samtidigt som dräktighetsprocenten fallit från 60 till 40 % (Butler, 2000). Det är ett talande faktum att födelsetalen för kvigor av Holstein ras inte har minskat i samma utsträckning, vilket understryker att fertilitetsstörningar direkt kan relateras till en ökad produktion av mjölk (Rodriguez-Martinez et al., 2008).

Brunstens längd är negativt korrelerad till den dagliga mjölkkavkastningen. I en studie av amerikanska Holstein kor är den uppmätta brunsttiden vid 30 kg per dag 14 timmar medan den vid 40 kg faller drastiskt till ca 6 timmar. Vid en produktion på 60 kg är den drygt 2 timmar (Lopez et al, 2004). Detta kan väl förklara svårigheter med att få förstakalvare att bli dräktiga.

Man kan peka på ett flertal trender inom den moderna mjölkproduktionen som har en negativ påverkan på fruktsamheten hos mjölkkraserna. Exempelvis leder en ökad mjölkproduktion till en ökad metabolisk stress hos kon, som i sin tur leder till en period av negativ energibalans (NEB) under de första 8-12 veckorna i laktationen, vilket sammanfaller med den period där den första ovulatoriska brunsten skall iakttas och AI genomföras för ny dräktighet. Kor i negativ energibalans får dock en fördröjd första ägglossning efter partus vilket ofta leder till omlöpning efter semin (Rodriguez-Martinez et al., 2008). Vid en hullförlust av 1 poäng post-partum sker ovulationen efter 42 dagar istället för efter 31 dagar då förlusten ligger mellan 0,5 och 1 hullpoäng (pers. medd. Hans Gustafsson). Man har även visat på att högvastande kor har lägre halter av både östrogen och progesteron i perifert blod (Wiltbank, 2006). Minskade nivåer av östrogen leder till sämre brunst och minskad progesteron till en högre incidens av embryodöd. Sammantaget yttrar sig negativ energibalans i ett flertal störningar med konsekvenser för reproduktion; svaga brunsttecken, dålig oocytkvalité, fler fall av tidig embryodöd, förkortad follikelfas och anöstrus (Rodriguez-Martinez et al., 2008).

Många studier har gjorts för att komma till rätta med effekterna av NEB i syfte att bibehålla ett lämpligt intervall mellan kalvningar. Tyvärr finns det ingen 'golden standard' och avel har heller inte kunnat råda bot på problemet. Det råder ett negativt samband mellan avelsframsteg för mjölkkavkastning, å ena sidan, och hälsa och fertilitet å andra sidan. Enligt Rodriguez-Martinez et al. (2008) uppskattas den negativa korrelationen till 0,2-0,4 vilket tyder på att det finns en stor variation mellan djuren. Den ensidiga fokuseringen på hög avkastning tillsammans med ett ökat utnyttjande av sperma från ett fåtal tjurar har troligen accentuerat denna utveckling. Till detta skall läggas att arvbarheten för de nyckeltal som berör reproduktion är låg (< 5 %) (Petersson, 2007). Olikheter i skötsel och rutiner kan dock delvis förklara den låga arvbarheten i detta hänseende. Hursomhelst kan man hoppas att den

variation som existerar bland djuren gör det möjligt att öka möjligheterna för ett bättre riktat avelsarbete.

Som denna genomgång visat handlar det idag i stort sätt om att hålla reproduktionsnivån på en godtagbar nivå samtidigt som djurhälsan och mjölkproduktionen också vidmakthålls på en hög nivå. Uppgiften är svår men inte omöjlig. Arvbarheten må vara låg för hälsoparametrarna (t ex juver- och klövhälsa) liksom för fertilitet men variationen är stor. Ett ökat utrymme för dessa egenskaper inom avelsarbete har många förutsättningar att bära frukt.

Brunstpassning – trender och hjälpmedel

Som redan belysts är brunsten ett centralt fenomen inom reproduktion och en förutsättning för att AI skall lyckas. Vid djurägarens och –skötarens brunstobservationer är de fysiologiska signaler som djuren visar som ligger till grund för beslut om AI. Ju starkare brunstsymtom djuren visar desto högre är oddsen för att AI görs vid rätt tidpunkt och befruktningen lyckas.

Brunstcykeln hos kor är vanligen 21 dagar. Cykelns längd kan variera något beroende på hur många follikelvågor cykeln innehåller (Larsson et al., 2009). Vanligtvis har en cykel 2-3 follikelvågor. Det förekommer även att vissa individer har fyra vågor. I dessa fall kan cykeln komma att uppgå till 22-23 dagar. Kvigors brunstcykel är ofta kortare med en normal längd på 20 dagar. Brunstcykeln avslutas med att progesteronets hämmande verkan på follikeltillväxt uteblir på grund av luteolysen. En dominant follikel kan då växa till. Från den växande follikeln utsöndras östradiol i ökande omfattning. Parallellt kommer då LH att frisättas för att till sist nå en topp. Ungefär 24 timmar efter denna topp sker ägglossningen från den dominanta follikeln, eller 10-15 timmar efter brunstens slut (ståbrunsten) som i sin tur varar 7 – 27 timmar. Med andra ord sammanfaller LH toppen ungefär med ståbrunstens början och ovulationen sker alltså *efter brunstens slut*. Den begränsande faktorn vid befruktningen är oocytens korta överlevnad efter ägglossning (4-8 timmar). Samtidigt krävs 3-6 timmar för spermies kapacitering. Sammantaget ger detta att bästa dräktighetsresultat nås om inseminationen sker strax innan eller några timmar efter brunstens slut (Larsson et al., 2009). De rutiner man brukar tillämpa är att djur som visar brunst på eftermiddagen och inte gjort det tidigare, insemineras påföljande dags förmiddag och de djur vars brunst upptäcks på morgonen insemineras samma dags eftermiddag.

Brunst delas in i för-, hög- och efterbrunst. Totalt spänner förloppet över 4-5 dagar. Ur djurägarens synvinkel är det de typiska symtom som uppvisas i samband med högbrunsten som är allra viktigast att vara observant på, för att uppnå bästa dräktighetsresultat vid AI. Detta stadium, som alltså varar 7 – 27 timmar, kännetecknas av svullnad och rodnad av yttre blygd, oro och rastlöshet, en tunn och klar vaginalflytning samt hopp på andra djur och ståreflex vid andra djurs upphopp. Ståreflexen är den viktigaste signalen. Ett djur som står vid andras påhopp skall semineras. I efterbrunsten ses ibland en blodblandad flytning. Detta är speciellt vanligt förekommande hos kvigor. Det förekommer att AI lyckas även då denna setts men i regel är det för sent (René Båge pers. medd.). Däremot ger denna observation visshet om att djuret har brunstat och därmed fås en god indikation om tidpunkt för högbrunstens infallande i nästa brunstcykel.

Brunstsignalering påverkas negativt av hög mjölkproduktion och kan därmed göra att AI inte utförs vid rätt tillfälle. Då AI utförs vid fel tidpunkt, ofta för långt efter ägglossning, blir resultatet en utebliven befruktning (Båge et al., 2002). Dessutom kan djuret drabbas av endometrit i och med att den gynsamma påverkan av östrogener på endometriet minskar och

livmodern då blir mer benägen att inflammeras. Som redan påpekats är dålig brunstsignalering särskilt vanligt förekommande hos förstakalvare. Denna kategori visar ofta svaga och korta brunster eller t o m total avsaknad av brunstsymptom. Utöver de generella problemen som hänger ihop med metabolisk stress (NEB) förklaras detta av att dessa djur står lägst i rang bland dem som mjölkar (Lucy, 2003, Reksen et al., 2002, Roche et al., 2000).

Nya driftsformer såsom robotmjölkning, ökning i besättningsstorlek och bristande kapacitet till passning gör det svårt att ha den goda bevakning av brunster som krävs. Som komplement till djurögat och traditionella brunstrundor tas diverse tekniska hjälpmedel till hjälp. Aktivitetsmätare finns i olika utföranden där den enklaste, podometern, mäter antal steg. En uppföljare till aktivitetsmätare och ett modernare system levereras av 'Heatime™' (www.heatime.dk). Den mäter ett enskilt djurs alla rörelser och relaterar dem till djurets normala nivå. En annan metod som används är att mäta hormonet progesteron i cirkulerande blod eller mjölk. Vanligast är att mjölkprover skickas till laboratoriet för analys som uppföljning i det enskilda fallet (t ex en misstänkt cystako). För en mer regelbunden användning, vid exempelvis dräktighetskontroll, blir det omständigt och kostsamt att behöva skicka proverna. För en mer systematisk användning krävs troligen att mätningen kan ske "on-farm".

"On-farm" mätning av progesteron (P_4)

Ett exempel på ett avancerat system för mätning av progesteron on-farm är den danska Herd Navigator® (www.herdnavigator.com) där dagliga mjölkprover tagna i samband med mjölkning gör det möjligt att få en individprofil för varje djur avseende några nyckelparametrar. Förutom mätning av progesteronhalt (P_4) fås data för celltal (LDH), energibalans (BHB) och proteinbalans (urea). Liknande instrument finns att tillgå i marknaden, t ex DeLaval's Herd Management ALPRO™ (www.delaval.com) m fl. Dessa system är dock kostbara och lämpar sig därför bäst för stora besättningar.

Det finns även enklare instrument för "on-farm" mätning av P_4 avsedda för i huvudsak mindre besättningar. Dessa är utrustade med en manuell ELISA läsare för mätning av P_4 i blod (serum/plasma) och mjölk. Ett exempel på ett sådant instrument är "eProCheck®800" (Minitüb, Tiefenbach, Tyskland, www.minitube.de).

I mjölkbesättningar görs dräktighetsundersökning på dag 50 efter semin av de djur som inte visat brunst efter AI. Ett annat och indirekt sätt att göra dräktighetsdiagnostik är att mäta P_4 . Metoden kräver dock att förändringar i P_4 följs med flera provtagningar. I reproduktionssammanhang används P_4 -mätningar främst till att;

- fastställa tidpunkt för östrus (låg P_4) och därmed rätt tidpunkt för AI,
- att göra tidig dräktighetsdiagnostik i de fall djuren inte visar brunst 21-24 dygn efter AI,
- samt för uppföljning av ett enskilt djur rörande exempelvis cyklicitet.

Det återstår dock att undersöka om mätning av P_4 med dessa portabla, enklare ELISA mätare kan användas och i sådana fall på vilken typ av prov; mjölk, blodplasma eller blodserum. Mjölk anses enklast att samla men utesluter kvigorna. Både blodplasma och –serum kräver centrifugering men kan dock användas på alla djurkategorier. Vid serumsamling ökar risken för hemolys och dessutom tar det lite längre tid innan analys kan göras. Därmed är det motiverat att undersöka om instrumentet kan analysera de olika provslagen (plasma, serum

eller mjölk) med samma resultat samt om instrumentet är stabilt under analysdagen (intra-assay) och över tiden (inter-assay). I en intra-assay görs ett flertal mätningar i samma testcykel på ett och samma prov. Vid en inter-assay görs testet på samma prov men vid olika mättillfällen.

Nya reproduktionstekniker – kan P₄ mätningar "on-farm" vara ett bra hjälpmedel?

Embryotransfer (ET) är en av flera 'ARTs' ('Assisted Reproductive Technologies') som används för att öka antalet avkommor från ett enskilt moderdjur och därmed uppnå kortare generationsintervall och en snabbare spridning av det genetiska materialet på modersidan (Galli & Lazzari, 2008). I ett rutinmässigt ET-system hormonbehandlas de kvigor som används som givare och mottagare av embryon. Givardjuren behandlas för follikeltillväxt och superovulation (därmed kallas systemet för MOET d v s Multiple Ovulation and Embryo Transfer) medan mottagardjuren synkroniseras för brunst och, i möjligaste mån, fastställande av exakt tidpunkt för brunst. Härmed vill man uppnå att embryots ålder motsvarar mottagardjurens cykeldag. En asynkroni överstigande 24 timmar mellan embryots ålder och mottagardjurets cykeldag kan leda till att embryot inte elongeras och därmed misslyckas i sin signalering till mottagardjuret vilket leder till embryots död (Pope, 1988). Inför inläggningen av embryo hos mottagardjuret görs det dessutom en klinisk undersökning för att bestämma djurets lämplighet som mottagare.

Målet med hormonbehandling (FSH och LH) av givardjuret är att få så många folliklar som möjligt att växa till den tidpunkt då ovulationerna induceras med prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) och som gör det möjligt att befrukta flera oocyter med två AI under samma dag, två dagar efter PGF_{2α}. Det genomsnittliga antalet embryon som spolats ut livmodern Sju dagar senare uppgår hos såväl kor som kvigor till 4,2 embryon (Larsson et al., 2009). Fler embryon erhålls från kor än kvigor. Variationen är dock stor. Anledningen till detta anses hänga samman med var i follikelfasen som behandling med FSH och LH sker. I mesta möjliga mån vill man att behandlingen sätts in tidigt i en ny follikelvågs början. Då utveckling redan skett mot en dominerande follikel kommer FSH att påskynda denna och därmed undertrycks utvecklingen av ytterligare follikeltillväxt. I praktiken är detta svårt att styra men man har i försök testat att ge östradiol på dag 4 i brunstcykeln parallellt med att vaginal progesteronpump satts in från denna dag till att PGF_{2α} ges (i ett sk modifierat behandlingsschema) (Larsson et al., 2009). Syftet är att avbryta den första follikelvågen för att därmed bättre kunna tajma insättandet av FSH i förhållande till kommande follikelvåg. Resultaten med ett sådant schema har varit lovande.

Embryonas utvecklingsstadium och kvalitet bedöms vanligtvis i mikroskop efter spolning. Indelning i fyra olika kvalitetsgrupper görs efter fastställda normer, där q1 är den bästa kvaliteten och q4 den sämsta (Stringfellow et al., 1998). Faktorer som påverkar kvalitetsbedömningen är cellfärg, form, cellmassans utseende, förekomst av eventuella vakuoler samt döda eller degenererade celler. Vidare klassificeras embryona beroende på antal celldelningar, m a o utvecklingsstadium, där de bäst utvecklade embryona benämns S7 och de minst utvecklade S1. Vid S4 går gränsen för kompakt morula (ca 150 – 200 celler). Om ägget är kläckt finns dessutom beteckningarna S8 och 9. Högsta kvalitet (q1) och utvecklingsstadium S4 t o m 7 krävs för frysning (Johanna Geust pers. medd., www.IETS.org). För färsk inläggning krävs, på samma sätt som vid frysning, en kompakt morula och utöver q1 kan även q2 och 3 användas.

I Sverige tillämpas embryoöverföring som reproduktionsteknik i liten skala (c:a 2000 ET). Exempelvis samlas vid Nötcenter Viken totalt 1 200 – 1 800 embryon årligen. På senare tid har dock takten dämpats - idag spolas ca 400 djur per år istället för som tidigare drygt 1 000 (Johanna Geust pers. medd.). Som jämförelse kan nämnas att det i Europa under år 2006 gjordes 16995 spolningar som totalt gav upphov till 96581 överföringsbara embryon (www.IETS.org). Upp till 85287 iläggningar gjordes (varav 36000 färska och ca 49000 frys-tinade embryon). Europa står för c:a 13% av världens ET's, som år 2006 uppgick till ET av över 600000 *in vivo* producerade- och mer än 265000 *in vitro* producerade embryon. Nästan hälften av dessa ET's görs i Sydamerika (över 48%).

Vid MOET har man sett förekomster av lägre dräktighetsprocent bland mottagardjur samt reproduktionsstörningar i form av t ex högre benägenhet att utveckla cystor (givardjur) (Larsson et al., 2009). Varför dessa patologier etableras vid MOET är fortfarande okänt. Det hänger troligen samman med de hormonbehandlingar som görs inför superovuleringen samt även att otillräcklig preparering med progesteron av ägglodare och livmoderepitel kan leda till att embryokvalitén försämras. I Linares et al. studie (1982) visades att kvigor som hade lägre eller ojämnt cirkulerande nivåer av progesteron under de första sju dagarna efter semin hade sämre embryonkvalitet. På mottagarsidan i sin tur kan då djuren vara 'ur fas' i förhållande till embryoöverföringen och därmed, som tidigare nämnts, fås inte ett korrekt gensvar för embryolongeringen. Det senare är centralt för att embryot skall kunna signalera sin närvaro till modern (den s k Maternal Recognition of Pregnancy). Därför är det av intresse att relatera embryokvalité (dess morfologi) till P₄ nivåer vid embryospolning samt P₄ nivåer hos mottagardjur vid inläggningen och dräktighetsutfallet.

Studiens syfte

Frågan man kan ställa sig är om användning av portabla ELISA mätare, t ex eProCheck®800, kan vara till gagn för att bedöma om (a) insemination skett vid rätt tillfälle (d v s lågt P₄ vid brunst), (b) om dräktighet kan förutses m h a värden för dag 0 och dag 20 efter utförd semin och (c) om utebliven/eller bekräftad dräktighet kan konstateras på dag 20 med ledning av de värden som föreligger då och de som förelåg vid dag 0 och dag 7 så att man vet om en ny brunst skall förväntas eller ej för att därmed kunna anpassa behovet av en intensivare manuell brunstpassning.

Denna studie syftade till att testa användningen av ett sådant instrument hos kvigor och första kalvare med hög mjölkavkastningspotential inom en och samma besättning (Nötcenter Viken) för att bedöma utfallet av konventionell utförda AIs och MOET. Studien avsåg att dels:

- 1) validera detta instruments tillförlitlighet (via intra- och inter-assays samt testning av olika prov; blodplasma, serum eller mjölk tagna vid samma tidpunkt)
- dels,
- 2) undersöka dess tillämpbarhet för att styra och bedöma
 - a. konventionell reproduktion (AI) och
 - b. embryokvalité och rätt tidpunkt för embryotransfer hos mottagardjur

Studien ämnade besvara följande frågor:

- finns det skillnader i P₄ nivåer mellan mjölk, serum eller plasma taget från samma djur vid samma tillfälle?
- i vilken utsträckning återspeglas lågt progesteron (P₄) vid dag 0 i dräktighet?

- är lågt P₄ vid dag 0 i kombination med högt vid dag 20 liktydigt med dräktighet?
- är ett högt P₄ värde vid dag 20 liktydigt med dräktighet, sensitivitet, och i hur många fall är P₄ serum hög utan att dräktighet ägt rum, specificitet?
- betyder ett lågt P₄ värde dag 20 eller lägre värde dag 20 än dag 7 att inseminationen inte resulterat i dräktighet?
- finns det någon samband mellan embryokvalité och P₄ nivåer hos givardjur vid insemination? (d v s återspeglas låga P₄ värden i högre andel embryon med god morfologi och färre med dålig?)
- finns det någon samband mellan P₄ värden vid brunstsynkroniseringen och vid embryoöverföring och dräktighet hos mottagardjur?

Material & metoder

Nötcenter Viken

Nötcenter Viken (Viken fortsättningsvis) är beläget utanför Falköping och ägs till 2/3 av Lantmännen och 1/3 av Viking Genetics. Viken drivs i forskningssyfte med ett omfattande avelsarbete som inkluderar användning av moderna reproduktionstekniker med t ex embryosamling och MOET. Likaså pågår foderförsök i stor skala (www.notcenterviken.se).

För att hitta moderdjur med bästa möjliga lämplighet som avelsdjur testas och tävlar ca 200 moderdjur mot varandra samtidigt. De består till hälften av raserna SLB och SRB . De mest lämpade djuren väljs ut och används som tjurmödrar, till rekrytering av nya testdjur samt som elitdonatorer av embryon.

Viken jobbar med nätverksbesättningar ute i landet. Dessa får tillgång till embryon av elitkvigor till rabatterat pris. I gengäld har Viking Genetics förköpsrätt till tjurkalvarna och Viken till kvigkalvarna födda ute på gårdarna.

Rekrytering av kvigor sker dels internt (ca 35 %) och dels genom inköp från gårdar runt om i Sverige. De inköpta djuren kommer till Viken vid 10 månaders ålder efter noggrann kontroll av avelsegenskaper och DNA tester för påvisande av eventuella genetiska defekter. Från och med 14 månaders ålder spolats dessa djur för embryon, en eller maximalt två gånger. Därefter insemineras de för egen dräktighet. För de djur som stannar kvar på Viken sker en ny individprovning efter den första laktationen. De bästa djuren, sk elitkor, spolats på nytt efter andra laktationen. Övriga djur kan komma att ingå i Lantmännens foderförsök. Efter avslutad andra laktation har uppfödaren återköpsrätt av sitt djur.

Djurhållning och drift

Alla djur på Viken går i lösdrift med undantag för ET djuren, som temporärt vistas uppbundna i ett separat stall, i avvaktan på spolning av givardjur respektive inläggning av mottagardjur. Mjölkning sker manuellt i ett roterande system tre gånger per dygn (0500, 1300 och 2000). Djuren har inte tillgång till rasthagar men går däremot på bete under sommaren. Viken anställer ca 20 heltider. Tre av de anställda är utbildade seminörer. Därutöver anställer gården en veterinär. Efter att kvigorna spolats semineras de. Därefter flyttas de till den kalla lösdriften med de andra kvigorna. Frivillig väntetid efter kalvning är 50 dagar.

Studiens upplägg och genomförande

Denna studie hade två olika delar.

I delstudie 1 var syftet att validera eProCheck®800 som mätinstrument för progesteron (P₄) 'on-farm'. Valideringen inkluderade upprepad mätning av samma prover –intra- och inter-assays (d v s under samma dag och med ett visst antal dagars mellanrum) och jämförelse av blodplasma, blodserum och även mjölk (gäller förstakalvare) på prover tagna på samma djur vid samma tillfälle.

I delstudie 2 har man tittat på tillämpningen av instrumentet på djur, för det första, inom ramen för den konventionella AI verksamheten och för det andra på givar- och mottagardjur av embryon (MOET).

Tillstånd att utföra studien är beviljat av Göteborgs djuretiska nämnd (diarienummer 123-2008).

AI djur

Provtagning

Provtagningen gjordes från mitten av mars tom slutet av maj 2009. Resultat från den sista dräktighetsundersökningen vid dag 50 förelåg i mitten av juli. Brunst kontrolleras dagligen genom att djur som gett utslag på aktivitetsmätningen (ALPRO DeLaval) kontrolleras extra noga vid brunstrundan. Därefter sammanfattas intrycken från brunstrundan med resultaten från aktivitetsmätningen i brunstintensitet och varje djur gavs en poäng i en 8-gradig skala i enlighet med Sveas brunstindex; 1) mycket svag, 2) svag, 3) tydlig, 4) stark, 5) mycket tydlig, 6) tveksam, 7) blodflytning förenligt med metöstrus, 8) ej i östrus. På denna basis fattades beslut om vilka djur som var aktuella för insemination.

Bland de djur som inseminerats kom de som var endera kvigor eller förstakalvare (fortsättningsvis benämns förstakalvare K1) under provtagningsperioden att ingå i försöksgruppen. Totalt uppgick antalet djur till 96 varav kompletta mätresultat föreligger för 91 av dem. Dag för insemination benämndes dag 0 (skall motsvara dag för högbrunst enligt de metoder som tillämpas på Viken). Intravenös blodprovstagning gjordes av dessa djur via svansvenen (v. coccygeae), ett för serum (serumrör) och ett för plasma (heparin- eller EDTA rör). För K1 togs även mjölkprover. Blodserum och -plasma sögs ut, flyttades till rena plaströr och frystes i -20°C. Ingen fastställd tidpunkt användes för provtagningen men som regel skedde den mellan den första och andra mjölkningen, vanligen vid 11-tiden på förmiddagen. Denna procedur upprepades sedan för varje påbörjat djur på dag 7 och dag 20 vid ungefär samma tid på dygnet.

Proverna analyserades för koncentrationen av progesteron (P₄) m h a eProCheck®800 (Minitüb, Tiefenbach, Tyskland) som är en ELISA test läsare (se avsnittet 'mätning av progesteron i eProCheck®800'). Emedan plasma eller serum proverna analyserades efter upptining eller som färska prov analyserades mjölkproverna alltid färska (se även *hantering av prover*).

På dag 50 gjordes dräktighetsundersökning av en extern erfaren djurtekniker av de djur som inte visat brunst.

Försöksgruppen

På Viken finns ca 1 000 djur. Kvigorna hålls separat i en för ändamålet nybyggd kall lösdrift. Korna är i huvudsak uppdelade i två grupper, en för SLB och en för SRB ras, med vardera ca 200 djur. Kor i alla laktationsstadier ingår i dessa grupper.

Totalt ingick 91 djur i studien, varav 51 (56%) var kvigor och 40 (44%) var K1. Fyrtiotvå (42) av djuren var av rasen SRB (26 kvigor, 16 K1) och övriga 49 av rasen SLB (25 kvigor, 24 K1), (se tabell 1).

Tabell 1 – försöksgruppen fördelat på djurkategori (kvigor och K1) samt ras

Ras / kvigor, K1	SLB	SRB	Totalt
Kvigor	25	26	51
K1	24	16	40
Totalt	49	42	91

SLB: Svensk lågländras, SRB: Svensk rödras, K1: första kalvare

Tabell 1 omfattar de djur där kompletta mätresultat förelåg (P_4 i serum, plasma för både kvigor och K1 samt även mjölk för K1 för alla mättillfällen – dag 0, 7 och 20). Härtill tillkom mätresultat för ytterligare 5 djur med ofullständiga mätserier men där de resultat som fanns kunnat användas i parprovsanalyserna.

Av de 91 djur som ingick i studien blev 48 dräktiga. Bland kvigorna blev resultatet 27 dräktigheter och i K1-gruppen var det 21. För både grupperna resulterade inseminationerna i drygt 50 % dräktigheter.

MOET djur

Hormonbehandlingar och rutiner

Aktuella givar- och mottagardjur stallades upp i det sk ET – stallet där de fick stå bundna tills procedurerna avslutades. Behandling av givardjuren, både kor och kvigor, påbörjades 8-12 dagar efter högbrunst och pågick i fem dagar. FSH och LH (Pluset®) gavs två gånger dagligen under fyra dagar. Den fjärde dagen gavs även $PGF_{2\alpha}$ analog (Estrumat®) och avslutningsvis på dag fem gavs GnRH (Receptal®). Mottagardjuren brunstsynchroniserades med $PGF_{2\alpha}$ analog vid två tillfällen med 11 dagars mellanrum.

Vid behandlingens slut kontrollerades djuren för brunsttecken och gavs en brunstindexpoäng i likhet med övriga djur inför insemination (se *provtagning on farm av AI – djur*).

För givardjuren var de typiska tecken såsom svullnad, slemhinnans färg, flytningar och rastlöshet man tittade efter. Om djuret bedömdes i brunst inseminerades det vid två tillfällen samma dag, en gång på morgonen och en gång på eftermiddagen. Sju dagar senare spolades djuren för embryosamling. Endast embryon av högsta kvalitet (q1, s4-7) sparades. Dessa frystes för i huvudsak försäljning men inläggning av egna djur förekom också.

Aktuella djur för inläggning var alla kvigor som inte kvalat in bland elitkvigor. Mottagardjuren synkroniserades och vid behandlingens slut ansågs brunsten infalla. En brunstbedömning gjordes för att om möjligt avgöra när högbrunsten infallit. För kvigor anses det extra värdefullt och gångbart att vara observant på blodiga flytningar (brunstindex 7). I de fall man hade denna observation skedde inläggningen av embryo sex dagar senare. I andra fall skedde inläggningen i regel sju dagar senare (oftast brunstindex 6). Före inläggningen hade djuren undersökts trans-rektalt för framförallt fastställande av gulkroppsstatus och – placering men även med avseende på kliniska fynd som har betydelse för inläggningen. Sådana fynd kan t ex vara förekomst av cystor och livmoderinflammation. Därefter fattas beslut om vilka djur som kan vara lämpliga för inläggning. För det mesta var det inköpta embryon som användes.

Provtagning av givar- och mottagardjur

Givardjuren (n=11) samlades på blod via svansvenen först på inseminationsdagen (dag 0), i regel före den första inseminationen, och sedan på spolningsdagen innan spolning (dag 7). P₄ koncentrationen mättes sedan i plasma antingen färskt eller efter upptining

Mottagardjuren (n= 13) samlades på blod två dagar efter avslutat behandlingsschema då detta anses sammanfalla med högbrunsten (dag 0) och sedan i samband med inläggningen (dag 7). Dag 7 har i verkligheten infallit 8-11 dagar efter dag 0. På samma sätt som för givardjuren har plasma koncentrationen för P₄ analyserats färskt eller efter upptining. Dag 7 fastställdes efter brunstobservation där blodiga flytningar (metöstral blodning) givit den säkraste uppgiften om tidpunkt för högbrunst.

Hantering av prover

Proverna togs i stall för respektive djur. För blodprover användes Venosafe vakuumbor (Vacutainer, Mi, USA) och för mjölkprover vanligt samlingsrör. Innan samling av mjölk mjölkades kon ur på några strålar. Rören (serum, plasma och mjölk) märktes med datum, tidpunkt, individnummer samt stallplats. Till serum användes serumrör (Venosafe™ Clot Activator). Serumrör fick stå i kylskåp (+4°C) i ca 30 min, d v s den tid som rekommenderas för att aktivering av koagulationsfaktorer skall ske, varpå de centrifugerades i 10 min på 3 000 rpm. För plasmaprover användes K2-EDTA- eller heparinrör. Även dessa centrifugerades i 10 min på 3 000 rpm. Efter centrifugering skördades serum respektive plasman via pipettering och flyttades till ett rent plaströr (samma slags rör som användes till mjölkproverna) som identifierades, stängdes och lagrades i -20°C. Analysen med eProCheck®800 skedde endera omedelbart eller efter upptining i rumstemperatur.

Mjölkproverna analyserades i möjligaste mån omgående efter samling. Då detta ej var möjligt förvarades provet i kylskåp i maximalt fyra timmar. Innan körning i eProCheck®800 skakades röret kraftigt under ca 10 sekunder.

Mätning av progesteron i eProCheck®800

Mätning av progesteron koncentrationen (P_4) utfördes m h a eProCheck®800 som är ett nyligen framtaget instrument för fältbruk för läsning / mätning av P_4 i blod och mjölk av firman Minitüb GmbH (Tiefenbach, Tyskland). Tekniken baseras på ett ELISA test. Provmaterial tillsätts brunnar för analys i instrumentet. Brunnarna levereras vakuumsförpackade i styckvisa 'plastrack' om 12 rader à 8 brunnar. Då en testserie ska köras bryts en rad av från racket. Man har då åtta brunnar som sitter ihop till vilka en viss mängd serum, plasma eller mjölk kan tillsättas. Sju prover kan köras samtidigt, ett prov är kontroll. En testserie tar ca 20 min att köra i instrumentet. Varje brunn innehåller en reagens som vid tillsats av provmängd ger ett färgomslag som varierar i styrka beroende på mängden progesterone i det tillsatta provet. För blodplasma och -serum pipetterades vardera 15 μ L och för mjölk 20 μ L till respektive brunn i raden som därefter matades in i instrumentet. Individnummer matas in för vardera prov (1-7). Efter avslutad test ges nivån av P_4 i en sexgradig skala för vart och ett av proverna. I displayen ses en till sex kuber på raden för respektive provnummer (individnummer) där 1-2 bedöms som låg, 3-4 medel och 5-6 som hög nivå. Dessa data sparas sedan i maskinens minne. 1-2 är förenligt med låga nivåer av P_4 (östrus) medan 5-6 är höga (lutealfas eller dräktighet). Enligt tillverkaren motsvarar nivåerna 1-6 följande koncentrationer P_4 (nM/L); **1:** 0-1,3, **2:** 1,4-3,0, **3:** 3,1-4,5, **4:** 4,6-7,5, **5:** 7,6-9,9, **6:** > 10.

Statistiska metoder

Data som berör djurens identitet såsom ålder, ras etc. har hämtats från Nötcenter Vikens databas 'Vikendata' och har inte analyserats statistiskt. Progesterondata redovisas kategoriskt (1-6) och analyserats m h a SAS programvara för Windows, version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Korrelationen mellan de parade blodplasma/serum alternativt mjölkproverna har beräknats med Spearmans rangkorrelation (korrelationen 'r' kan variera från -1 – (+)1 där värdet +1 uttrycker ett maximalt positivt samband och 0 att inget samband finns). Signifikanstester av de skattade korrelationerna avser skillnaden från 0. Därtill har överensstämmelse mellan parallellprover, grupperade enligt låg/medel/hög, analyserats med X^2 -test. Mätnoggrannheten i assay-proverna har beräknats med variationskoefficienten (CV), där $P < 0,05$ ansågs signifikant (= hög mätnoggrannhet).

Resultat

Delstudie 1: Validering av eProCheck®800

En direkt kontroll av eProCheck®800 tillförlitlighet av mätresultat gjordes på två sätt;

1. dels genom att prov från respektive serum, plasma och mjölk från samma djur upprepats i samma testserie på både färsk (n= 3) och frysta prov (n=4) under en och samma dag, s k 'intra-assay' (n=7),
2. dels genom att prov från ett och samma djur, ett för vardera serum och plasma, analyseras med en veckas mellanrum under totalt sex veckor, s k 'inter-assay'.

Likaså testades om olika prov (blodplasma, -serum och mjölk) kunde testas för P₄ nivå med samma tillförlitlighet, genom att jämföra P₄ nivåer i blodplasma och -serum och mjölk tagna från samma djur vid samma provtagningstillfället, här benämnt ”parprov”.

Direkt validering – ‘assays’

Intra-assay

Tabell 2 – intra-assay av färska prov för respektive serum (dag 0), plasma (dag 20) och mjölk (dag 7)

Serie	A- dag 0	B – dag20	C – dag 7
Provslag (volym µL)	Serum (15µL)	Plasma (15µL)	Mjölk (20µL)
Observation / låg- mellan-hög (1-6)			
1	Låg (1)	Medel (4)	Hög (5)
2	Låg (1)	Medel (4)	Hög (5)
3	Låg (1)	Medel (4)	Hög (5)
4	Låg (1)	Hög (5)	Hög (5)
5	Låg (1)	Medel (4)	Hög (6)
6		Medel (3)	Hög (6)
7		Medel (4)	Hög (6)
8		Medel (4)	
9		Medel (3)	
10		Medel (4)	
CV/(CV numerisk)	< 5% (< 5%)	15% (15%)	< 5% (10%)

Avsikten med en intra-assay är att fastställa om instrumentet kan mäta samma prov och ge samma resultat varje gång när proverna körs vid ett och samma tillfälle (under analysdagen exempelvis). I tabell 2 visas resultaten då samma prov på färskt provmaterial (blodplasma, blodserum eller mjölk) körts vid samma tillfälle. eProCheck®800 gav nivån P₄ i en sexgradig skala (1-6) där 1-2 klassas som låg, 3-4 medium och 5-6 hög. Variationskoefficienten (CV) har beräknats för låg, medel och hög samt inom parentes i tabellen för det numeriska värdet 1-6. Som ses i tabellen finns det bara ett avvikande värde mätt i skalan ’låg, medel och hög’; av 10 observationer för plasma i serie B ger 9 observationer medel värde och en ett högt värde (obs. 4).

Tabell 3 – intra-assay av frysta prover på djur provtagna på dag 0 och 20 för respektive plasma och serum

Serie	D – dag 0	E – dag 0	F – dag 20	G – dag 20
Provslag (15 µL)	Plasma	Serum	Plasma	Serum
Observation / låg- mellan-hög (1-6)				
1	Hög (5)	Medel (4)	Hög (6)	Hög (6)
2	Hög (5)	Hög (5)	Hög (6)	Hög (6)
3	Hög (5)	Medel (4)	Hög (6)	Hög (6)
4	Hög (6)	Hög (5)	Hög (6)	Hög (6)
5	Hög (5)	Medel (4)	Hög (6)	Hög (6)
6	Hög (5)	Medel (4)	Hög (6)	Hög (6)
7	Medel (4)	Hög (5)	Hög (6)	Hög (6)
CV/(CV numerisk)	13,2% (11,5%)	22% (12,1%)	< 5% (< 5%)	< 5% (< 5%)

I tabell 3 ses P_4 värden på upptinade prover. Serierna D och E hade varit frysta i en månad och F och G i två. I likhet med färska prover är samstämmigheten god vid hög koncentration av P_4 men sämre då mätvärdena pendlar mellan medel och hög registrering. Detta gäller särskilt serie E. Medelvärde för den sistnämnda serien är 4,42. Värdet tycks m a o befinna sig på gränsen mellan medel och hög varför CV för det numeriska värdet skulle kunna vara mer tillämpligt för denna serie. Med detta synsätt sågs god överensstämmelse mellan de serier som analyserats för färska och frysta prover. Ett CV lägre än 0,05 är signifikant och motsvarar en hög mätnoggrannhet. Bästa mätnoggrannheten sågs i serier som endera var tydligt låga eller höga. För övriga serier varierar CV mellan 11,5 % och 15 % räknat på numeriskt värde 1-6. Man kan m a o konstatera att mätnoggrannheten är ungefär tre gånger högre för värden som endera var tydligt låga eller höga för P_4 .

Inter-assay

Avsikten med denna test är att se om instrumentet kan bedöma samma P_4 koncentration på ett och samma prov som analyseras med flera dagars intervall (och dessutom efter upprepad frysning och tining). Analyserna gjordes med en veckas intervall under en period av sex veckor. En kontroll för vardera blodplasma och -serum gjordes. För blodplasma var utgångsvärdet högt medan det var lågt för serum.

Tabell 4 – inter-assay d v s ett och samma prov som vid första tillfället analyserats färskt och därefter med en veckas mellanrum efter frysning och tining

Serie	H - dag 0	I - dag 0	J - dag 0 (utan observation 4)
Provslag (15 μ L)	Plasma	Serum	Serum
Observation / låg-mellan-hög (1-6)			
1	Hög (6)	Låg (1)	Låg (1)
2	Hög (6)	Låg (1)	Låg (1)
3	Hög (6)	Låg (2)	Låg (2)
4	Hög (6)	Medel (4)	
5	Hög (6)	Låg (2)	Låg (2)
6	Hög (6)	Låg (1)	Låg (1)
7	Hög (5)	Låg (1)	Låg (1)
CV/(CV numerisk)	< 5% (6,5%)	33,1% (65%)	< 5% (38,7%)

I serie I (serum) avviker observation 4 med att vara medelhög från en serie med annars enbart låga värden. CV blir då 33,1%. I serie J har CV värdet beräknats utan observation 4.

Som framgått från intra- och inter-assay testerna så var överensstämmelsen mellan samma prov på både färskt och fryst material till övervägande del god. I B och E fås ett sämre resultat som sätts i samband med ett antagande om mindre marginal då P_4 koncentrationen låg på gränsen mellan medel och hög. För serie I verkar det rimligt att anta att det avvikande värdet i observation 4 beror på ett tekniskt problem.

Sammantaget ger detta att då nivåerna låg till hög beaktas så har fem av de nio serier som körts ett $CV < 0,05$. I serier B, D och E är detta värde mellan 13,2 och 22 % och sammanfaller med numeriska värden som ligger på medel till högt värde (3 till 6). Serie I har

beräknats med och utan observation 4 då denna avviker med att vara medel i en serie med i övrigt låga värden.

Testning av P₄ nivåer på olika prov - parprover

Parprover I - jämförelse av progesteron (P₄) koncentration i serum och plasma

I tabell 5 ses en sammanställning på det underlag som finns för analys av parprover. Syftet med parproverna är att titta på överensstämmelse av den uppmätta halten P₄ i serum, plasma och mjölk på prover tagna på en viss individ vid samma tillfälle. Härmed fås ett indirekt mått på säkerheten i mätningarna med eProCheck®800 oavsett prov som testats. Andelen medel värden för plasma och serum är densamma (15%) medan andelen hög koncentration är 65% (182 prover, n=280) för serum och 60% för plasma (160, n=269). Följaktligen är andelen värden med låg P₄ ca 5 % högre för plasma.

Tabell 5 – antal P₄ analyser fördelat på serum, plasma och mjölk och utfall mätt som hög, medel och låg

Provtyp/nivå P ₄	Hög (%)	Medel (%)	Låg (%)	Total
plasma	160 (59,5%)	39 (14,5%)	70 (26%)	269
serum	182 (65%)	43 (15%)	55 (20%)	280
Mjölk	35 (35%)	23 (23%)	42 (42%)	100

I parproverna i tabell 6 har vi jämfört serum och plasma för prov tagna vid samma tillfälle på samma individ.

Tabell 6 – jämförelse av P₄ i serum och plasma för prov tagna på samma individ vid samma tillfälle

Serum/ Plasma	hög	medel	låg	Total	Serum=plasma(%)	sign. samband
Hög	152	24	3	179	152 (85%)	x ² -test: p≤0,001
Medel	5	11	25	41	11 (27%)	Spearman rang-
Låg	1	4	42	47	42 (89%)	korrelation:
Total				267	205 (77%)	r _s =+0,86; p≤0,001

Upp till 77 % av provresultaten är samstämmiga. Cirka 22 % avviker med ett steg medan 1% har en avvikelse som är två steg (hög-låg, låg-hög). Som väntat är det minst överensstämmelse bland medelvärdena. Detta bekräftar den bild som sågs i resultaten för intra-assay serier B och E.

Parprover II - jämförelse av P₄ i mjölk med plasma och serum

Som framgår av tabellerna 7 och 8 där respektive P₄ i serum och plasma jämförs med dem i mjölk vid provtagning av samma individ vid samma tillfälle så var den totala överensstämmelsen lägre (59 % respektive 65 %) än de 77 % som sågs vid serum och plasma jämförelsen (Spearman rangkorrelation, r_s, 0,69 respektive 0,77 jämfört med serum – plasma 0,86). För låga värden var resultaten jämförbara medan det var en lägre andel parprov med överensstämmande resultat vid de höga och en än mer spridd bild ses för medel värden. Signifikansen i de funna värdena var hög och ett tydligt positivt samband (Spearman

rangkorrelation) råder mellan de parade proverna; serum – plasma: +0,86, serum – mjölk: +0,69, plasma – mjölk: +0,77.

Tabell 7 – jämförelse av P₄ i serum och mjölk för prov tagna på samma individ vid samma tillfälle

Serum/ Mjölk	hög	medel	låg	Total	Serum=mjök(%)	sign. samband
Hög	37	18	8	63	37 (59%)	x ² -test: p≤0,001 Spearman rang-korrelation: r _s =+0,69; p≤0,001
Medel	0	1	12	13	1 (8%)	
Låg	0	4	22	26	22 (85%)	
Total				102	60 (59%)	

Tabell 8 – jämförelse av P₄ i plasma och mjölk för prov tagna på samma individ vid samma tillfälle

Serum/ Mjölk	hög	medel	låg	Total	Plasma=mjök(%)	sign. samband
Hög	32	18	7	57	32 (56%)	x ² -test: p≤0,001 Spearman rang-korrelation: r _s =+0,77; p≤0,001
Medel	2	5	5	12	5 (42%)	
Låg	1	3	30	34	30 (88%)	
Total				103	67 (65%)	

Vid dag 20 var samstämmigheten av parproverna för höga värden P₄ i serum – plasma jämförelsen betydligt högre än vid dag 7; 85 respektive 27 %. Parprov av mjölk med både plasma och serum har motsvarande överensstämmelse som de med serum och plasma på dag 20; för mjölk - plasma i 20 fall av 26 (77 %) och för mjölk - serum i 23 fall av 29 (79 %). Detsamma gällde dag 0. Det kan därför vara intressant att se hur det ser ut om man tar bort dag 7 (lutealfas i teorin). I tabell 9 redovisas överensstämmelse för de olika provpar för dag 20 och 0. Hög – hög för dag 0 förekom i begränsad utsträckning och redovisas därför inte.

Tabell 9 – överensstämmelse vid dag 20 respektive dag 0 för de olika parproverna (inom parentes anges det totala antalet observationer som finns för de parade proverna vid respektive nivå och provdag, exempelvis finns det 72 observationer vid dag 20 med hög serum; i 64 av dessa fall var nivån även hög i plasma)

Provkategori/ % lika provsvar (antal prov detta slag)	serum - plasma	mjölk - plasma	mjölk - serum
Hög - hög, dag 20	89% (72)	77% (26)	79% (29)
Låg – låg, dag 20	88% (8)	83% (6)	100% (4)
Låg – låg, dag 0	94% (35)	88% (25)	83% (18)

Vid denna jämförelse ses för serum – plasma en samstämmighet på ca 90 %. Detta ska jämföras med de 77 % som gällde för hela provmaterialet. Plasma/serum – mjölk då de vägs samman överensstämmer till dryga 80 % som kan jämföras med 59 och 65%, respektive. I båda fallen sågs alltså en förbättring i överensstämmelse med ca 15 %.

Avslutningsvis ska nämnas att av 280 serumprover hade 51 prover hemolys (18 %). Motsvarande tal för plasma var 30 prover av totalt 269 (11%). Totalt ger detta att 15 % av proverna hade hemolys. Hälften av proverna har varit frysta innan mätning av P₄ gjorts.

Delstudie 2: Tillämpning av eProCheck®800

Progesteronmätningar vid AI - brunstpassning och dräktighetskontroll

I försöksgruppen har Vikens personal gett brunstindexpoäng enligt följande: ca 10 % av djuren som inseminerats har fått bedömningen 2 och resterande endera 3 eller 4 med viss övervikt för 3. Inga större skillnader förelåg mellan de olika grupperna beträffande sambandet mellan ett visst brunstindexpoäng och dräktighetsutfall (se tabell 10). Det totala dräktighetsutfallet mätt med Vikens brunstindex var 48 av 91 djur, eller 53%.

Tabell 10 – Vikens brunstindexpoäng och dräktighetsresultat i den undersökta gruppen (inom parantes anges andel av total för respektive kategori)

Brunstindexpoäng / dräktigheter (andel i %)	Icke dräktiga	Dräktiga	Totalt
2	5 (55%)	4 (45%)	9
3	20 (44%)	25 (56%)	45
4	18 (49%)	19 (51%)	37
Totalt	43 (47%)	48 (53%)	91

I tabell 11 redovisas enbart kvigor. En lägre andel inseminationer har gjorts på djur med bedömningen 2 (6%). Högst andel dräktigheter sågs på de djur som fått bedömningen 4 (61 %) medan de som bedömts som treor har ett sämre genomsnitt (48 %) än totalen (55% för kvigor och 53 % för både K1 och kvigor).

Tabell 11 – Vikens brunstindexpoäng och dräktighetsresultatavseende kvigor i den undersökta gruppen (inom parantes anges andel av total för respektive kategori)

Brunstindexpoäng / dräktigheter (andel i %)	Icke dräktig	Dräktig	Totalt
2	1 (33%)	2 (67%)	3
3	13 (52%)	12 (48%)	25
4	9 (39%)	14 (61%)	23
Totalt	23 (45%)	28 (55%)	51

I tabell 12 och 13 sammanfattas sambanden mellan P_4 i serum och mjölk vid de olika mättillfällena, dag 0, 7 och 20, med konstaterad dräktighet vid dräktighetsundersökning dag 50. Frågan man försökte besvara var hur det skulle gått om endast resultaten från eProCheck®800 använts för att avgöra tidpunkt för insemination samt vidare om dräktighet (tabell 12) eller utebliven sådan (tabell 13) kunde bestämmas på ett tidigt skede m h a instrumentet snarare än att invänta dräktighetsundersökningen vid dag 50.

Lågt P_4 vid inseminationsdagen allena gav i 60 % av fallen indikation om att inseminationen skulle kunna bli lyckosam. I gruppen kvigor uppgick denna andel till hela 80 %. Hög P_4 vid dag 20 ger för serum en andel på 56 % medan den för mjölk (K1) utgör 38%. Ingen skillnad sågs här mellan kvigor och K1. Kombinationen av lågt P_4 dag 0 och högt värde dag 20 svarade mot ett dräktighetsresultat på c:a 50 %.

Tabell 12 – Indikatorer positiv dräktighetsdiagnostik; P₄ nivåer i serum och mjölk och dräktighetsresultat (inom parentes anges andel av total för respektive kategori)

Prog.nivå, tidpunkt (serum el mjölk) /dräktighetsantal/totalt dräktiga kategori (%)	Kor + Kvigor	Kor	Kvigor
Låg dag 0 (serum)	24/41 (59%)	8/21 (38%)	16/20 (80%)
Låg dag 0 (mjölk)		16/26 (62%)	
Låg dag 0–Hög dag 20 (serum)	16/33 (48%)	6/15 (40%)	10/18 (56%)
Låg dag 0–Hög dag 20 (mjölk)		8/13 (62%)	
Hög dag 20 (serum)	40/72 (56%)	17/30 (57%)	23/42 (55%)
Hög dag 20 (mjölk)		8/21 (38%)	

Ett lågt värde vid dag 20, liksom lägre vid dag 20 än vid dag 7, borde vara en säker indikation på att inseminationen misslyckats. Som kan ses av resultaten i tabell 13 fungerar det dåligt som kontrollmetod. Endast i 50 % av fallen för båda metoderna stämde det att djuret inte var dräktigt (undantaget låg P₄ mjölk på dag 20).

Tabell 13 – Indikatorer negativ dräktighetsdiagnostik; P₄ nivåer i serum och mjölk och dräktighetsresultat (inom parentes anges andel av total för respektive kategori)

Prog.nivå, tidpunkt (serum el mjölk) /dräktighetsantal/totalt dräktiga kategori (%)	Kor + kvigor	Kor	Kvigor
Låg dag 20 (serum)	4/8 (50%)	3/6 (50%)	1/2 (50%)
Låg dag 20 (mjölk)		4/10 (40%)	
Dag 20 < dag 7 (serum)	7/14 (50%)	3/6 (50%)	4/8 (50%)
Dag 20 < dag 7 (mjölk)		4/8 (50%)	

På motsvarande sätt kan det vara intressant att titta på sambandet mellan P₄ nivån vid dag 20 efter semin och antal djur som diagnostiserades dräktiga vid dag 50 (transrektal palpation/UL) (se tabell 13).

Tabell 14 – samband mellan P₄ nivå vid dag 20 och dräktighet (värden avser serum prov)

P ₄ vid dag 20	Dräktiga	Icke dräktiga	total
Hög	40	32	72
Ej hög	8	11	19
total	48	43	91

Resultaten visar att majoriteten av djuren (40/72) som hade en hög P₄ värde vid dag 20 bekräftades dräktiga, men även att djur med lägre P₄ visade sig vara dräktiga (8/19).

MOET – progesteronmätningar av givar- och mottagardjur

Givardjur

Av de 15 djur som varit aktuella för studien kom två att utgå vid inseminering och två i samband med insemination. Totalt gör det att underlaget var 11 djur. I samtliga fall har spolning av givardjuren skett sju dagar efter insemination.

I det undersökta materialet har 8 spolningar resulterat i embryon av högsta kvalité, två med embryon endast av lägsta kvalité och en i inga embryon alls. Det genomsnittliga antalet q1 embryon var 3,4 (10 som mest och 3 som minst). Inga djur producerade q2 embryon. Åtta (8)

av spolningarna har gett q4 embryon till ett genomsnittligt antal av 3,6 st. (17 som mest och 1 som lägst). Samtliga q1 embryon befann sig i utvecklingsstadium S4 -6.

Vid P₄ mätning dag 7 hade som väntat alla 11 djur höga koncentrationer av P₄ i blodplasma. I tabell 14 redovisas de fåtaliga djuren i tre grupper med utgångspunkt från om P₄ var låg (n=4), medel (n=1) eller hög (n=6) vid dag 0. Något överraskande var gruppen med höga P₄ dag 0 den största gruppen och som framgår av tabellen utan påtagligt negativa konsekvenser för spolningsresultatet.

Tabell 15 – jämförelse spolningsresultat mellan djur med låg (mellan) och hög P₄ koncentration dag 0 (samtliga djur har hög P₄ koncentration dag 7)

Grupp P ₄ dag 0 –P ₄ dag 7 / djurantal och embryon q1 och q4	Antal	'q1-djur'/antal embryon/genomsnitt	'q4-djur'/antal embryon/genomsnitt
A. Låg	4	3 / 17 / 4,25	3 / 5 / 1,25
B. Mellan	1	0	0
C. Hög	6	5 / 20 / 3,33	6 / 35 / 5,8

För djur med låg koncentration P₄ dag 0 var det genomsnittliga antalet embryon per spolning knappt ett embryo högre än de med hög koncentration. Grupp A hade dock ett djur med hela 10 st. q1 och ett som inte gav några q1 alls. En signifikant skillnad sågs dock vad gäller antalet q4 per individ där grupp A har 1,25 och grupp C 5,8 st. Underlaget är begränsat varför resultaten måste ses med försiktighet.

Mottagardjur

I det begränsade material man hade tillgång till ingick 28 djur. Femton (15) av dessa var inte aktuella för insemination efter undersökning inför inläggning. Orsakerna var för fem av djuren att de hade cystor, för tre att gulkroppen inte utvecklats, ett djur hade pyometra och ytterligare ett kom i brunst igen. För övriga fem saknades uppgift (kunde t ex bero på att cervix har bedömts som alltför stängd).

Tretton djur användes för inläggning. Ett av djuren blev dräktigt men kastade efter 10 veckor. Övriga 12 blev inte dräktiga. På dag 7 är samtliga P₄ koncentrationer som samlats (11 av 13 djur) på hög nivå. Sambandet mellan P₄ koncentrationer på dag 0 (n=27) och inläggning förhåller sig enligt tabell 15.

Tabell 16 – Samband inlagda djur och P₄ koncentration dag 0 (samtliga inlagda med känd P₄ koncentration vid dag 7 = hög)

P ₄ dag 0 / Djur (27 st)	Antal djur	Inlagda (%)	Orsak ej inlagd
Låg	10	5 (50%)	Cysta – 2st Ej CL – 3 st
Mellan	7	2 (29%)	Cysta – 2 st Ny brunst – 1 st
Hög	10	5 (50%)	Orsak okänd – 2 st Cysta – 1 st Pyo – 1 st Orsak okänd – 3st

Diskussion

Delstudie 1: validering av eProCheck®800

De beräkningar av variationskoefficient (CV), eller normaliserad standardavvikelse, som gjorts för att göra testserier A till J i tabeller 2 till 4 jämförbara visar att mätnoggrannheten var hög (d v s $CV < 0,05$) vid låga värden (serie A) liksom vid höga värden (C, D, F, G och H). I serier B och E, med större inslag av medel värden, ses en större deviation från medelvärdet. Det föreligger m a o en större risk för avvikelser då det uppmätta värdet pendlar mellan att vara medel och högt. Som användare är det förmodligen bättre att veta att större säkerhet föreligger för yttervärdena (högt och lågt) då dessa är vägledande för slutsatser om brunst, dräktighet eller lutealfas. En ytterligare slutsats som kan dras är att frysning/uptining inte ger upphov till sämre mätnoggrannhet för intra-assay proverna än för färskt körda prover.

I serie I är sex värden låga och ett värde är medel. Med tanke på de övriga resultat som föreligger för höga och låga värden verkar det rimligt att anta att avvikelsen beror på ett tekniskt problem. Därför har CV beräknats utan detta värde i testserie J. Man kan konstatera att rensat för detta värde har, i likhet med serien med det höga utgångsvärdet i serie H, upprepad frysning och förfluten tid inte haft någon signifikant påverkan på låga koncentrationer av P_4 mätt över 6 veckor.

Som referens kan nämnas att det i en studie av Duchens et al. (1994) användes ett validerat immunoassay instrument för mätning av hormonnivåer hos kvigor vid östrus och de där uppmätta CV nivåerna för intra-assay tester varierat från 3,4 till 10,7 % och motsvarande för inter-assay var 7,8 till 13,5 %. I vår studie har vi uppmätt $CV < 5\%$ för fem av sju intra-assay tester och för båda inter-assay testerna (med antagande om tekniskt fel för ett kraftigt avvikande värde). Övriga två CV för intra-assay har varierat mellan 11 och 15 %. Slutsatsen blir att mätnoggrannheten generellt sett är hög och att detta i synnerhet gäller vid låga och höga P_4 . Mätnoggrannheten är ca tre gånger högre för serier med höga och låga värden än serier med värden kring medel. Vidare kan sägas att serum- och plasmaprover kan frysas utan att mätnoggrannheten påverkas vid läsning i denna ELISA mätare.

I parproverna har man tittat på överensstämmelse mellan mätvärdena (låg, mellan och hög) i serum-, plasma- respektive mjölkproverna för alla tillgängliga data;

- serum – plasma: 77% (n = 205, $r_s = 0,86$)
- serum – mjölk: 59 % (n = 60, $r_s = 0,69$)
- plasma – mjölk: 65 % (n = 67, $r_s = 0,77$)

Sett till hela provmaterialet är skillnaderna större då man jämför mjölk med blodserum respektive blodplasma än vad som är fallet vid parprov av blodserum och blodplasma. Som jämförelse kan nämnas att Schams och Karg (1986) fann att överensstämmelse mellan P_4 nivåerna i plasma och mjölk var god. Inkonsekvens vid provtagningstid samt en större känslighet i mjölken för variationer i P_4 gör det dock svårt att dra några slutsatser beträffande säkerheten i dessa skillnader samt för mätnoggrannheten av eProCheck®800 i största allmänhet. Progesteron är lipofilt och då mjölkfettet klumpar ihop i röret är det risk att man tar sitt prov för ELISA körningen ur den fett-fattiga delen (Nachreiner et al., 1992) Mellan mjölkningarna kan den uppmätta halten P_4 variera stort. Högst halt P_4 fås direkt efter mjölkning.

Värdena ovan är beräknade på alla P₄ nivåer. Bryter man ut de kritiska mättillfällena, dag 20 och dag 0, blir dock skillnaderna mindre påtagliga och en större överensstämmelse mellan de olika parproven kan konstateras; för serum – plasma är det 89 % överensstämmelse av höga värden vid dag 20 och 94% vid låga värden dag 0, för plasma/ serum – mjölk är motsvarande tal knappa 80 % respektive 85 %. Plasma innehåller fibrinogen till skillnad från serum. Halveringstiden för progesteron i blodet är ca 6 timmar (Oltner & Edqvist, 1982). Serumproverna har stått i 30 minuter innan centrifugering. Huruvida dessa skillnader haft påverkan på mätresultaten för serum och plasma är oklart. Om den längre väntetiden för serum haft betydelse så hade man kunnat förvänta sig att andelen prov med höga och medel värden skulle vara lägre för serum än plasma. Detta är dock inte fallet, det omvända gäller istället.

En annan riskfaktor vid mätning av P₄ är eventuell förekomst av hemolys. I studien, där vi hade hemolys i upp till 15% av proverna, har vi inte tagit hänsyn till en eventuell påverkan på P₄ p g a hemolys. I en studie av Reimers et al. (1991) konstaterades att hemolys inte hade någon påverkan på resultatet vid mätning av reproduktionshormon med radioimmunoassay. I vårt fall har vi använt ELISA teknik som baseras på färgomslag i det tillsatta provet. Det kan inte uteslutas att hemolys haft en inverkan på våra resultat men det är i sådana fall något som måste utvärderas i vidare försök.

Av ovan förda resonemang och gjorda beräkningar följer att parade prov med mjölk troligen är mindre lämpade när det gäller att utvärdera tillförlitlighet av mätresultaten. Med en viss reservation för olikheter för blodplasma och blodserum och i hanteringen av dessa provslag samt eventuell förekomst av hemolys kan man med ledning av korrelationsberäkningarna skatta att 8-9 av 10 utförda prov ger lika värden. För enbart höga och låga värden är säkerheten något högre. Denna 'fältmässiga' skattning av tillförlitligheten av instrumentet följer samma mönster som setts beträffande upprepbarhet av samma prov som testades i assayerna; vid höga och låga värden var avvikelserna från medelvärdena som lägst vid uppmätt höga och låga värden.

Dessa fynd tydde, avslutningsvis, på att alla provslag kan användas med godtagbar säkerhet i de uppmätta värdena vid extremnivåerna hög och låg men att värden runt medel kan uppvisa stor variation. Något högre säkerhet ses i blodserum och blodplasma än i mjölk. Eftersom överensstämmelsen mellan blodplasma och mjölk är bättre än blodserum och mjölk finns det fog för att anta att plasmaprover är att föredra.

Delstudie 2: tillämpning av eProCheck®800

Med de mätningar av P₄ som gjorts på AI djur (kvigor och förstakalvare) har vi tittat på instrumentets användbarhet för att avgöra rätt tidpunkt för insemination och jämfört dessa med gårdens system för brunstpassning. Vi har även med ledning av P₄ värden över cykeln dragit slutsatser om instrumentets brukbarhet vid tidig dräktighetsdiagnostik och relaterat dessa till vad tillverkaren av instrumentet hävdar.

När det gäller MOET-kvigorna har vi på givarsidan relaterat P₄ profilerna hos givardjuren med spolningsresultatet och de på mottagarsidan med dräktighetsresultat och vilka djur som valts att läggas in.

AI djur

Ett lågt P₄ anses vara en förutsättning för att inseminationen skall genomföras eftersom det betyder att spermadeponering kan göras inom en rimlig tid i samband med ovulationen. Därmed kan man förvänta sig att lyckas. På Viken bedömer man brunst enligt Sveas brunstindex, där 1 är mycket svag och 5 är mycket tydlig. Djuren i vår grupp fick bedömningarna 2-4. Det totala dräktighetsutfallet i vår grupp blev 53 %. Det bästa dräktighetsutfallet ses hos de djur som fått bedömningen 3 (4 för enbart kvigor) och det sämsta hos de som fått brunstindex 2. Skillnaderna mellan grupperna är dock små.

Om endast kvigor beaktas däremot verkar det finnas ett samband mellan brunstintensitet och dräktighetsutfall. Till skillnad från data för hela djurgruppen har bara ett fåtal djur inseminerats med brunstindex 2 och av de djur som gavs brunstindex 4 har 61 % blivit dräktiga. Av detta kan utläsas att det förefaller finnas ett samband mellan den brunstintensitet som har observerats hos kvigor och dräktighetsutfallet medan detsamma inte kan sägas för resten av gruppen.

41 djur hade låga P₄ nivåer i serum vid insemination. Av dessa blev 60 % dräktiga. För kvigor är andelen 80 % och för kor 38 %. Om man istället tittar i backspeglarna och utgår från dräktighetsutfallet (n = 48) uppmättes lågt P₄ för 18 djur (38 %) och resterande hade medel eller höga nivåer. För så många som sju djur uppmättes nivån till mycket hög (6 i minitubs skala 1-6). Tjugoen av de 48 dräktigheterna återfanns hos korna. Nivån av P₄ i mjölk uppmättes för 19 av dessa djur. Av dessa hade 16 djur låga nivåer och övriga tre medel. Inget djur hade högt P₄.

När det gäller att bestämma tidpunkt för insemination konstaterar vi därför följande;

- Lågt progesteron i plasma/ serum vid inseminationen hade ett signifikant positivt samband med dräktighet hos kvigor. Likaså sågs ett starkt samband mellan lågt P₄ i mjölk hos korna och dräktighet.
- Vikens system för att mäta brunstindex hade litet samband med andelen lyckade inseminationer för gruppen förstakalvare medan ett visst positivt samband för gruppen kvigor kunde ses.

Sammanfattningsvis kan sägas att ett lågt progesteron värde vid dag 0 i denna studie var en bra indikation för att inseminationen ska lyckas och detta gäller i synnerhet gruppen kvigor. Å andra sidan kan P₄ värden vara låga hos en del djur även dagen (dagarna) efter brunst (Båge et al., 2008) varför styrning med endast P₄ kan leda till att semin utförs för sent. Med andra ord bör P₄ mätningar kombineras med andra metoder för bästa resultat.

I syfte att använda instrumentet för tidig dräktighetsdiagnostik har vi tittat på P₄ vid dag 0 och 20 enbart och i kombinationer med dag 0 samt 7.

Följande frågeställningar ansågs av störst intresse vid positiv dräktighetsdiagnostik;

- i vilken utsträckning återspeglas lågt progesteron vid dag 0 i dräktighet?
- är lågt progesteron vid dag 0 i kombination med högt vid dag 20 liktydigt med dräktighet?
- är ett högt P₄ värde vid dag 20 liktydigt med dräktighet, sensitivitet, och i hur många fall är P₄ serum hög utan att dräktighet ägt rum, specificitet?

P₄ nivåer vid dag 0 och dess samband med dräktighetsutfallet diskuterades i det föregående stycket. Hur ser det istället ut då man tittar på kombinationen lågt P₄ serum vid insemination

och högt vid dag 20? 48 % av djuren med denna kombination var dräktiga vilket alltså är lägre än det totala dräktighetsutfallet. I P₄ mjölk var denna andel 62 % (n = 13).

Är det någon nytta med att mäta P₄ vid dag 20? I Minitübs produktbeskrivning av eProCheck®800 påstås att om P₄ är högt på dag 19 eller 20 så är sannolikheten för en lyckad insemination 80 %. Emellertid var endast 40 av 72 djur (56%) med högt P₄ på dag 20 dräktiga vid dag 50. För att påståendet skall vara sant borde 57 djur varit dräktiga. Mellanskillnaden på dryga 20 % kan förvisso förklaras av embryo- och fosterdöd. En ultraljudundersökning vid dag 25 hade varit till stor hjälp för att undersöka om så varit fallet.

Andelen djur som gått till dräktighet överstiger med knapp marginal dräktighetsutfallet för hela gruppen (56 % jämfört med 53%). Även om vi inte når till 80 % kan det vara av intresse att veta att ett djur med hög P₄ dag 20 åtminstone inte har sämre odds att bli dräktigt än vad som kan förväntas. Som också visats är sensitiviteten (sant positiva) för högt P₄ dag 20 med avseende på dräktighet 83 % medan specificiteten är låga 26 %. Det finns m a o en hög andel falskt positiva bland de djur som uppmätts med hög P₄ vid dag 20. Denna kan eventuellt delvis eller till stora delar förklaras av embryo- och fosterdöd.

För att eventuellt kunna utesluta dräktighet har vi velat besvara följande frågor;

- betyder ett lågt P₄ värde dag 20 eller lägre värde dag 20 än dag 7 att inseminationen inte resulterat i dräktighet?

Ett lågt värde dag 20, liksom lägre dag 20 än dag 7, borde vara en säker indikation på att inseminationen misslyckats. I Minitübs produktbeskrivning av eProCheck®800 hävdas också att om P₄ är lägre dag 19 eller 20 än under diöstrus (dag 7) så kan dräktighet uteslutas med 100 % säkerhet. Utfallet är dock 50 % för både mjölk och blodserum. Antalet djur i studien som uppfyller dessa villkor är dock begränsat (blodserum n = 14, mjölk n = 8). Då endast lågt värde vid dag 20 beaktas blir resultatet även här att ca 50 % av djuren förblev dräktiga (blodserum n= 8, mjölk n= 10) Även om djurantalet var begränsat och en viss osäkerhet kring mätresultaten föreligger så har vi svårt att förklara hur djur med dessa progesteronprofiler kunnat bli dräktiga.

MOET djur

Sex av de 11 *givardjur* som spolats hade höga koncentrationer P₄ vid insemination. För givardjur med låg koncentration P₄ dag 0 var det genomsnittliga antalet embryon per spolning knappt ett embryo högre än för djuren med hög P₄ koncentration. En större skillnad ses dock vad gäller antalet q4 per individ där gruppen med låg P₄ har 1,25 embryo i genomsnitt och de med höga P₄ 5,8 st.

Linares et al (1982) kunde inte påvisa något signifikant samband mellan embryomorfologi och progesteronprofiler i plasmaprover i en studie där man mätte P₄ dagligen från dag 1 till dag 7 på 25 kvigor. Dock visade han på ett positivt samband mellan å ena sidan en normal P₄ profil (i vårt fall låg – hög) och god embryokvalité (q1) och, å andra sidan, onormal P₄ profil (i vårt fall hög – hög) och dålig embryokvalité (q4). I vår studie ses samma tendens som understryks av skillnaden per givardjur i antalet embryon med dålig morfologi mellan P₄ profilerna låg – hög (1,25) och hög – hög (5,8). Underlaget är dock begränsat varför vidare studier skulle krävas för att bekräfta resultaten.

Något överraskande är det lika stor andel *mottagardjur* med låg P₄ koncentration som hög vid dag 0 som har använts för inläggning. Samtliga djur som använts har haft höga P₄ nivåer vid inläggningen (dag 7). Ett av det totalt 13 ilagda djuren blev dräktigt (8 %). Detta djur tillhörde gruppen som hade högt P₄ vid synkroniseringens slut (dag 0). Djuret kastade i den 10:e dräktighetsveckan.

Även om djurmaterialet är begränsat måste det ses som ett observandum att djur som bedömts som brunstiga i lika stor utsträckning har höga som låga koncentrationer P₄ i blodet på dag 0. Dag 0 ligger dock 1 à 2 dagar före det som bedömts vara dagen för högbrunstens infallande. I en studie på kvigor som löpte om mättes P₄ över 4-7 brunstcykler med speciellt fokus på hormonspelet kring östrus (Båge et al., 2001). En jämförelse med normalt fungerande kvigor gjordes. För båda djurgrupperna gällde att tiden från högbrunstens insättande till att P₄ nivåer började stiga inte i något fall var kortare än tre dygn. Tre dagar innan högbrunst låg P₄ på låga nivåer. I vårt material med hormonellt synkroniserade djur borde P₄ profilen vara låg – hög eller möjligen medel – hög medan kombinationen hög – hög inte borde förekomma. Om P₄ är hög på dag 0 ökar risken för asynkroni av mottagardjur och därmed hämmas embryots potential till elongering och MRP (Pope, 1988). Majoriteten av de djur som lagts in hade hög P₄ på dag 0. Dräktighetsutfallet i denna grupp var 8 %.

Slutsatser

- . Mätnoggrannheten var hög för serier med låga och höga P₄ koncentrationer.
- . Mätnoggrannheten påverkades ej av provtyp (blodserum, blodplasma eller mjölk). Över en sex veckors period har inte upprepad frysning och tining påverkat mätnoggrannheten.
- . Vid höga och låga P₄ koncentrationer i prov tagna vid samma tillfälle för de olika medierna serum, plasma och mjölk visade 9 av 10 prover ett korrekt värde. För mjölk var motsvarande tal ca 8 av 10 prov.
- . Provtagning vid dag 0 är av hjälp för att bestämma tidpunkt för insemination och ger dessutom en indikation på dräktighet som kan förstärkas med ett efterföljande prov med hög P₄ nivå vid dag 20 då detta uppvisade ett positivt samband med dräktighet vid dag 50.
- . På det begränsade underlaget med MOET djur hade givardjur med låg – hög P₄ profil fler embryon med god morfologi (q1) än djur med hög – hög P₄ profil och avsevärt färre embryon med dålig morfologi, 1,25 respektive 5,8.

Litteraturförteckning

- Båge R, H Gustafsson, B. Larsson, M. Forsberg, H. Rodriguez-Martinez (2002) Repeat breeding in dairy heifers: follicular dynamics and estrus cycle characteristics in relation to sexual hormone patterns. *Theriogenology* 57, 2257-2269.
- Butler (2000) Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* 60-61, 449-457
- DeLaval. www.delaval.com Milking.
Tillgänglig: http://www.delaval.com/Products/Milking/HerdManagement/ALPRO/Herd_health/default.htm (01-december-2009)
- Duchens M, M Forsberg, LE Edqvist, H Gustafsson, H Rodriguez-Martinez (1994) effect of induced suprabasal progesterone levels around estrus on plasma concentrations of progesterone, estradiol-17 β and LH in heifers. *Theriogenology* 42, 1159-1169.
- Galli C, G Lazzari (2008) The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Reproduction in Domestic Animals* 43, Supplement 2, 1-7
- Gustafsson H, B Larsson, L Söderquist (2009) Reproduktionstekniker. Red. B Larsson, Nötkreaturens reproduktion (2001), reviderad 2009, kapitel 19. Uppsala: SLU, Institutionen för kliniska vetenskaper, Avdelningen för reproduktion.
- Herd Navigator®. www.herdnavigator.com Om Herd Navigator.
Tillgänglig: <http://www.herdnavigator.com/pages/id2.asp> (01-december-2009)
- International Embryo Transfer Society (IETS) Data Retrieval Committee Annual Report, IETS-Newsletter 2006, 14, 4, www.IETS.org
- Larsson B, H Kindahl (2009) Dräktighet. Red. B Larsson, Nötkreaturens reproduktion (2001), reviderad 2009, kapitel 3 och kap. 5. Uppsala: SLU, Institutionen för kliniska vetenskaper, Avdelningen för reproduktion.
- Linares T, K Larsson, LE Edqvist (1982) Plasma progesterone levels from oestrus through day 7 after A.I. in heifers carrying embryos with normal or deviating morphology. *Theriogenology* 17 (2), 125-132
- Lopez H, LD Satter, MC Wiltbank (2004) Relationship Between Level of Milk Production and Estrus Behavior of Lactating Dairy Cows. *Animal Reproduction Science* 81, 209-223.
- Lucy MC. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction* 2003; S61: S415-S417.
- Minitüb. www.minitube.de Products.
Tillgänglig: http://www.minitube.de/produkte/docs/Leaflet_eProCheck_en.pdf (01-december-2009)
- Nachreiner RF, SJ Oschmann, LE Edqvist, JI Richards (1992) Factors affecting skim milk progesterone assay results. *American Journal of Veterinary Research* 53 (7), 1085-1089.
- Nötcenter Viken. www.notcenterviken.se Avelsarbetet på Viken.
Tillgänglig: <http://www.notcenterviken.se/avelsarbetet.asp> (11-november-2009)
- Oltner R, LE Edqvist (1982) Changes in plasma progesterone levels during storage of heparinized whole blood from cow, horse, dog and pig. *Acta Veterinaria Scandinavica* 23(1), 1-8.
- Petersson KJ (2007) Milk Progesterone as a Tool to Improve Fertility in Dairy Cows. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science. Doctoral Thesis No. 2007:46.
- Pope WF (1988) Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss. *Biology of Reproduction* December; 39(5), 999-1003.

- Reimers TJ, SV Lamb, SA Bartlett, RA Matamoros, RG Cowan, JS Engle (1991) Effects of hemolysis and storage on quantification of hormones in blood samples from dogs, cattle, and horses. *American Journal of Veterinary Research* 52 (7), 1075-1080.
- Reksen O, Grohn YT, Havrevoll O, Bolstad T, Waldmann A, Ropstad E. Relationships among milk progesterone, concentrate allocation, energy balance, milk yield and conception rate in Norwegian cattle. *Anim Reprod Sci* 2002; 73: 169-184.
- Roche JF, Mackey D, Diskin MD. Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 703-712.
- Rodriguez-Martinez H, J Hultgren, R Båge, A-S Bergqvist, C Svensson, C Bergsten, L Lidfors, S Gunnarsson, B Algers, U Emanuelson, B Berglund, G Andersson, M Håård, B Lindhé, H Stålhammar & H Gustafsson (2008) Reproductive performance in high-producing dairy cows: can we sustain it under current practice? In: *IVIS Reviews in Veterinary Medicine, I.V.I.S. (Ed.)*. International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 12-Dec-2008; R0108.1208 (Open Journal).
- SAS Institute Inc., 200*. SAS Version 9.1. SAS Institute Inc., Cary-, NC, USA
- Schams D, H Karg (1986) Hormones in milk. *Annual New York Academy of Sciences* 464, 75-86.
- Scherzer J, RA Fayrer-Hosken, L Ray, DJ Hurley, GL Heusner (2008) Advancements in large animal embryo transfer and related biotechnologies. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 371-376, E-publication 2008 Jan. 22. Review.
- Söderquist L, B Larsson, (2009) Reproduktionskontroll. Red. B Larsson, Nötkreaturens reproduktion (2001), reviderad 2009, kapitel 20. Uppsala: SLU, Institutionen för kliniska vetenskaper, Avdelningen för reproduktion.
- Stringfellow DA, R Mahajan, P Smith (1998) *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 3rd edition
Viking Danmark. www.heatime.dk Heatime™.
Tillgänglig: <http://www.heatime.dk/heatime.php> (15-november-2009)
- Wiltbank M, H Lopez, R Sartor, A Gument (2006) Positive and negative effects of high energy consumption on reproduction in lactating dairy cows. Conference Paper, Proceedings of the 2006 Tri-State Dairy Nutrition Conference, Fort Wayne, Indiana, USA, 25-26 April, 2006, 15-31.

Personliga meddelanden

- Båge R., 2009-11-10. SLU, Institutionen för kliniska vetenskaper, Avdelningen för reproduktion.
- Geust J., 2009-10-11. Nötcenter Viken AB, Vikens egendom 521 91 Falköping
- Gustafsson H., 2009-11-11. SLU, Institutionen för kliniska vetenskaper, Avdelningen för reproduktion.

Tack till

Heriberto Rodriguez-Martinez

Johanna Geust

Emanuel Fernandes Garcia

Niels Lundeheim

Personalen på Nötcenter Viken

Jan Hultgren

Hans Gustafsson