



© LUC VAN DRIJK

MELK ALS SPIEGEL VOOR DE VRUCHTBAARHEID

In deze reeks over sensoren in de melkveehouderij gaat het deze keer over een sensor die gebruik maakt van een innovatief meetconcept voor de detectie van progesteron in rauwe melk. – Naar: ILVO & KU Leuven

In het project 'Koesensor' werken de partners KU Leuven, ILVO en Hooibeekhoeve (provincie Antwerpen) aan een verbetering van de vruchtbaarheid op de Vlaamse melkveebedrijven. De website www.koesensor.be is een informatiebron over bestaande sensorsystemen. Binnen het project wordt ook gewerkt aan de ontwikkeling van nieuwe technieken en bijbehorende intelligente methodes om deze data om te zetten naar bruikbare informatie.

De studie van de technische gegevens op de Vlaamse melkveebedrijven leert ons dat de stijgende melkproductie gepaard gaat met verminderde reproductiecijfers. De koeien worden minder duidelijk tochtig; vaak zijn meerdere inseminaties nodig voor een succesvolle dracht. Hierdoor steeg de gemiddelde tussenkalf tijd in de laatste 20 jaar gestaag naar ongeveer 420 dagen. Economisch gezien ligt de optimale tussenkalf tijd beduidend lager. De verminderde vruchtbaarheidsresultaten en de stijgende kuddegroottes

op de bedrijven maken dat er nood is aan sensoren om de zintuiglijke waarnemingen door de veehouder te ondersteunen. Sensoren laten de veehouder toe om een duidelijk beeld te krijgen van zijn individuele dieren, zonder dat hij ze urenlang moet observeren. Door de aandacht naar de juiste dieren te trekken, kan hij sneller en efficiënter ingrijpen. Vandaag worden sensoren vooral aangewend om de dieren die extra aandacht nodig hebben op te sporen en op te lijsten. Hiervoor focussen de huidige beschikbare systemen voornamelijk op mastitis, kreupelheid, vruchtbaarheid en metabole problemen.

.....

De progesteronconcentratie in de melk geeft een preciezer beeld over de vruchtbaarheidstoestand.

.....

Waarom progesteron?

In het vruchtbaarheidsdomein zijn activiteitsmeters voor tochtdetectie bij koeien zeer populair. Doordat de verhoogde activiteit – die gekoppeld is aan de bronst – geregistreerd wordt, kan je tocht zonder uitgebreide visuele inspectie detecteren. Deze toepassing is vaak hét schoolvoorbeeld om de meerwaarde van precisieveeteelt aan te tonen. Door de succesvolle ondersteuning van de melkveehouder bij de tochtdetectie kan het gebruik leiden tot betere vruchtbaarheidsprestaties in de praktijk. Echter, niet iedere verhoogde activiteit is gerelateerd aan tocht. Bovendien kunnen acycliciteit, ovariële problemen en dracht niet worden vastgesteld op basis van activiteitsregistratie, terwijl dit voor een veehouder ook belangrijke informatie is. Een betrouwbare parameter die ons wel al deze informatie kan geven, is het geslachtshormoon progesteron. De hoeveelheid progesteron in het bloed, weerspiegeld in de concentratie progesteron

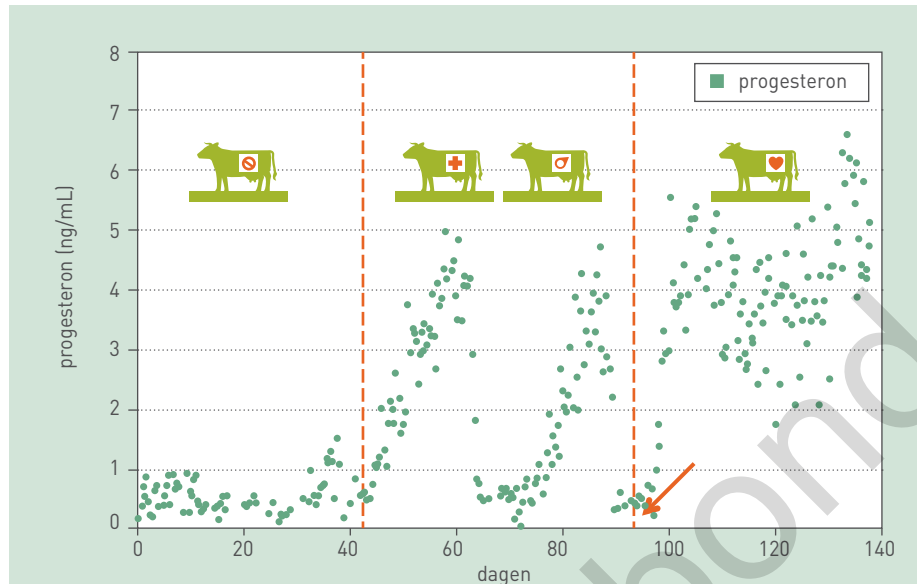
teron in de geproduceerde melk, is een fysiologische parameter die, in tegenstelling tot een afgeleid symptoom zoals activiteit, een zeer gedetailleerd beeld geeft over de precieze vruchtbaarheids-toestand van het dier (zie kader). Door deze directe link resulteert het opvolgen van melkprogesteron voor tocht in een zeer hoge gevoeligheid met een zeer lage kans op valse attenties.

Nieuwe biosensor

Het idee om progesteron te meten in melk is niet nieuw. In laboratoriumomstandigheden kan dit opgemeten worden met een cElisatest. Deze referentietechniek is echter niet geschikt voor gebruik op een melkveebedrijf. Momenteel is er één commercieel systeem op de markt dat progesteron in melk volautomatisch kan opmeten op het veebedrijf, namelijk de Herd Navigator van DeLaval. De meting in dit systeem gebeurt op basis van de *lateral flow*-technologie, waarbij melk wordt aangebracht op een teststrip vergelijkbaar met de zwangerschapstest in de humane geneeskunde. Afhankelijk van de progesteronconcentratie in de melk zal de strip een meer of minder intense kleurverandering vertonen. Hoewel deze *lateral flow*-technologie zeer snel (≤ 15 minuten) en geautomatiseerd kan worden uitgevoerd, is de nauwkeurigheid beduidend lager dan die van de cElisatechniek.

Een andere, veel gebruikte techniek om zeer lage concentraties van biologische moleculen op te meten, is *Surface Plasmon Resonance* (SPR). Deze techniek is in het laboratorium de gouden standaard voor de opvolging van biologische interacties en wordt reeds succesvol toegepast in de humane geneeskunde, de voedingssector en bij milieuanalyses. Bij SPR wordt gebruik gemaakt van de bindingsreactie van een biologisch herkenningsmolecuul aan het sensoroppervlak om de concentratie van het beoogde doelmolecuul te bepalen. Hoewel deze techniek zeer nauwkeurig is, was hij tot voor kort enkel bruikbaar in gecontroleerde omstandigheden.

We hebben aan de KU Leuven een robuust alternatief ontwikkeld, genaamd *Fiber-Optic Surface Plasmon Resonance* (FO-SPR). Hierin werden de dure en gevoelige optische componenten van de originele SPR-meetopstelling vervangen door stabiele en compacte optische vezeltechnologie (FO), die reeds uitvoerig toegepast wordt voor datacommunicatie (bijvoorbeeld Fibernet voor snel en krachtig internet). Deze robuuste technologie kan ook buiten het lab worden gebruikt. Deze kostenefficiënte en ge-



Figuur 1 Progesteronprofiel van afkalven tot dracht - Bron: ILVO & KU Leuven

Progesteronprofiel

Progesteron wordt hoofdzakelijk geproduceerd door een functioneel geel lichaam (*corpus luteum*) in de ovaria van cycliserende koeien. Deze productie is afhankelijk van het lactatie- en reproductiestadium.

Postpartum acyclisch Na het afkalven is er geen functioneel geel lichaam op de ovaria van de koe aanwezig en wordt er een zeer lage concentratie progesteron (0-1 ng/mL) geproduceerd door de bijniercortex. De koe is acyclisch gedurende de eerste 20 tot 35 dagen van de lactatie.

Cyclisch Na de ovulatie produceert het gevormde geel lichaam progesteron. Tijdens de eerste stijgende fase is de concentratie evenredig met de grootte van het geel lichaam. Na dag 8, als de maximale grootte van het corpus luteum bereikt is, blijft de progesteronconcentratie hoog tot er luteolyse optreedt (degeneratie van het geel lichaam). Hierna treedt een nieuwe ovulatie van een dominante follikel op en kan de koe geïnsemineerd worden.

Ovariële cysten Wanneer er ovariële problemen optreden, vertoont het normale progesteronpatroon zoals hierboven beschreven, afwijkingen:

- bij een luteale cyste blijft de progesteronproductie hoog voor een abnormaal lange tijd
- bij een folliculaire cyste blijft de progesteronproductie laag voor een onverwacht lange tijd

In beide gevallen kan de koe, ook al vertoont ze tochtsymptomen, niet drachtig worden.

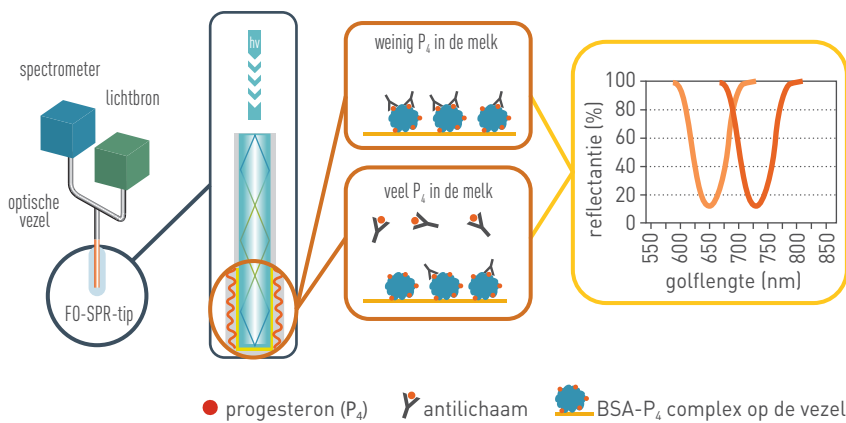
Dracht Na succesvolle inseminatie (rode pijl) produceren het dracht geel lichaam en later de placenta hoge concentraties progesteron (>10 ng/mL).

makkelijk te gebruiken FO-SPR-techniek heeft zich al uitvoerig bewezen op onderzoeksniveau voor verschillende toepassingen in de medische en voedingssector. We hebben onderzocht of deze techniek ook bruikbaar is voor het nauwkeurig opmeten van progesteron in melk. Het meetprincipe van FO-SPR wordt hieronder gedetailleerd uitgelegd.

FO-SPR-techniek voor het meten van progesteron in melk

De nieuw ontwikkelde sensor bestaat uit 4 delen: een FO-SPR-sensortip gekop-

peld aan een optische vezel, een spectrofotometer en een lichtbron. Op het oppervlak van de sensortip ter grootte van een naald, is een eiwit-progesteroncomplex ($BSA-P_4$) gebonden. Wanneer de sensortip in de melk wordt gedipt, worden ook antilichamen aan de melk toegevoegd (figuur 2 p. 12, rode kader). Deze antilichamen binden zeer specifiek aan progesteron (P_4) en kunnen dus zowel binden met het $BSA-P_4$ -complex op de sensortip, als met de progesteron aanwezig in de melk. Deze competitie maakt dat, indien er veel progesteron in de melk



Figuur 2 Werking van een FO-SPR-sensor - Bron: KU Leuven

aanwezig is, er weinig antilichamen aan het BSA- P_4 -complex op de sensortip binden. Bij een lage progesteronconcentratie in de melk bindt juist vooral antilichaam aan de sensortip. De binding aan het oppervlak van de sensor zorgt ervoor dat het reflectantiepatroon binnenin de sensortip verandert, doordat de massa die rondom de sensortip zit groter wordt. Deze verandering neemt dus toe naarmate er meer antilichamen binden aan het oppervlak, en is dus omgekeerd evenredig met de hoeveelheid progesteron in de melk. Het reflectantiepatroon van de sensortip wordt opgemeten met

behulp van spectrometrie. De lichtbron stuurt wit licht door de optische vezel naar de sensortip en het teruggekaatste licht wordt opgemeten met de spectrofotometer (figuur 2, gele kader).

Resultaten

Eerst hebben we het effect op de nauwkeurigheid van de verschillende stappen in het meetconcept onderzocht. De hoeveelheid BSA- P_4 -complex dat moet gebonden worden op het sensoroppervlak, de hoeveelheid toe te voegen antilichamen, optimale reactie- en meettijden ... Zodra de optimale waarde voor elk

van deze parameters gekend was, hebben wij de nauwkeurigheid voor progesteronmeting bepaald en vergeleken met de huidige 'gouden standaard' voor progesteronmetingen, cElisa. De correlatie tussen cElisa en FO-SPR over het meetbereik van 0 tot 20 ng/mL progesteron wordt weergegeven in figuur 3. Bij de vergelijking van de kalibratiecurven, waarbij melkstandaarden met gekende concentraties aan progesteron geanalyseerd werden met beide methodes, werd een sterke overeenkomst gevonden tussen de 2 meettechnieken (correlatie van 98%). Verder werd de nieuwe sensor reeds uitgebreid getest op rauwe melkstalen met lage concentraties aan progesteron ($< 3,5$ ng/mL), wat belangrijk is om accuraat tocht te kunnen detecteren. Deze validatiemetingen met beide technieken vertonen eveneens een zeer hoge correlatie. Om de herhaalbaarheid van de test na te gaan, wordt gekeken naar de variatie tussen verschillende metingen op eenzelfde staal. Deze variatie bleek beduidend lager (ongeveer 1,5 maal) met de FO-SPR-sensor dan met cElisa.

Toekomstvisie

We zullen voorts de ontwikkelde FO-SPR-sensor vergelijken met cElisa voor het opmeten van volledige progesteronprofielen, om zo de nauwkeurigheid en betrouwbaarheid van de sensor in bedrijfsomstandigheden te evalueren. Daarnaast willen we de huidige meettijd van 20 minuten per melkstaal reduceren door de bindingscurves te analyseren en te schudden tijdens de bindingsreacties. Bovendien onderzoeken we of meerdere stalen tegelijkertijd kunnen worden opgemeten, zodat deze sensor ook gebruikt kan worden bij conventionele melksystemen of bij meerdere melkrobots. Wanneer de geautomatiseerde metingen bovendien volledig kunnen worden geïntegreerd in een melkrobot, is de sensor klaar voor autonoom gebruik op een melkveebedrijf.

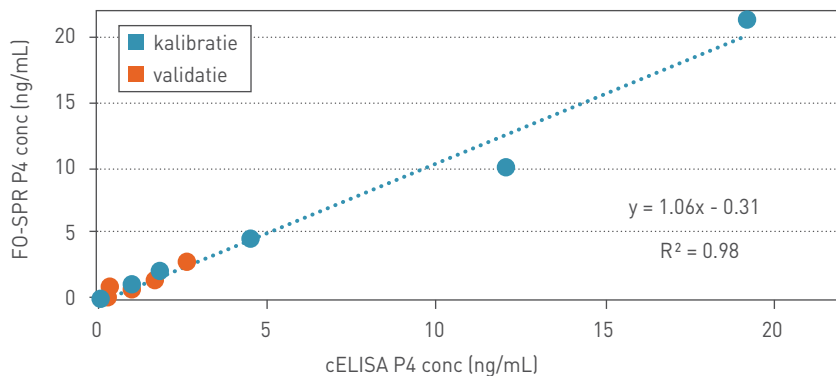
Een prototype van het FO-SPR-toestel zie je op de foto. Deze FO-SPR techniek kan overigens ook aangewend worden voor de detectie van andere moleculen die in lage concentraties aanwezig zijn in melk, zoals embryonaal DNA of PAG voor vroege drachtdetectie of voor de detectie van specifieke ziektepathogenen zoals *E. coli* en *S. aureus* bij mastitis.

FOx Diagnostics

Het onderzoek en de ontwikkeling evolueerden in de tussentijd dermate vlot dat de technologie geleid heeft tot het oprichten van een spin-offbedrijf, FOx



Prototype van het FO-SPR-onderzoekstoestel.



Figuur 3 Correlatie voor de analyse van progesteron (P_4) tussen melkstalen opgemeten met FO-SPR en cElisa - Bron: ILVO & KU Leuven

Diagnostics. Dit bedrijf wil zich profileren als een daadkrachtige uitdager van de Elisa-kits die als referentietechnologie fungeren voor de detectie van eiwitten en kleine moleculen zoals progesteron, en de *lateral flow*-technologie die onder andere gebruikt wordt in de Herd Navigator. Deze nieuwe technologie laat toe om met één platform zowel allerhande eiwitten als DNA-moleculen te detecteren. Vermits het FO-SPR-toestel kleiner, kostenefficiënter en minder gevoelig is voor omgevingsomstandigheden, lijkt het

een ideale manier om de robuustheid in bedrijfsomstandigheden te waarborgen. Bovendien zijn de metingen snel, geautomatiseerd en is er zeer weinig staalvoorbereiding nodig.

Veelbelovende techniek

FO-SPR is een veelbelovende techniek voor het opmeten van progesteron in melk. De labtesten toonden aan dat de nauwkeurigheid vergelijkbaar is met deze bekomen met Elisa, de 'gouden standaard' voor progesteronmeting in melk.

Omdat deze snelle analyse kan uitgevoerd worden met zeer weinig staalvoorbereiding, kan ze ook buiten het lab toegepast worden. Met behulp van het gemeten melkprogesteron kunnen de belangrijkste vruchtbaarheidskenmerken onderscheiden worden, zodat er een betrouwbare ondersteuning aan de boer kan worden gegeven. Deze techniek is een antwoord op de vraag naar een snelle, gebruiksvriendelijke, kostenefficiënte en betrouwbare sensor voor de opvolging van de vruchtbaarheid. ■

Aan dit artikel werkten mee: Devin Daems, Ines Adriaens, Tjebbe Huybrechts, Filip Delpont, Ben Aernouts, Wouter Saeyns, Jeroen Lammertyn.