

Zestaw starterów i jego zastosowanie do wykrywania genetycznej odporności krów na ketozę oraz-sposób wykrywania genetycznej odporności na ketozę u krów

Przedmiotem wynalazku jest zestaw starterów i jego zastosowanie do wykrywania genetycznej odporności na ketozę u krów oraz sposób wykrywania genetycznej odporności krów na ketozę.

Ketoza jest jedną z najważniejszych chorób metabolicznych w stadach krów mlecznych, zarówno w kraju jak i na świecie. Jest typową chorobą występującą u krów w stadach mlecznych, nie tylko wysokowydajnych. Za główne przyczyny występowania ketozy uważa się błędy żywieniowe, ale u niektórych krów istnieje skłonność osobnicza.

U krów, które chorują na ketozę, we krwi znajduje się nadmierna ilość ciał ketonowych, takich jak: kwas β -hydroksymasłowy (BHM), aceton i kwas acetoctowy.

Ze względu na możliwości rozpoznania, rozróżnia się ketozę kliniczną, z pełnymi objawami, łatwym do zdiagnozowania przez lekarza weterynarii oraz częściej występującą ketozę subkliniczną. Stan subkliniczny jest to stan w którym zwierzę ma podwyższony poziom ciał ketonowych we krwi, w mleku oraz w moczu. U krów niewykazujących objawów klinicznych, może pojawić się także obniżony poziom glukozy we krwi.

Literatura wskazuje, że przy ketozie istotnie zmniejsza się wydajność mleczna zwierząt. Ketoza wpływa na pogorszenie wskaźników rozrodu oraz na odporność krów, które częściej zapadają na choroby infekcyjne tj. mastitis i endometritis. Nastęstwem występowania ketozy, w szczególności subklicznej u krów jest zapadanie na inne zaburzenie metaboliczne - np. przemieszczenie trawieńca. Subkliniczna ketoza zwiększa dwukrotnie ryzyko występowania lewego przemieszczenia trawieńca. Występowanie ketozy może być następstwem innych zaburzeń zdrowotnych takich jak: zapalenie błony śluzowej macicy, zaleganie poporodowe czy zatrzymanie łożyska.

Ketoza subkliniczna jest trudniejsza do wykrycia. Z obserwacji wynika że na ketozę kliniczną może chorować od 2 do 15% krów w stadzie, natomiast ketoza subkliniczna może obejmować nawet od 40 do 60% krów. Ze względów ekonomicznych, szczególnie ważnym jest umiejętne wykrywanie osobników odpornych na ketozę subkliniczną.

Ketoza jest schorzeniem metabolicznym, co oznacza że posiada różne podłoża etiologiczne. Sposoby prewencji tego zaburzenia, w zależności od typu ketozy mogą być różne. W zależności od przyczyn występowania, rozróżnia się ketozę pierwotną (typu I), wtórną (typu II) i pokarmową (typu III). Ketoza pierwotna występuje w okresie okołoporodowym.

Najczęściej na ketozę chorują krowy w okresie dwóch pierwszych miesięcy laktacji. Występowanie objawów ketozy w tym czasie pozwala na zakwalifikowanie jej do typu I lub II. Gdy u krów ketoza diagnozowana jest w pierwszych kilku dniach po porodzie (okres od porodu do końca drugiego tygodnia laktacji), to jej przyczyną jest niedostateczne pokrycie zapotrzebowania na energię, które wynika ze zbyt małego pobrania suchej masy w okresie przedporodowym. Powodem ketozy typu I i II jest ujemny bilans energii w tym okresie. Najczęstszym powodem braku apetytu w okresie okołoporodowym jest nadmierna kondycja krowy (nazywana syndromem "tłustej krowy"). Ketoza typu I i II może przyczyniać się do : zalegania poporodowego, zatrzymania łożyska lub rozwoju chorób infekcyjnych tj. mastitis, zapalenia błony śluzowej macicy oraz do problemów z zacieleniem krów.

Zapobieganie występowania ketozie polega przede wszystkim na dbaniu o jak najlepsze pobranie paszy przez zwierzęta, szczególnie od 5 do 7 dnia przed porodem. Istotna jest prawidłowa struktura fizyczna paszy i odpowiednio zbilansowana dawka pokarmowa w okresie okołoporodowym.

U krów chorujących na ketozę występuje bardzo wysoka zawartość ciał ketonowych we krwi. Wątroba nie produkuje glukozy, bo składniki potrzebne do tej syntezy nie są dostarczane z przewodu pokarmowego.

Ketoza typu III (pokarmowa) wynika z nadmiernego pobierania kwasu masłowego z kiszzonek słabej jakości. Za kiszzonki słabej jakości uważa się kiszzonki z liści buraczanych, z traw lub lucerny oraz kiszzonki zepsute. W związku z poprawą jakości produkowanych kiszzonek, ten typ ketozy jest bardzo rzadko diagnozowany w ostatnich kilkunastu latach.

Wyżej wymienione typy ketozy mogą mieć przebieg kliniczny i subkliniczny. We współczesnych stadach krów mlecznych ketoza typu I i II, zwłaszcza w postaci subklinicznej, jest najczęściej występującym zaburzeniem metabolicznym.

Znane są ze zgłoszenia wynalazku nr WO2018039081A1 zmodyfikowane PEG warianty polipeptydu bFGF-21, kompozycje zawierające wariant polipeptydu bFGF-21 oraz sposoby przydatne w leczeniu i/lub zapobieganiu ketozie, w których podaje się wariant lub kompozycję zawierającą wspomniany wariant bFGF-21.

Znany jest także ze zgłoszenia chińskiego nr CN111485027A sposób badania przesiewowego markera molekularnego odporności na ketozę krów mlecznych i jego zastosowania. Krowy zdrowe i z ketozą są brane jako próbki, po czym następuje sekwencjonowanie chipów, wypełnianie danych, analiza sygnału selekcyjnego, analiza

asocjacyjna całego genomu, a także badany jest kluczowy gen APOA1 wpływający na odporność na ketozę bydła chińskiej rasy holsztyńskiej .

W znanym stanie techniki do wykrywania ketozy stosuje się testy diagnostyczne.

Dla diagnozy ketozy znaczenie mają testy na obecność ciał ketonowych w moczu lub mleku. Większość dostępnych na rynku testów opiera się na obecności acetooctanu lub acetonu w mleku lub moczu. Wynik zależy od zmiany koloru odczynnika użytego w danym teście. Przykładem może być test CowCHAMP Keto-Test. Zaletą tego testu jest uzyskanie szybkiego i wiarygodnego wyniku (z moczu), a także brak konieczności pobierania krwi, co skutkuje mniejszym stresem dla zwierząt. CowCHAMP Keto-Test można używać w dowolnym momencie do ok. 30 dni po wycieleniu, w celu monitorowania stanu ketozy u krów.

Dostępne są również glukometry służące do monitorowania ciał ketonowych we krwi pacjentów z cukrzycą (glukometry dla ludzi). Mierzą one ilościowo stężenie beta-hydroksymaślanu (BHM) we krwi i mogą być stosowane do klinicznej diagnozy ketozy. Tylko Polska Federacja Hodowców Bydła i Producentów Mleka (PFHBiPM) wprowadziła w swoich raportach wynikowych typowanie krów podejrzanych o subkliniczną ketozę na podstawie oznaczania zawartości ciał ketonowych w mleku (acetonu i kwasu β hydroksymasłowego), w próbkach mleka pobieranych od poszczególnych krów co miesiąc. Krowy z przypuszczeniem subklinicznej ketozy są oznaczone w raporcie wynikowym RW-2 za pomocą symbolu K!, a w zależności od częstości występowania tego schorzenia w odniesieniu do całego stada w raporcie wynikowym RW-1 ukazują się komunikaty o zagrożeniu ketozą [Z. Kowalski, A. Płyta, E. Rybicka, W. Jagusiak, K. Słoniewski, Novel model of monitoring of subclinical ketosis in dairy herds in Poland based on monthly milk recording and estimation of ketone bodies in milk by FTIR spectroscopy technology. ICAR, Technical Series-19, Krakow, Poland, 10-12.06.2015, ISSN:1563-2504;ISBN:92-95014-15-4].

Nikt dotąd nie badał odporności krów na ketozę stosując jako marker molekularny gen osteopontyny, co ma niezwykle istotne znaczenie w hodowli krów, gdyż wykrywanie odporności genetycznej na wczesnym etapie rozwoju, pozwoli hodowcom wyeliminować krowy podatne na ketozę i nie ponosić kosztów związanych z pielęgnacją i leczeniem.

Nieoczekiwanie okazało się, w wyniku badań nad polimorfizmem osteopontyny, że gen ten może stanowić marker do wykrywania genetycznej odporności na ketozę u bydła.

Osteopontyna po raz pierwszy została opisana w roku 1979 jako białko związane z transformacją komórek nabłonkowych. Jej nazwa pochodzi od łacińskich słów: „osteo- kość”

oraz „pontin- most” co związane jest z jej podstawową funkcją w organizmie jaką jest wiązanie wapnia i tworzenie struktury kostnej. Osteopontyna jest glikoproteiną o charakterze chemokiny. Chemokiny to ważna grupa białek, które stymulują ruch leukocytów oraz kontrolują ich migrację z krwi do tkanek, pełniąc tym samym rolę w formowaniu ogniska zapalnego. Osteopontyna to białko, które ulega ekspresji przede wszystkim na osteoklastach, osteoblastach, zębach, na komórkach nabłonkowych piersi, nerki, skóry, komórkach nerwowych, komórkach śródbłonna naczyń. Poza swoją podstawową rolą związaną z układem kostnym, osteopontyna pełni także szereg ważnych funkcji w układzie immunologicznym: posiada zdolność indukowania chemotaksji i migracji komórek układu immunologicznego w miejsce stanu zapalnego, w przypadku ostrych i przewlekłych stanów zapalnych dochodzi do wzrostu ekspresji tego białka na limfocytach T, makrofagach, komórkach NK i komórkach dendrytycznych oraz wzrostu jej stężenia w płynach ustrojowych. Obecność osteopontyny stwierdza się we krwi, mleku, moczu, żółci oraz w nasieniu. Ponadto jak wskazują wyniki wielośrodkowych badań, osteopontyna zaangażowana jest w takie procesy jak: angiogeneza, adhezja komórek, apoptoza, regulacja zapalenia, gojenie ran, regulacja wzrostu i rozwoju płodu, utrzymanie ciąży, rozwój bydlęcych zarodków in vitro.

Gen bydlęcej osteopontyny zlokalizowany jest na chromosomie 6. Według bazy Ensembl gen ten posiada 4 transkrypty, w obrębie których odnotowano kolejno: 7, 6, 8 i 7 eksonów. W dotychczasowych badaniach nad polimorfizmem genu osteopontyny u bydła analizowano jego wpływ na cechy takie jak: produkcja i skład chemiczny mleka, liczba komórek somatycznych w mleku, wytrzymałość laktacji, związek z tempem wzrostu młodego bydła (*masą urodzeniową cieląt, masą odstawienia cieląt od wymienia, wagą roczną krów*). Znaczna część z tych badań dotyczyła polimorfizmu c.8514 C>T zlokalizowanego w intronie 4 genu OPN.

W obecnych badaniach analizowano polimorfizm c.495C > T (rs109659827), zlokalizowany w exonie 1 (część kodująca). Analizowane podstawienie cytozyny na tyminę jest mutacją typu zmiany sensu, co oznacza, że powoduje podstawienie aminokwasu w kodowanym przez ten gen białku (proliny na leucynę).

Celem wynalazku było opracowanie specyficznych starterów i ich zastosowanie w reakcji amplifikacji polimorficznego fragmentu DNA w obrębie genu osteopontyny zawierającego mutację c.495C > T (rs109659827), służącego do wykrywania genetycznej odporności na ketozę u bydła.

Wynalazek ponadto dostarcza sposobu wykrywania genetycznej odporności na ketozę u bydła już na wczesnym etapie rozwoju poprzez ustalenie za pomocą specyficznych starterów występowania genotypu TT, który odpowiada za odporność na ketozę.

Wynalazek dotyczy zestawu starterów posiadających następujące sekwencje nukleotydowe
Starter F: 5' GTGTGTGCCTGTGTTTGTTTC 3'

Starter R: 5' GAGAAGAGTCCAGTCCCCTG 3',

które są odpowiednie do wykrywania genetycznej odporności na ketozę u bydła w procesie amplifikacji polimorficznego fragmentu DNA w obrębie genu osteopontyny będącego markerem ketozy.

Przedmiotem wynalazku jest także zastosowanie starterów o sekwencjach nukleotydowych:

Starter F: 5' GTGTGTGCCTGTGTTTGTTTC 3'

Starter R: 5' GAGAAGAGTCCAGTCCCCTG 3',

do wykrywania genetycznej odporności na ketozę u bydła w procesie amplifikacji segmentu zawierającego ekson 1 genu osteopontyny będącego markerem do wykrywania odporności na ketozę u bydła w reakcji PCR.

Sposób wykrywania odporności na ketozę według wynalazku polega na wykrywaniu obecności mutacji w obrębie genu osteopontyny u bydła, w którym polimorficzny fragment DNA w obrębie badanego genu amplifikowany jest w reakcji PCR za pomocą odpowiednich starterów.

Sposób według wynalazku obejmuje następujące etapy:

- ocena ilościowa i jakościowa wyizolowanego DNA z pobranych próbek krwi lub z innej tkanki od bydła, korzystnie z wykorzystaniem spektrofotometru;

- amplifikacja segmentu zawierającego ekson 1 genu osteopontyny będącego markerem genetycznym do wykrywania odporności na ketozę u bydła w reakcji PCR za pomocą specyficznych starterów o sekwencjach nukleotydowych:

Starter F: 5' GTGTGTGCCTGTGTTTGTTTC 3'

Starter R: 5' GAGAAGAGTCCAGTCCCCTG 3'

- analiza polimorfizmu c.495C > T (rs109659827), zlokalizowanego w exonie 1, który dotyczy części kodującej, korzystnie z wykorzystaniem metody PCR-RFLP,

- wykrywanie u krów odporności genetycznej na ketozę w przypadku ustalenia występowania genotypu TT (odpowiadającego za odporność na ketozę).

Wynalazek umożliwia rozróżnienie osobników u których występuje mutacja skorelowana z odpornością na występowanie ketozy już na wczesnym etapie rozwoju krów, bez konieczności przeprowadzenia jakichkolwiek zabiegów inwazyjnych (zwłaszcza w przypadku gdy materiałem do izolacji DNA będzie kał lub ślina). Wynalazek dostarcza więc narzędzie umożliwiające wczesną diagnostykę odporności na ketozę u bydła na każdym etapie rozwoju. Zastosowanie wynalazku może stanowić korzystniejszą alternatywę w diagnozie ketozy w stosunku do znanych metod oraz uniknięcie kosztów związanych z leczeniem.

Przykład

Celem badań było określenie markerowych zmian w sekwencji genów w grupie bydła u których wystąpił podwyższony poziom kwasu β -hydroksymasłowego we krwi ($\geq 0,80$ mmol/l), wskazujący na występowanie subklinicznej ketozy, w porównaniu do grupy kontrolnej. Grupę kontrolną stanowiły krowy u których poziom kwasu β -hydroksymasłowego we krwi był $< 0,80$ mmol/l.

Przeprowadzono badania nad określeniem zmian w obrębie genu osteopontyny i określeniem genotypów odpowiednio: CC, CT, TT podczas występowania subklinicznej ketozy u bydła, gdzie CC i CT odpowiada za podatność na ketozę, zaś TT odpowiada za odporność.

W badaniu wykorzystano informacje o krowach mlecznych, wysokowydajnych, pochodzących z trzech różnych gospodarstw produkcyjnych (n=979). Informacje produkcyjne dotyczyły krów w ośmiu laktacjach, z podziałem na sześć grup (1, 2, 3, 4, 5, ≥ 6). Gospodarstwa znajdowały się pod tzw. oceną użytkowości mlecznej, prowadzoną przez Polską Federację Hodowców Bydła i Producentów Mleka (PFHBiPM). Dane techniczne dot. wydajności mlecznej oraz parametrów mleka pochodziły z próbných dojóv wykonanych przez PFHBiPM. Informacje dotyczyły siedmiu składników mleka t.j.: wydajność za laktacje, procentowa zawartość tłuszczu, białka, laktozy, suchej masy oraz koncentracji mocznika w mg/L i ilości komórek somatycznych określonych 1000/mL. W tym samym czasie, od wszystkich zwierząt pobrana została krew z żyły ogonowej do 5 ml sterylnych probówek zawierających antykoagulant EDTA (kwas wersenowy, kwas edetynowy, komplekson II), którą wykorzystano do oznaczenia poziomu kwasu β -hydroksymasłowego, wskazującego na występowanie subklinicznej formy ketozy, zgodnie z normą laboratoryjną w przedziale 0,010-0,80 mmol/L oraz do izolacji DNA. Poziom kwasu β -hydroksymasłowego oznaczano w polskim laboratorium weterynaryjnym VetLab Sp. z o.o.

Zbiór danych został uzupełniony o parametry hodowlane krów m.in. wiek krowy, numer laktacji, faza laktacji. W badaniach laboratoryjnych do analizy próbek mleka wykorzystano MilkScan FT6000 (Foss, Hillerod, Denmark). Do izolacji DNA z próbek krwi wykorzystano MasterPure™ DNA Purification Kit (Lucigen). Ocenę ilościową i jakościową DNA przeprowadzono z wykorzystaniem spektrofotometru Nano Drop 2000 (Thermo Scientific, USA). Następnie, przeanalizowano polimorfizm c.495C > T (rs109659827), zlokalizowany w exonie 1 który dotyczy części kodującej, wykorzystując metodę PCR-RFLP. Segment zawierający ekson 1 genu osteopontyny amplifikowano w reakcji PCR, za pomocą starterów zaprojektowanych z wykorzystaniem programu Primer3Plus w oparciu o sekwencję referencyjną (GenBank Accession No. AC_000163.1). Startery miały następujące sekwencje nukleotydowe: Starter F: 5' GTGTGTGCCTGTGTTTGTTTC 3', Starter R: 5' GAGAAGAGTCCAGTCCCCTG 3'.

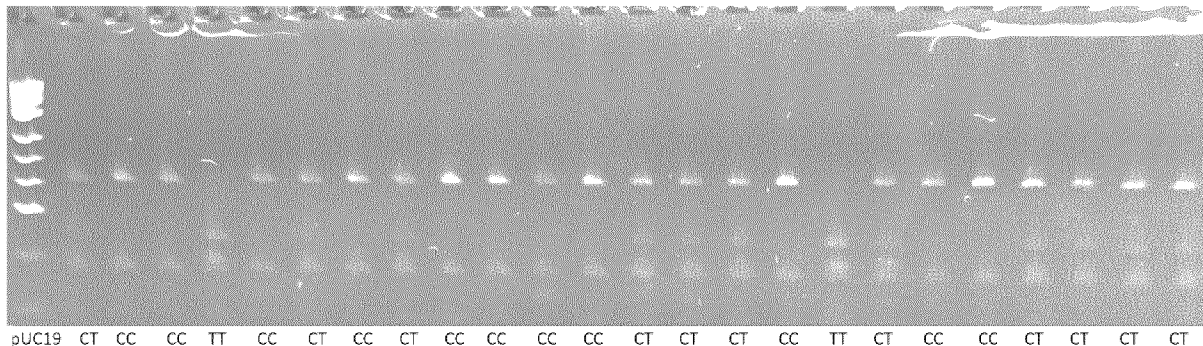
Produkt PCR następnie trawiono przy zastosowaniu enzymu restrykcyjnego MnlI – trawienie przebiegało zgodnie z zaleceniami producenta (BioLabs, UK)

Reakcje PCR prowadzono w finalnej objętości 20 μ l. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 1x Taq buffer + KCl – MgCl₂ (Thermal Scientific, USA), 1,125 mM MgCl₂, 0,105 mM każdego dNTP, 0,175 μ M każdego ze starterów, 1% DMSO (dimetylosulfotlenek), 1,75 U Taq polymerase (Thermal Scientific, USA). Zastosowano następujący program termiczny: wstępna denaturacja DNA w 95°C przez 5 minut, 35 cykli: właściwej denaturacji DNA w 95°C przez 40 sekund, przyłączania starterów w 65°C przez 45 sekund, wydłużania produktu PCR w 72°C przez 45 sekund. Kolejnym etapem reakcji było końcowe wydłużanie produktu PCR w 72°C przez 5 minut. Następnie próbki PCR chłodzono do temperatury 4°C i wykorzystywano do dalszych analiz.

5 μ l produktu PCR inkubowano z 1 μ l buforu (BioLabs, UK), 0,4 μ L enzymu restrykcyjnego MnlI (10U/ μ L, BioLabs, UK) i 3,6 μ L ultra czystej wody przez 2 godziny w temperaturze 37°C. Po zakończonej inkubacji, trawienie produktów PCR zatrzymywano poprzez dodanie 2,5 μ L buforu obciążającego 6X Loading Dye Solution (ABO). Następnie, uzyskane fragmenty restrykcyjne wizualizowano na 3,5 % żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyliny w obecności markera pUC19 DNA/MspI (ABO). Elektroforezę prowadzono przy pomocy aparatu MUPID™One (Nippon) przy napięciu 100 V przez 90 minut.. Otrzymano następujące wzory prążkowe, umożliwiające rozróżnienie genotypów zwierząt:

CT: 147 pz 82 pz 65,57 pz 30 pz

TT: 82 pz 65,57 pz 30 pz



Polimorfizm c.495C > T (rs109659827), zlokalizowany w exonie 1, przy wykorzystaniu metody PCR-RFLP

Genotyp CT (o układzie prążków: 147 pz, 82 pz, 65 pz, 57 pz, 30 pz) odpowiada za podatność na ketozę

a genotyp TT (o układzie prążków: 82 pz, 65 pz, 57 pz, 30 pz) odpowiada za odporność na ketozę

Zastosowano metody statystyczne z wykorzystaniem modeli klasyfikacyjnych. Modele tego typu określane są mianem modeli skoringowych, które pozwalają ocenić działania wyrażające prawdopodobieństwo zajścia modelowanego działania. Plik danych zawierał informację o 979 badaniach, przedstawiony za pomocą 15 zmiennych. Zmienna typu Ketoza, zawiera informację o diagnozie i pełni w analizie rolę zmiennej zależnej. Zmienna ta przyjmuje dwie wartości: BHM – 1 - występowanie ketozy oraz BHM – 0 - niewystępowanie ketozy. Kolejne 14 zmiennych to informacje uzyskane na podstawie analizy mleka i genotypu zwierząt. Na podstawie tych cech przygotowany został model, którego zadaniem było określenie występowania genotypów CC, CT, TT w loci genu osteopontyny podczas występowania subklinicznej ketozy u bydła.

W modelu opartym na regresji logistycznej, wykorzystano metodologie budowy kart skoringowych. Pierwszym etapem była eliminacja tych cech diagnostycznych, które są nieistotne z punktu widzenia wpływu na analizowaną zmienną. Na podstawie korelacji pomiędzy poszczególnymi zmiennymi wchodzącymi w skład reprezentowanych zmiennych usunięto zmienne bez ryzyka utraty informacji o badanym zjawisku. Usunięcie nieistotnych zmiennych zawęziło liczbę potencjalnych predyktorów do 3. Wykorzystano tabele krzyżowe (tabele dwudzielne), przedstawiające łączny rozkład dwóch wskaźników mierzonych na dowolnym poziomie (nominalnym lub *porządkowym*). Poprzedzając badania właściwości testów

statystycznych, wykorzystano tablice dwudzielne jako narzędzie do modelowania populacji generalnej, czyli nadaniu populacji generalnej określonej właściwości (*związek między cechami*).

W celu wyznaczenia empirycznej mocy testu, wygenerowano tablice dwudzielne wraz ze statystyką testową X^2 Pearsona.

Do weryfikacji hipotezy zastosowano statystykę ze wzoru:

$$x^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

gdzie:

E - oczekiwana częstość komórki

O – obserwowana częstość komórki

Wyniki obliczeń wartości oczekiwanych przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Podsumowująca tabela dwudzielna dla wartości obserwowanych

| BHM 0/1 | OST (exon 1) CT | OST (exon 1) CC | OST (exon 1) TT | Razem |
|----------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------|
| 0 | 457(1,05%) | 386(1,06%) | 85(1,01%) | 929 |
| 1 | 23(20,86%) | 25(16,44%) | 1(86%) | 50 |
| suma | 480(100%) | 411(100%) | 86(100%) | 979 |

Tabela 2. Statystyka dla ketozy i OST.

| statystyka | Statystyka: BHM 0/1 x OST (exon 1) | | |
|---------------------------|-------------------------------------------|-----------|----------|
| | Chi-kwadr. | df | p |
| Chi ² Pearsona | 11,98343 | df=3 | p=0,0744 |
| Chi ² NW | 8,108320 | df=3 | p=0,4383 |

istotne p=0,0744

Wysokie wartości X^2 Pearsona oznaczają duże różnice między częstościami obserwowanymi a oczekiwanymi (zależności są istotne).

Dla każdej kategorii zmiennej BHM 1/0 obliczono miarę szans poprzez określenie „wagi dowodu” (WoE weight of evidence). Wyższe wartości informują o większym prawdopodobieństwie zmian. Profil dyskretyzacji został przygotowany z wykorzystaniem wykresu (Fig.1). Dyskretyzacja zmiennych pozwoliła na:

- zbudowanie stabilnego modelu;
- estymację parametrów wskazującą na mniejszą skłonność do przeuczenia.

Tabela 3. Kategoryzacja zmiennych (CC, CT, TT) ze wskazaniem WoE (weight of evidence)

| OST (exon 1)kat | Niemodelowana klasa | Modelowana Klasa | Suma | Portfel | Procent złych | Procent dobrych | Procent ogółem | WoE weight of evidence |
|-----------------|---------------------|------------------|------|---------|---------------|-----------------|----------------|------------------------|
| CC | 387 | 26 | 413 | 6,30% | 52,00% | 41,66% | 42,19% | -22,18 |
| CT | 457 | 23 | 480 | 4,79% | 46,00% | 49,19% | 49,03% | 6,71 |
| TT | 85 | 1 | 86 | 1,16% | 2,00% | 9,15% | 8,78% | 152,06 |
| Ogół | 929 | 50 | 979 | 5,11% | 100,00% | 100,00% | 100,00% | |

Tabela 4. Tabela liczności dla wszystkich zwierząt (n=974) z trzech zakładów produkcyjnych

| Tabela liczności. Liczność oznaczonych komórek | | | | | |
|------------------------------------------------|--------|---------------------|---------------------|---------------------|-------|
| | Kod | OST (exon 1)_kat CT | OST (exon 1)_kat CC | OST (exon 1)_kat TT | Razem |
| Liczba | Obora1 | 200 | 179 | 38 | 417 |
| % z wiersza | | 47,96% | 42,93% | 9,11% | |
| Liczba | Obora2 | 236 | 169 | 42 | 447 |
| % z wiersza | | 52,80% | 37,81% | 9,40% | |
| Liczba | Obora3 | 41 | 63 | 6 | 110 |
| % z wiersza | | 37,27% | 57,27% | 5,45% | |
| Liczba | Ogół | 477 | 411 | 86 | 974* |

*Różnica w ilości zwierząt wynika z eliminacji niepełnych rekordów

Ocena jakości klasyfikacji została przeprowadzona z wykorzystaniem krzywej ROC wskazującej próg decyzyjny, jak również wizualizującej sytuacje decyzyjne (Fig.2). Otrzymany model jest dobrej jakości i może być przydatny jako narzędzie wspierające zidentyfikowanie wybranych markerów.