

Nieuwe melkparameter voor een verbeterde opvolging van uiergezondheid bij melkkoeien

Differentiële somatische celtelling

Lieze COEMANS

Promotor: Prof. Dr. Ir. B. Aernouts

Co-promotor: Dr. Ir. I. Adriaens

Masterproef ingediend tot het behalen van de graad
van master of Science in de biowetenschappen:
land- en tuinbouwkunde, afstudeerrichting
plantaardige en dierlijke productie

Academiejaar 2019-2020

© Copyright KU Leuven

Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van zowel de promotor(en) als de auteur(s) is overnemen, kopiëren, gebruiken of realiseren van deze uitgave of gedeelten ervan verboden. Voor aanvragen i.v.m. het overnemen en/of gebruik en/of realisatie van gedeelten uit deze publicatie, kan u zich richten tot KU Leuven Campus Geel, Kleinhoefstraat 4, B-2440 Geel, +32 14 72 13 00 of via e-mail iiw.geel@kuleuven.be.

Voorafgaande schriftelijke toestemming van de promotor(en) is eveneens vereist voor het aanwenden van de in deze masterproef beschreven (originele) methoden, producten, schakelingen en programma's voor industrieel of commercieel nut en voor de inzending van deze publicatie ter deelname aan wetenschappelijke prijzen of wedstrijden.

Voorwoord

Graag wil ik enkele mensen bedanken die mij geholpen hebben dit werk tot een goed einde te brengen en die mij hebben gesteund gedurende mijn schoolloopbaan.

Ik wil mijn promotor Ben Aernouts en co-promotor Ines Adriaens bedanken om mij te inspireren en voor het aanrijken van interessante literatuur. Ook wil ik Ben Aernouts bedanken voor de feedback die hij gaf zodat ik mijn werk verder kon verbeteren. Ook zou ik graag Katleen Geerinckx, Lore D'Anvers en Helena Reyndams bedanken voor de hulp tijdens mijn onderzoeksproef aan de Hooibeeckhoeve.

Daarnaast zou ik mijn ouders en mijn zus willen bedanken om mij gedurende mijn studies te ondersteunen. Ten slotte wil ik nog een bijzonder woordje van dank richten aan mijn vriend.

Lieze Coemans,

Maart 2020

Samenvatting

Uiergezondheid is, samen met klauwgezondheid en vruchtbaarheid, de voornaamste reden tot afvoer van een melkkoe. Mastitis zorgt voor een verlaging van de nuttige componenten in de melk, en een verhoging van de ongewenste. Naast de financiële domper - mastitis zorgt voor een kost van gemiddeld 240 euro per aanwezige melkkoe per jaar - brengt een slechte uiergezondheid heel wat extra werk met zich mee. Ook is een slechte uiergezondheid niet altijd klinisch waar te nemen. Op cellulair niveau vinden er echter wel heel wat veranderingen plaats. De huidige methodes detecteren uierontsteking meestal pas als er al aanzienlijke schade is aangericht, daarom is er nood aan een nieuwe parameter. Het gedifferentieerd somatisch celgetal (DSCC) kan deze parameter zijn. Het spoort veranderingen in de gezondheidstoestand van de uier sneller op dan het totaal somatisch celgetal (SCC) en de analyse gebeurt aan hoge snelheid met grote betrouwbaarheid. Het gedifferentieerd celgetal splitst het somatisch celgetal op in neutrofielen en lymfocyten enerzijds en macrofagen anderzijds. De DSCC geeft het dus opgetelde percentage neutrofielen en lymfocyten weer in de melk. De proportie macrofagen kan berekend worden door de DSCC van 100 % af te trekken. Het detecteert aldus veranderingen in relatieve celpopulaties voordat het totale celgetal toeneemt. Een lage DSCC wil dus zeggen veel macrofagen, dewelke overheersen in gezond uierweefsel. Een stijging in DSCC staat voor een proportionele toename van het aantal neutrofielen en is dus een indicatie voor een infectie daar neutrofielen het overheersende celtype is tijdens de beginstadia van een infectie. Er bestaat een positieve correlatie tussen de DSCC en de SCC: er kan een lineair verband opgesteld worden tussen de DSCC en de logaritme van de SCC. Bij een lage SCC kunnen hoge of lage DSCC-waarden voorkomen. Dit wil zeggen dat er meerdere fasen van een infectie vertegenwoordigd worden. Als de SCC stijgt, zullen ook de bijbehorende DSCC-waarden stijgen. Dit wordt gestaafd door een Kruskal-Wallis test: des te hoger het celgetal stijgt, hoe hoger de gemiddelde DSCC-waarden worden. Verder kan er een threshold op de DSCC van 80 procent gezet worden. Als de DSCC hierboven stijgt, kan men dit als alarmsignaal voor nakende (sub)klinische mastitis aanschouwen. Zo lang de DSCC boven deze threshold blijft, kan er gesteld worden dat de infectie nog niet onder controle is en nog niet (volledig) bestreden is. Ook kan er dan sprake zijn van chronische mastitis. Daalt de DSCC echter weer en blijft deze onder de 80 procent, zal ook het celgetal dalen tot een normaal niveau en stabiliseren. Er werd geen sterke correlatie gevonden tussen de DSCC en andere parameters als het botervet, het lactosegehalte, het ureumgehalte of de pH. De DSCC varieert niet als gevolg van de pariteit: de DSCC van primipare koeien verschilt niet significant van deze van multipare koeien. De DSCC gedraagt zich wel anders afhankelijk van het aantal dagen in lactatie. Het gedifferentieerd celgetal volgt het patroon van een lactatiecurve: het stijgt lichtjes in het begin van de lactatie om af te nemen naar het einde van de lactatie toe. Het gemiddelde gedifferentieerd celgetal stijgt ook naargelang er een historiek is van infecties. Dieren die al vijf keer of meer een verhoogd celgetal vertoonden, hebben een significant hogere DSCC dan dieren waarbij er tot maximum vier keer eerder een verhoogd celgetal is gemeten.

Trefwoorden: gedifferentieerd somatisch celgetal; DSCC; uiergezondheid; mastitis; somatisch celgetal

Abstract

Udder health is, together with claw health and fertility, the main reason for culling of a dairy cow. Mastitis causes a reduction of the useful components in milk and an increase of the undesirable components. In addition to the financial loss - mastitis causes an annual mean cost of 240 euros per dairy cow on the farm - a bad udder health incurs a lot of extra labour. Moreover, a bad udder health is not always clinically visible. On the cellular level, however, a lot of changes occur. The current methods mostly detect intramammary infection when there is already substantial damage. Therefore, a new parameter is needed. The differential somatic cell count (DSCC) could possibly be this parameter. It detects changes in the health status of the udder faster than the total somatic cell count. Furthermore, the analysis can be performed at high speed with great reliability. The DSCC allows for the differentiation of the somatic cell count between two groups of cells: polymorphonuclear neutrophils and lymphocytes on the one side and macrophages at the other side. The DSCC reflects thus the percentage of polymorphonuclear neutrophils and lymphocytes in the milk. The proportion of macrophages can be calculated by subtracting the DSCC from 100 %. The DSCC discovers changes in relative cell populations before an increase in the total somatic cell count. A low DSCC means the presence of many macrophages, prevailing in healthy mammary glands. An increase in the DSCC signifies a proportional increase of the number of polymorphonuclear neutrophils and indicates an infection as neutrophils predominate in the early stages of infection. A positive correlation exists between the DSCC and the SCC: a linear trendline was found between the DSCC and the logarithm of the SCC. When the SCC is low, DSCC values can be high or low. This means that multiple stages of an infection are represented. If the SCC increases, the accompanying DSCC values will also increase. An Kruskal-Wallis test confirms this: the more the somatic cell count increases, the higher the mean DSCC values are. Furthermore, a threshold for the DSCC can be defined at 80 %. If the DSCC rises above the threshold, this can be considered as an alarm for impending (sub)clinical mastitis. As long as the DSCC stays higher than this threshold, the infection is not under control and not yet (fully) combated. Chronic mastitis can also be an option in case of permanently high DSCC values. If the DSCC however decreases again and stays under 80 %, the somatic cell count will also decrease to a normal level and stabilize. No strong correlation was found between the DSCC and other parameters as fat content, lactose content, urea content or the pH. The DSCC does not vary according to the parity: the DSCC of primiparous cows does not differ significantly of the DSCC of multiparous cows. The DSCC does act differently subject to the days in milk. The differential somatic cell count follows the pattern of a lactation curve with a slight increase at the beginning of the lactation and a decrease at the end of the lactation. The mean differential somatic cell count also increases as there is a history of infections. When five times or more an increased SCC is measured within the same cow, it has a significantly higher DSCC compared to animals with an increased SCC for a maximum of four times before.

Keywords: differential somatic cell count; DSCC; udder health; mastitis; somatic cell count

INHOUD

Voorwoord	i
Samenvatting	ii
Abstract	iii
Lijst met afkortingen	vii
1 Literatuurstudie	9
1.1 <i>Problematiek mastitis</i>	9
1.1.1 Mastitis.....	9
1.1.2 Verschijningsvormen	10
1.1.3 Effect mastitis op de melksamenstellingen	11
1.1.4 Economisch	12
1.1.5 Preventie.....	14
1.2 <i>Defensiemechanismen uier</i>	15
1.2.1 Huid	15
1.2.2 Verdediging tepelkanaal.....	16
1.2.3 Antimicrobiële omgeving melkklieren	16
1.2.4 Soorten leukocyten	20
1.2.5 Versterken van de specifieke immuniteit (vaccin).....	22
1.3 <i>Detectiemethodes</i>	23
1.3.1 Opsporing mastitis	23
1.3.2 CMT	24
1.3.3 Somatisch celgetal	25
1.3.4 Differentiële celtelling.....	26
2 Materiaal en methoden	33
2.1 <i>Probleemstelling en onderzoeksvragen</i>	33
2.2 <i>Verzamelen van data</i>	33
2.2.1 Onderzoekspreef.....	34
2.2.2 Historische dataset.....	38
2.2.3 Klinische mastitis dataset	38
2.3 <i>Dataverwerking</i>	39
2.3.1 Matlab.....	39
2.3.2 Excel	40

3	Resultaten	41
3.1	<i>Geïsoleerde pathogenen uit bacteriologisch onderzoek</i>	41
3.2	<i>Statistische kengetallen</i>	42
3.3	<i>Relatie DSCC-SCC</i>	44
3.3.1	Correlatie	44
3.3.2	Relatie.....	45
3.3.3	Variatie DSCC.....	47
3.4	<i>Correlatie DSCC andere parameters</i>	53
3.4.1	Variatie lactosegehalte, vetgehalte en melkproductie	54
3.5	<i>Kruskal-Wallis testen</i>	56
3.5.1	Variatie DSCC naargelang de pariteit.....	57
3.5.2	Variatie DSCC naargelang het aantal dagen in lactatie	57
3.5.3	Variatie DSCC naargelang historiek eerdere infecties	59
4	Discussie	61
5	Besluit	63
	Referenties	64

Lijst met afkortingen

AB	Antibiotica
CMT	California mastitis test
CNS	Coagulase negatieve stafylokokken
CRV	Coöperatieve Rundveeverbetering
DIL	Dagen in lactatie
DSCC	Gedifferentieerd somatisch celgetal
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
MCC	Melkcontrolecentrum
MLD	Milk leucocyte differential
LDH	lactaatdehydrogenase
OCC	Online cell count
PMN	Polymorfonucleaire neutrofiele leukocyten
SCC	Somatic cell count

1 LITERATUURSTUDIE

1.1 Problematiek mastitis

1.1.1 Mastitis

Mastitis is een ontsteking van het uierweefsel die kan worden veroorzaakt door verschillende micro-organismen, zoals schimmels, gisten, algen en virussen, maar bacteriën blijven de belangrijkste ziekteverwekkers. De intramammaire ontsteking kan verschillende intensiteiten aannemen en resulteert in een breed scala aan consequenties (Alnakip et al., 2014). Meer dan honderd verschillende micro-organismen zijn in staat om intramammaire infecties te veroorzaken, waarvan vooral *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. en coliforme bacteriën de grootste economische verliezen genereren (Verschelde, 2013).

De mastitispathogenen worden onderverdeeld in twee groepen, afhankelijk van het virulentiepotentieel en de mogelijke impact op de uiergezondheid: de major- en minorpathogenen (Verschelde, 2013). De majorpathogenen, zoals *Staphylococcus aureus*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae* en de coliformen zijn schadelijker en virulenter dan de minorpathogenen. Deze laatste groep veroorzaakt meestal een mildere ontsteking en omvat onder andere *Corynebacterium* spp. en de coagulase-negatieve *staphylococci* (CNS) (Reyher et al., 2012; Biebaut, 2018). Gegevens van een Duits onderzoek (Schwarz et al., 2010) toonden aan dat in 83 procent van de gevallen mastitispathogenen gedetecteerd werden als het celgetal hoger was dan 100 000 cellen per milliliter.

Het werk van Blowey en Edmondson in 2010 stelt dat er drie categorieën van mastitis zijn: mild, ernstig en dodelijk. Een milde vorm zal de melkveehouder zelf behandelen en bij een ernstige vorm komt er een veearts aan te pas. Voor koeien met een celgetal lager dan 200 000 cellen per milliliter, neemt men aan dat er geen verlies geleden wordt. Elke 100 000 hoger dan dit referentiegetal, leidt tot een daling van 2,5% in melkgift.

Een andere manier van onderverdelen is het onderscheid maken tussen koegebonden pathogenen en omgevingspathogenen (Verbeke, Piepers, Supré, & De Vlieghe, 2014). De voornaamste koegebonden pathogenen zijn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae* en CNS. De meest voorkomende omgevingspathogenen zijn *Streptococcus uberis* en *Escherichia coli* (Blowey & Edmondson, 2010; Halasa, 2012). *S. uberis* is hoofdzakelijk een omgevingspathogeen, maar als omstandigheden of co-factoren infecties bevorderen, kan hij zich gedragen als een diergerelateerd, besmettelijk mastitispathogeen en zich zo verspreiden (Hogeveen & Lam, 2012). De studie van Verbeke et al. (2014) suggereert dat mastitis voornamelijk veroorzaakt wordt door omgevingspathogenen. De preventie van de infecties veroorzaakt door omgevingspathogenen is gecompliceerder dan degene die overgedragen worden van koe naar koe. Het management van het beheersen van omgevingspathogenen is vaak bedrijfsspecifiek, diepgaander en vraagt een intensievere opvolging dan koegebonden pathogenen (Hogeveen & Lam, 2012). Een cruciaal element in het beheersen van mastitis veroorzaakt door omgevingspathogenen is het vermijden dat de spenen van de uier in contact komen met mest en ander organisch materiaal (Verbeke et al., 2014). Schreiner en Ruegg ontwikkelden in 2003 een vierpuntenschaal om de uierhygiëne te beoordelen en vonden dat

koeien met een hogere score (en dus vuilere uiers) een hogere SCC hadden en vaker subklinische mastitis hadden. Breen, Green en Bradley (2009) bevestigden dit en stelden bijkomend dat koeien met een hogere score een hogere kans hadden op een *E. coli*-infectie. Besmettelijke, koegebonden pathogenen worden overgedragen van koe naar koe tijdens het melken. De spenen en de uier fungeren als een reservoir van pathogenen die vooral subklinische mastitis veroorzaken. De spenen dippen na het melken, een goede melkhygiëne en het droogstandsmanagement zijn de belangrijkste preventiemaatregelen (Blowey & Edmondson, 2010).

1.1.2 Verschijningsvormen

Mastitis kan een klinische en een subklinische vorm aannemen. Subklinisch wil zeggen zonder uitwendige, zichtbare symptomen (Blowey & Edmondson, 2010). Bij een klinische ontsteking zijn er lokale of systemische symptomen zichtbaar (Vanden Bosch, 2014).

1.1.2.1 Klinisch

Klinische mastitis wordt meestal veroorzaakt door majorpathogenen die gedurende een langere tijd in de uier aanwezig blijven en vaak een uitgebreide behandeling vragen. Ze veroorzaken een behoorlijke schade aan de uier, gepaard gaande met een aanzienlijke ontsteking en een sterke toename van het somatisch celgetal in de melk (Reyher et al., 2012). Ongeveer de helft van de klinische uierontstekingen doet zich voor binnen de eerste honderd dagen na het afkalven en veroorzaakt een plotse daling in melkproductie (De Hertogh, 2014; De Schutter, 2015). De bacteriën *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, en coliformen zijn de voornaamste veroorzakers van klinische mastitis (Alnakip et al., 2014). Minorpathogenen als *Corynebacterium* spp. en de CNS geven aanleiding tot mildere gevallen van klinische mastitis en doen het celgetal matig stijgen (Verschelde, 2013). Klinische mastitis gaat gepaard met roodheid, zwelling en warm aanvoelen van het geïnfecteerde kwartier (Rees, Fischer-Tenhagen & Heuwieser, 2017). De ziekte veroorzaakt dus vaak pijnlijk ongemak voor het dier. Bovendien zijn er zichtbare veranderingen in de melk, waaronder sporen van bloed (Østerås & Sølverød, 2009). MCC Vlaanderen rapporteerde dat *E. coli* en *S. uberis* de meest geïsoleerde pathogenen waren uit monsters gediagnosticeerd met klinische mastitis, respectievelijk 21,6 % en 19,0 % (MCC Vlaanderen, 2017).

1.1.2.2 Subklinisch

Over het algemeen wordt subklinische mastitis gedefinieerd als een uierontsteking zonder klinische symptomen met een verhoogd celgetal en wordt deze vorm gekenmerkt door een stapsgewijs verminderde melkproductie, een veranderde samenstelling ervan en de aanwezigheid van bacteriën erin (Verschelde, 2013; De Schutter, 2015). Subklinisch wil zeggen zonder symptomen en Schwarz et al. (2010) stellen aldus dat 70 tot 80 procent van de financiële verliezen in de melkveehouderij veroorzaakt worden door subklinische mastitis. De uier en de melk lijken normaal, maar de geïnfecteerde dieren fungeren als een reservoir voor bacteriën, wat resulteert in een onmerkbare verspreiding van mastitis (Damm et al., 2017). Net als klinische mastitis kan de subklinische vorm pijnlijk zijn voor de koe (Østerås & Sølverød, 2009). Een studie stelt dat subklinische mastitis in de eerste 60 dagen van de lactatie grotere gevolgen kan hebben dan klinische. De studie toont aan dat koeien die getroffen zijn door subklinische mastitis 15 dagen langer open zijn (dus niet drachtig) en meer dan € 1500 aan verliezen lijden door een verlaagde melkgift (Kirkpatrick & Olson, 2015).

Bacteriologisch onderzoek op 13 989 kwartiermelkmonsters zonder klinische afwijkingen wees uit dat subklinische mastitis vooral veroorzaakt wordt door de minorpathogene *Staphylococcus* spp. (34,2 %). De meest prevalentie majorpathogenen zijn *Streptococcus uberis* en *Staphylococcus aureus* met respectievelijk 13,7 % en 13,1 % (MCC Vlaanderen, 2017). Als minorpathogeen volgt na de CNS (oftewel *Staphylococcus* spp.) *Corynebacterium* spp. met 13,9 %. CNS veroorzaken een verminderde melkproductie en een significant verhoogd celgetal, terwijl *Corynebacterium* spp. een gematigde toename van SCC veroorzaakt en slechts een minimaal tot geen productieverlies (Reyher et al., 2012). Andere mastitispathogenen die subklinische mastitis veroorzaken, zijn *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Pasteurella* spp., *Listeria* spp., *Leptospira* spp., *Yersinia* spp., *Enterobacter* spp., *Brucella* spp. en *Mycobacterium* spp. (Alnakip et al., 2014).

1.1.2.3 Chronisch

Als de uier niet volledig geneest van een klinische of subklinische mastitis, ontstaat er chronische mastitis. Het celgetal van de melk is dan constant hoog. Er ontstaat een soort van evenwicht tussen de afweer van de koe en de bacteriële groei, maar af en toe nemen de pathogene bacteriën de overhand en ontwikkelt zich een opflakking van klinische mastitis (Viguiet et al., 2009). Wanneer een koe herhaaldelijk hervalt, spreekt men ook van chronische mastitis (Vanden Bosch, 2014). Het is weinig waarschijnlijk dat chronische mastitis nog geneest en meestal zijn meerdere kwartieren geïnfecteerd en/of permanent beschadigd (Petzer et al., 2013; Vanden Bosch, 2014).

1.1.3 Effect mastitis op de melksamenstellingen

Mastitis zorgt voor een verlaging van de nuttige componenten in de melk. Lactose- en caseïneconcentraties kunnen tot wel 20% dalen en het botervet tot 12%. Daarentegen zullen de concentraties ongewenste elementen toenemen. Plasmine en lipase, die caseïne en vet afbreken, zullen in grotere mate aanwezig zijn en ook het natriumgehalte, dat zorgt voor de bittere smaak, neemt toe (Blowey & Edmondson, 2010). Het effect van mastitis op het eiwitgehalte is controversieel, maar het is duidelijk dat er veranderingen optreden in het eiwitprofiel (Bobbo, Cipolat-Gotet, Bittante, & Cecchinato, 2016). De ontsteking verkort de houdbaarheid van de melk en bemoeilijkt de verwerking ervan voor de kaasmakerij (Østerås & Sølverød, 2009). De melkcoagulatie verloopt trager, de wrongelconsistentie is zwakker en de kaasopbrengsten zijn lager na verwerking van melk met een hoog celgetal (Bobbo et al., 2017).

Er is geen verschil waargenomen in veranderingen van de melk tussen de soorten pathogenen (besmettelijke pathogenen, omgevingspathogenen ...) wat wijst op een nadelig effect van de ontsteking en niet van de infectie zelf. Het caseïnegetal, de verhouding caseïne/totaal eiwit, daalt wel licht (1%) maar varieert het minst, wat wil zeggen dat samen met de caseïne het eiwitgehalte nagenoeg recht evenredig daalt. Melk met hoge aantallen neutrofielen (zie 2.4.2) hebben dus een lager caseïnegetal dan melk met een laag neutrofielgehalte (Wickström, Persson-Waller, Lindmark-Månsson, Östensson, & Sternesjö, 2009). Er werd geen verandering in wei-eiwitten teruggevonden (Bobbo et al., 2017). De degradatie van het caseïnegehalte is te wijten aan een toegenomen plasmine- en proteïnase-gemedieerde afbraak. Tijdens de afbraak van caseïne komen proteosepeptonen vrij die de stollingstijd, de stevigheid van de wrongel en de vorming van de wrongel negatief beïnvloeden. Er is ook verlies van caseïne in de wei doordat het in kleine fragmenten afgebroken wordt door plasmine

en hierdoor niet meer normaal kan vouwen (Verschelde, 2013). Het lactosegehalte daalt door een verminderde biosynthese tijdens de ontsteking, maar ook doordat de membraanpermeabiliteit toeneemt en lactose simpelweg uit de melk kan lekken. Lactosegehalten kunnen aldus eveneens gebruikt worden om de uiergezondheid te controleren. Naarmate het lactosegehalte daalt, nemen de concentraties van bepaalde mineralen (natrium en chloor) toe om het osmotisch evenwicht te handhaven (Bobbo et al., 2016).

Melkmonsters van kwartieren met subklinische mastitis hadden een aanzienlijk hogere pH dan melk afkomstig van gezonde kwartieren (6,69 versus 6,59; $p < 0,01$). De pH van de melk neemt toe als gevolg van de afbraak van caseïne en de verandering in ionische omgeving. Een verhoogde pH in combinatie met een hogere SCC heeft een negatieve invloed op de activiteit van stremmingsgerelateerde enzymen. Kaas gemaakt van mastitische melk vertoont ook een verzwakte verzuring wat leidt tot een groter verlies van voedingsstoffen in de wei (Bobbo et al., 2016). Als kaas gemaakt wordt van melk met een celgetal hoger dan 800 000 cellen/ml, is de kans groter dat er een afwijking is op textuur en smaak (Verschelde, 2013).

Een te laag celgetal in de melk kan dan ook weer nadelig zijn. Melk met een celgetal lager dan 38 000 cellen/ml coaguleert langzamer, heeft een lagere wrongelhardheid en de kaas gemaakt van deze melk bevat minder vet en energie. Melk met een zeer laag celgetal heeft een lagere pH dan melk met een iets hoger celgetal (die toch afkomstig is van een gezonde uier). Dit is te verklaren door het feit dat die melk (met een zeer lage SCC) een lager caseïnegetal en een lagere lactose-inhoud bevat (Bobbo et al., 2016).

1.1.4 Economisch

Mastitis oefent een aanzienlijk effect uit op de bedrijfseconomische resultaten (van Soest et al., 2016). In een Canadese studie was de prevalentie van mastitis bij pas afgekalfde koeien 34 procent (Vanden Bosch, 2014). De intramammaire ontsteking zorgt voor twee soorten kosten: de faalkosten (opgesplitst in directe en indirecte kosten) en de preventieve kosten. Hoge preventieve kosten leiden meestal tot lage faalkosten en vice versa. De preventieve kosten bestaan uit de beheersmaatregelen die mastitis trachten te voorkomen (van Soest et al., 2016). De directe faalkosten vertegenwoordigen de niet-geproduceerde melk, de grotere hoeveelheid dumpmelk die niet in de tank terecht komt en dus niet zorgt voor opbrengsten en de kosten voor medicatie en veearts. De indirecte faalkosten zijn de kortingen opgelegd door de melkverwerker als gevolg van strafpunten voor een verhoogd celgetal (66 procent van de strafpunten opgelegd in 2018 zijn te wijten aan celgetalproblemen (M-team, 2019)), de verlaagde melkproductie in een latere fase van de lactatie door beschadiging van het uierweefsel of als gevolg van een infectie, de extra werkuren die gestoken worden in de behandeling van zieke dieren, hogere opruim- en vervangkosten van geïnfecteerde dieren en dus een verlies van genetische opportuniteiten en in het ergste scenario het overlijden van het dier. Nog een ander probleem dat de behandeling van mastitis met zich meebrengt, is het risico op antibioticaresidu's in de tankmelk (Blowey & Edmondson, 2010). Vooral de beheersing van subklinische mastitis kan leiden tot een grote economische winst voor de melkveehouder (Damm et al., 2017).

Sinds het melkquotum in 2015 is weggefallen, is de economische winst van een koe die één kilo extra melk geeft gelijk aan de melkprijs. Als deze koe echter één kilo extra melk geeft die niet verkocht kan worden, denk dan bijvoorbeeld aan antibioticamelk, zal de landbouwer de melkprijs voor één kilo melk mislopen, bovendien kost dit hem de prijs van het krachtvoer om

die liter melk te kunnen produceren. Wanneer deze koe één kilo minder melk produceert, is dit gelijk aan een economisch verlies ter grootte van de productiekost (van Soest et al., 2016). De incidentie klinische mastitis bedraagt volgens van Soest et al. (2016) tussen 0,31 en 0,38 per melkgevende koe per jaar. Diezelfde bron schat de gemiddelde totale kosten van (zowel klinische als subklinische) mastitis op € 240 per melkgevende koe per jaar (met een variatie tussen € 120 en € 438 per melkgevende koe per jaar), waarbij de faalkosten € 120 euro per melkgevende koe per jaar bedragen en de preventieve kosten eveneens € 120 per melkgevende koe per jaar bedragen. Wat betreft de faalkosten zijn de drie grootste verliezen afkomstig van productieverliezen, dumpmelk en opruiming voor respectievelijk € 32, € 20 en € 20 per melkgevende koe per jaar en daarnaast nog enkele kleinere kosten. Voor de preventieve kosten bedragen de loonkosten het hoogst (€ 82), gevolgd door de nodige materialen (€ 34) en de investeringen (€ 4: afschrijvingskosten van materialen plus rente). Er werd aangenomen dat 80 procent van alle dieren gediagnosticeerd met klinische mastitis behandeld werden met antibiotica en dat de melk gedurende zes dagen weggegooid moest worden. Gemiddeld moest in 5 procent van de gevallen veterinaire hulp gevraagd worden en 15 procent van alle melkkoeien werden geruimd ten gevolge van mastitis. De preventieve maatregelen worden geclusterd in vier categorieën: een schone en droge stalomgeving, een juiste melkprocedure, regelmatig onderhoud en correct gebruik van de melkapparatuur en het droogstandsmanagement (van Soest et al., 2016).

In tabel 1 zijn de resultaten weergegeven van een onderzoek dat gevoerd is op 108 Duitse melkveebedrijven. De verliezen als gevolg van subklinische mastitis zijn bepaald als het verschil van de gerealiseerde productie en de potentiële productie. De verliezen toegeschreven aan klinische mastitis werden berekend als een vast percentage van de gemiddelde melkproductie per koe voor elk specifiek bedrijf. De incidentie klinische mastitis ligt op ongeveer 25 procent met een bijbehorend productieverlies van gemiddeld 336 kg melk per melkgevende koe per jaar. Opvallend is het verschil in productieverlies als gevolg van subklinische mastitis. De mediaan en het gemiddelde verschillen sterk (81 versus 107), wat er op kan wijzen dat als er verliezen zijn veroorzaakt door subklinische mastitis op een bedrijf, dit hoog kan oplopen (tot 262 kg/melkgevende koe/jaar) in vergelijking met het gemiddelde (van Soest et al., 2016).

Tabel 1-1: Resultaten onderzoek op 108 Duitse melkveebedrijven (van Soest et al., 2016)

	Gemiddelde	Mediaan	Minimum	Maximum
Aantal lacterende koeien	86	80	50	325
Productieverlies als gevolg van subklinische mastitis (kg/melkgevende koe/jaar)	107	81	7	262
Productieverlies als gevolg van klinische mastitis (kg/melkgevende koe/jaar)	336	338	202	422
Incidentie klinische mastitis (%/jaar)	27	25	2	82
Celgetal ($\times 10^3$ cellen/ml)	192	81	73	378

Het is aangetoond dat een verhoogde SCC in het begin van de lactatie leidt tot productieverliezen en een hoger risico op klinische en subklinische mastitis later in de lactatie. Ook zal dit leiden tot extra kosten voor veearts en medicatie, verliezen door dumpmelk en extra arbeid (Huijps et al., 2009).

1.1.5 Preventie

De afgelopen jaren is er veel onderzoek gedaan naar mastitis en de manieren waarop de ziekte onder controle kan worden gehouden. Al in 1960 werden vijf aandachtspunten opgesteld oftewel het vijfpuntenplan dat beschrijft hoe mastitis efficiënt voorkomen en bestreden kan worden: (Blowey & Edmondson, 2010; Ruegg, 2017).

1. Behandeling en registratie van alle klinische gevallen
2. Dippen van de spenen na elke melkbeurt
3. Droogzetten op het einde van de lactatie
4. Opruimen van chronische gevallen
5. Onderhoud van de melkinstallatie op regelmatige tijdstippen

Per jaar wordt een derde van de melkkoeien getroffen door mastitis. Er zijn dus nieuwe technieken nodig om mastitis onder controle te houden. Deze nieuwe technieken moeten de natuurlijke weerstand van de koe tegen infecties verhogen. Er is onderzoek bezig naar een mastitisvaccin (zie 1.2.5 Versterken van de specifieke immuniteit (vaccin)), maar momenteel wordt de aandoening vooral vermeden door een goede melkhygiëne, een verlaagde blootstelling aan omgevingspathogenen en antibioticabehandeling in de droogstand (Sordillo et al., 1997).

Goede hygiëne is een cruciaal element bij het beheersen van mastitis. Het belangrijkste overlevingsreservoir van *S. aureus* is de geïnfecteerde uier. Een studie onthulde echter dat *S. aureus* ook de speenhuid, vagina, snuit en andere lichaamsdelen van de koe evenals ligboxen, voeder, de lucht en materiaal aanwezig in de stal koloniseert (De Vliegheer et al., 2012). Niet verrassend is dat een slechte hygiëne in de afkalfbox geassocieerd wordt met een hogere prevalentie mastitis. Dit wordt veroorzaakt door een infectie met een omgevingspathogeen kort na de kalving. Een grote vliegenpopulatie, met name hoornvliegen, geeft aanleiding tot een hoger besmettingspercentage met diergebonden pathogenen. Een goede vliegencontrole zal het aantal mastitisgevallen doen dalen. (De Vliegheer, Fox, Piepers, McDougall, & Barkema, 2012)

De melktechniek heeft ook een invloed op de ontwikkeling van mastitis. Vacuümfluctuaties en de melkduur moeten geminimaliseerd worden om het risico op nieuwe infecties te verminderen. Anderzijds is een te lage melksnelheid ook niet goed want dan duurt het melkproces te lang. Dit zorgt dan weer voor extra belasting en beschadiging van het speenweefsel wat het risico op uierinfecties ook verhoogt (Ruegg, 2017).

Een studie (Pankey et al., 1984) stelt dat het dippen van de spenen na het melken de meest effectieve preventiemaatregel is tegen mastitis tijdens de lactatie, maar waarschuwde dat het niet altijd even effectief is tegen coliformen en enkele streptokokken. Østerås en Sølverød (2009) onderzochten 164 kuddes en vonden inderdaad dat het dippen van de spenen na het melken zorgt voor significant minder *S. aureus*-infecties, maar het aantal *S. dysgalactiae*-infecties bleef wel ongewijzigd. De Vliegheer et al. (2012) vonden dat speendesinfectie van vaarzen voor het kalven geassocieerd wordt met een lager risico op kalven met een intramammaire infectie veroorzaakt door omgevingspathogenen.

Murphy et al. (1944) merkten verschillen op in de mate van voorkomen van mastitis tussen verschillende koefamilies met een vergelijkbare productie op eenzelfde bedrijf. Ze stelden dat genetische verschillen zouden kunnen bijdragen aan de gevoeligheid voor de ontwikkeling van mastitis. Selectie op mastitisresistentie werd aangemoedigd omdat een toename in productie genetisch leidde tot een verhoogde gevoeligheid voor mastitis (Shook & Schutz, 1994). Een

tekort aan selenium en vitamine E verhoogt de incidentie en de duur van klinische en subklinische mastitis. Deze voedingsstoffen spelen namelijk een essentiële rol in het handhaven van de neutrofielfunctie. (Ruegg, 2012).

De gegenereerde resultaten van de nieuwe parameter kunnen worden gebruikt om een indicatie te geven van de ernst van de infectie. Gepaste maatregelen kunnen worden getroffen in het kader van mastitisbeheersingsprogramma's als: het (beter) spoelen van de melkklauw na het melken van geïnfecteerde koeien, een afzonderlijke melkklauw gebruiken voor het melken van deze dieren om infectie van dier naar dier te voorkomen, beslissingen nemen inzake selectie en ruiming... (Holm, 2010).

1.2 Defensiemechanismen uier

De defensiemechanismen van de uier bestaan volgens Sordillo et al. (1997) uit twee categorieën: de aangeboren of niet-specifieke immuniteit en de verworven of specifieke immuniteit. Alnakip et al. (2014) stellen dat deze twee samenwerken om een optimale afweer tegen infecties te bieden. De aangeboren immuniteit overheerst tijdens de eerste fasen van de infectie en bestaat uit snelle responsen die snel geactiveerd worden (Sordillo et al., 1997). De eerste specifieke afweer staat in voor de algemene weerstand en vormt een barrière voor de buitenwereld. Het gaat hier om de huid van de uier en de keratine in het tepelkanaal (Sordillo et al., 1997). Het tweede deel van de aangeboren immuniteit bestaat uit de antimicrobiële omgeving van de melkklieren. Deze defensie tegen pathogenen die de fysische barrière van het tepelkanaal overwonnen hebben, handelt vóór de specifieke immuniteit in werking treedt (Alnakip et al., 2014). De reacties worden gemedieerd door de fysische barrière van de uier, door macrofagen en neutrofielen en door verschillende signaaltransductiecascade die acuut regulatie van aangeboren immuuncomponenten, zoals leukocyten, cytokines en adhesiemoleculen triggeren (Sordillo et al., 1997; Alnakip et al., 2014). De verworven immuniteit reageert snel en robuust op bedreigingen waaraan al eerder blootgesteld geweest is, maar traag op nieuwe bedreigingen (Alnakip et al., 2014). Het herkent specifieke determinanten van een pathogeen, gemedieerd door antilichamen, macrofagen en verschillende lymfoïde populaties. Door het "geheugen" van de lymfocyten kunnen specifieke immuunreacties vergroot worden door herhaaldelijke blootstelling aan een pathogeen (Sordillo et al., 1997).

1.2.1 Huid

De intacte huid van de uier vormt een eerste vijandige omgeving voor bacteriële vermenigvuldiging. Bacteriën als *Streptococcus dysgalactiae* en *Staphylococcus aureus*, kunnen zich vestigen en vermenigvuldigen in beschadigingen van de huid als scheurtjes, kloven en wondjes. Hierdoor creëren ze als het ware een reservoir voor mastitisinfecties (Blowey & Edmondson, 2010). Tepelverwondingen en subklinische mastitis zijn significant gecorreleerd: subklinische mastitis komt 1,75 keer meer voor bij verwonde kwartieren dan bij ongeschonden kwartieren. Een koe met een tepelverwonding heeft 50 procent meer kans om mastitis te ontwikkelen in de volgende tien maanden (Vanden Bosch, 2014). Droge huid op de tepels kan niet enkel als bron van infecties beschouwd worden, maar het vermindert ook de stroomsnelheid van de melk. Een aangepaste, verzachtende tepeldip na het melken kan een intacte speenhuid in stand houden (Blowey & Edmondson, 2010).

1.2.2 Verdediging tepelkanaal

Mastitis ontstaat wanneer bacteriën via het tepelkanaal in de uier dringen, op zoek naar een warme, vochtige en voedzame omgeving die ideaal is voor groei en vermeerdering (Alnakip et al., 2014). De koe heeft twee zeer effectieve verdedigingsmechanismen ontwikkeld om het risico op een intramammaire infectie tot een minimum te herleiden (Blowey & Edmondson, 2010). Het tepelkanaal vormt een allereerste defensie tegen binnenvallende pathogenen, de antimicrobiële omgeving van de melkklieren een tweede. Het uiteinde van de speen is voorzien van sluitspieren die ervoor zorgen dat het tepelkanaal tussen twee melkbeurten goed gesloten is en de penetratie van pathogene bacteriën bemoeilijken (Sordillo et al., 1997). De rozet van Fürstenberg, een ring van lymfocyten gelegen aan de bovenkant van het tepelkanaal, detecteert pathogenen en initieert een immuunrespons (Blowey & Edmondson, 2010). Hoe groter de diameter van het tepelkanaal, hoe groter het risico op mastitis. De mucosa van het tepelkanaal scheidt bacteriostatische stoffen af waaronder vetzuren, zoals myristinezuur, palmitoleïnezuur en linolzuur (Verschelde, 2013).

Het tepelkanaal is bekleed met keratine, een wasachtige stof die geproduceerd is door gelaagd plaveiselepitheel (Alnakip et al., 2014). Keratine speelt een cruciale rol in de barrièrefunctie van het tepelkanaal. Het wasachtig laagje 'vangt' de binnenvallende bacteriën en verhindert zo hun migratie naar de melkboezem (Sordillo et al., 1997). Bij de volgende melkbeurt worden de bacteriën samen met de keratine weggespoeld (Blowey & Edmondson, 2010). Keratine bevat bacteriostatische vetzuren (zowel verzadigd als onverzadigd) die de groei van bacteriële pathogenen vertragen. De kationische eiwitten die aanwezig zijn in het tepelkanaal kunnen elektrostatisch binden aan mastitispathogenen zoals *Staphylococcus aureus* en *S. agalactiae* (Alnakip et al., 2014). Die binding zorgt voor een wijziging in de bacteriële celwand waardoor ze gevoeliger worden voor osmotische druk. Als de osmolariteit niet in stand kan worden gehouden, ontstaat lyse. Dit kan leiden tot de dood van de pathogene cel (Sordillo et al., 1997). Tijdens het melken wordt de keratine samen met de melk verwijderd uit het speenkanaal. Vermits de sluitspieren dertig minuten tot twee uur nodig hebben om volledig te terug samen te trekken, kunnen pathogenen gedurende dilatatie het tepelkanaal binnendringen en de keratine beschadigen (Alnakip et al., 2014; Blowey & Edmondson, 2010). Om deze reden mogen voetbaden, geplaatst in de terugloopgang na het melken, niet te diep zijn om opspatten van bacterieel besmette vloeistof op de open tepeluiteinden te vermijden (Blowey & Edmondson, 2010).

1.2.3 Antimicrobiële omgeving melkklieren

Pathogenen die in staat zijn de barrières van het tepelkanaal te overleven, moeten nog een volgende moeilijkheid overwinnen om uiteindelijk een ziekte te veroorzaken, namelijk de antimicrobiële omgeving in de melkklieren. In de uier zijn er verschillende, zeer effectieve systemen die helpen met het verwijderen of uitschakelen van de pathogenen. Die systemen kunnen onderverdeeld worden in twee categorieën: de intrinsieke defensiemechanismen, die continu aanwezig zijn in de uier en de induceerbare, die in werking treden als reactie op een bacteriële invasie (Blowey & Edmondson, 2010).

1.2.3.1 Intrinsieke defensiemechanismen

Lactoferrine

Tijdens de droogstand is de kans op een nieuwe infectie door *E. coli* vier keer groter dan tijdens de lactatie. De aanwezigheid van lactoferrine zorgt er echter voor dat nieuwe gevallen van klinische *E. coli*-mastitis tijdens de droogstand zeer zeldzaam zijn. Lactoferrine bindt namelijk het ijzer in de uier en remt zo de bacteriële groei van *E. coli* en andere coliformen en stafylokokken (Blowey & Edmondson, 2010; De Schutter, 2015). Tijdens de droogstand bouwt het gehalte lactoferrine in de uier op en is 18 dagen na het droogzetten maximaal (Hurley, 1988). Lactoferrine kan ook helpen bij de regulatie van macrofagen, lymfocyten en neutrofielen. Lactoferrine en IgG₁ werken synergetisch om de groei van *E. coli* en *Klebsiella pneumoniae* te remmen. In gezond uierweefsel is het gehalte lactoferrine laag en stijgt het tijdens de infectie. Tegen sommige organismen, zoals *S. agalactiae*, heeft lactoferrine nauwelijks een bacteriostatische werking. Zij gebruiken lactoferrine namelijk als ijzerbron door het te binden aan hun oppervlaktereceptoren (Sordillo et al., 1997).

Lactoperoxidase

Melk bevat van nature het enzym lactoperoxidase, dat de groei van gram-positieve bacteriën remt en gram-negatieve bacteriën doodt in aanwezigheid van thiocynaat en waterstofperoxide. Het gehalte aan thiocynaat in de melk varieert naargelang het rantsoen en is beduidend hoger als het rantsoen peulvruchten en Brassicas (koolgewassen) bevat. Waterstofperoxide wordt zowel door gram-negatieve als gram-positieve bacteriën zelf geproduceerd, waardoor het lactoperoxidasesysteem waarschijnlijk niet belangrijk is voor het beheersen van bacteriepopulaties (Blowey & Edmondson, 2010).

Cytokines

Cytokines omvatten een heterogene groep eiwitten die onder uiteenlopende omstandigheden geproduceerd worden door zowel immuun- als niet-immuuncellen. Ze spelen een belangrijke rol in het afweersysteem door de activiteit van cellen die deelnemen aan de specifieke en niet-specifieke immuniteit te reguleren. De regulatie is zeer complex en cytokines kunnen onderling een synergistische of net antagonistische relatie aangaan. Ze werken in extreem lage gehalten omdat ze zo een sterk effect kunnen teweegbrengen dat een verhoogde concentratie al snel schadelijk kan zijn voor de gastheer zelf (Sordillo et al., 1997).

Complementsysteem

Deze verzameling van eiwitten, complement genaamd, veroorzaken, als ze samenwerken, een cascade-effect waardoor bepaalde stammen gram-negatieve bacteriën gedood worden. Zo bestaan er serumgevoelige bacteriën, zoals *E. coli*, die gedood worden door deze eiwitten en serumresistente stammen (Blowey & Edmondson, 2010). Het complementsysteem is aanwezig in serum en melk, met hoge concentraties in colostrum en ontstoken melkklieren en lage concentraties tijdens de lactatie. Het doden van pathogenen gebeurt door het samenwerken met specifieke antilichamen waardoor lyse van de bacterie veroorzaakt wordt (Sordillo et al., 1997).

Immunoglobulines

De rol van specifieke antilichamen tegen mastitisbacteriën is niet geheel duidelijk, maar waarschijnlijk is hun hoofdfunctie het bekleden van bacteriën waarna ze gefagocyteerd worden door witte bloedcellen en macrofagen (opsonisatie). De opsonisatie zorgt voor een "herkenningspunt" waardoor ze sneller opgenomen worden door fagocyterende leukocyten

(Blowey & Edmondson, 2010). Er zijn vier klassen immunoglobulinen gekend die in het uierweefsel aanwezig zijn en een rol spelen tegen mastitis: IgA, IgG₁, IgG₂ (belangrijk bij de opsonisatie) en IgM. Ze verschillen elk in fysicochemische en biologische eigenschappen en de concentratie ervan varieert met de fase van lactatie en de ernst van de infectie (Sordillo et al., 1997). IgG₁ is het primaire isotype van gezond uierweefsel postpartum en bereikt een piek tijdens de colostrogenese. Hierdoor daalt de IgG₁-concentratie in het bloed (Pellegrino, Giraud, Raspanti, Odierno, & Bogni, 2010).

Het is niet erg waarschijnlijk dat immunoglobulines een primaire rol spelen in het beheersen van mastitis. In gezond uierweefsel is de concentratie aan immunoglobulines namelijk laag gedurende de lactatie, maar stijgt ze langzaam tijdens de droogstand om dan, zoals eerder beschreven, een piek te bereiken tijdens de colostrogenese (Sordillo et al., 1997). Toch ontwikkelen versgekalfde koeien acute mastitis en krijgen zij vaak enkele dagen na het kalven ernstige uierontstekingen (Blowey & Edmondson, 2010). Hoge concentraties immunoglobulines komen ook voor in geïnfecteerd uierweefsel (Sordillo et al., 1997).

Lysozyme

Lysozyme is een bacteriedodend eiwit dat aanwezig is in melk. Het breekt de peptidoglycaanlaag in de celwand van gram-positieve bacteriën af en kan de binding van lactoferrine met bacteriële celwand verbeteren (Sordillo et al., 1997). Een studie van Gordon et al. (1979) toont echter aan dat lysozyme het chemotaxine-alarm (zie 0) remt.

1.2.3.2 Induceerbare defensiemechanismen

Wanneer al de voorgaande systemen gefaald hebben en bacteriën hebben weten te penetreren in het tepelkanaal, worden de induceerbare defensiemechanismen geactiveerd (Blowey & Edmondson, 2010).

Het chemotaxine-alarm

Macrofagen en polymorfonucleaire neutrofielen (PMNs) zijn permanent aanwezig in de melk en fagocyteren fragmenten van dode pathogenen en de door hen geproduceerde toxinen. Het fagocytoseproces leidt ook tot de afgifte van chemische stoffen, chemotaxines genoemd (Blowey & Edmondson, 2010). Deze chemotaxines (samen met de toxines afkomstig van de pathogenen) zorgen voor de mobilisatie van immuuncellen naar plaatsen van infectie en weefselbeschadiging als gevolg van een concentratiegradiënt. (Wilkinson, 1998; Polk & Frey, 2012)

De ontstekingsreactie

Verhoogde bloedtoevoer

De belangrijkste reactie op de aanwezigheid van chemotaxines is een verhoogde aanvoer van PMNs. Deze aanvoer wordt bereikt via een verhoogde bloedtoevoer in het geïnfecteerde kwartier. Dit verklaart het rode, warme en opgezwollen uitzicht ervan (Blowey & Edmondson, 2010).

Stijging temperatuur

Een ontstekingsreactie zorgt typisch voor een lokale stijging van de lichaamstemperatuur. Dit zorgt voor het activeren van het immuunsysteem, het onderdrukken van het pathogeen en een sneller herstel van het beschadigde weefsel (Alnakip et al., 2014).

Marginatie

Selectines (glycoproteïnen) verschijnen op het binnenoppervlak van de cellen die de capillaire wand bekleden. Zij trekken PMNs naar de zijkanten van de haarvaten, remmen ze af en helpen ze het bloedvat te verlaten door de PMNs tussen de capillaire cellen te laten dringen (Blowey & Edmondson, 2010; Alnakip et al., 2014).

Loskomen juncties endotheelcellen

Juncties tussen de secretorische cellen in de uier zorgen voor de bloed-melkbarrière (Verschelde, 2013). Als reactie op de aanwezigheid van chemotaxines zullen de endotheelcellen die zowel de capillairen als de cisternen bekleden, letterlijk van elkaar weg bewegen om een snellere passage van PMNs te faciliteren (Blowey & Edmondson, 2010).

Diapedese

Diapedese is de beweging van leukocyten uit de bloedvaten naar plaatsen van ontsteking of weefselbeschadiging gefaciliteerd doordat de bloedvatwandcellen uit elkaar bewegen als reactie op chemische signalen. Concreet wil dit zeggen dat PMNs door de wand van de capillairen glippen, door het uierweefsel en de melkvormende cellen in de melk. Daar fagocyteren ze bacteriën (Blowey & Edmondson, 2010). Langdurende diapedese veroorzaakt schade aan het parenchymweefsel van de uier waardoor de melkgift zal afnemen. De mate waarin de kwaliteit en kwantiteit van de melk afneemt, hangt hoofdzakelijk af van de duur en ernst van de infectie (Sordillo et al., 1997). De duur en de ernst is gerelateerd aan de migratierespons van de leukocyten. Als de cellen snel vanuit de bloedbaan migreren naar de plaats van infectie, zullen de pathogenen ook snel geëlimineerd worden. Hierdoor zal de leukocytenaanreiking verminderen en zal het celgetal weer dalen tot een normaal niveau. Als bacteriën echter persisteren zullen ze migreren naar het alveolair lumen. Hierdoor zal de diapedese lang duren (omdat er veel leukocyten aangetrokken moeten blijven worden) en wordt aldus het glandulair parenchym beschadigd: dit resulteert in een gereduceerde melkproductie (Verschelde, 2013).

Schade aan epitheelcellen

Toxines geproduceerd door *E. coli* kunnen epitheelcellen die het tepelkanaal en de melkboezem bekleden helemaal vernietigen. Dit faciliteert dan wel weer de toegang van PMNs tot het gebied van infectie (Blowey & Edmondson, 2010).

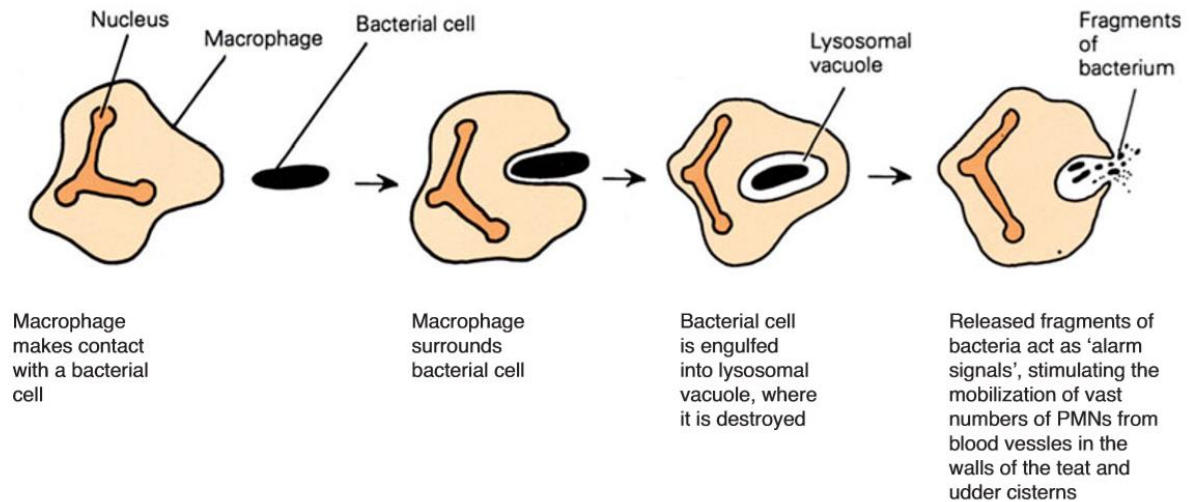
Bloedserum

Bij een acute *E. coli*-infectie kan een waterige, gele afscheiding worden waargenomen in de melk. Dit is serum dat in weefsels is gestroomd door de opening tussen de melkvormende cellen (zie loskomen juncties endotheelcellen). Ook (oncomfortabele) zwelling van het geïnfecteerde kwartier en zelfs serumafzetting op het uieroppervlak kan worden waargenomen (Blowey & Edmondson, 2010).

Fagocytose

Zodra ze in de melk aanwezig zijn, beginnen PMNs als reactie op chemotaxines bacteriën op te slokken. Hiermee begint het belangrijkste, meest effectieve gedeelte van het bacterievernietigende proces dat fagocytose heet. Fagocytose is een vorm van endocytose waarbij het celmembraan van de fagocyten (neutrofielen en macrofagen) een lichaamsvreemde stof ontsluit en een fagosoom binnen in de cel vormt (zie Figuur 1-1)

(Vanden Bosch, 2014; Gonçalves et al., 2017). Eens de bacteriën opgenomen zijn door een PMN, worden ze geneutraliseerd en vernietigd met behulp van het waterstofperoxidesysteem (Blowey & Edmondson, 2010). Als bacteriën in staat zijn de defensiemechanismen in de uier te overleven, zal de infectie blijven uitbreiden. Dit resulteert in een verhoogde SCC (Sordillo et al., 1997).



Figuur 1-1: Fagocytose (Blowey & Edmondson, 2010)

1.2.4 Soorten leukocyten

De melk van gezonde koeien bevat een residente leukocytenpopulatie die een sleutelrol speelt bij de aangeboren afweer (Bobbo et al., 2016). Ze worden aangetrokken naar de plaats van infectie en komen zo in de melk terecht (Verschelde, 2013). Leukocyten kunnen micro-organismen herkennen en induceren snel een ontstekingsreactie in een poging de intramammaire infectie onmiddellijk op te lossen door fagocytose. Leukocyten die het uierweefsel bewonen, bewaken als het ware het niet-geïnficeerde weefsel. Ze scheiden tal van immuungerelateerde stoffen uit in de melk zoals cytokines, chemokines en antimicrobiële eiwitten en peptiden. Ze helpen ook bij de vernieuwing van beschadigd weefsel (Alnakip et al., 2014). Melk afkomstig van een gezonde uier heeft variërende leukocytenverhoudingen. Macrofagen zijn aanwezig in gehalten van 12 tot 46 procent, polymorf nucleaire neutrofielen (PMNs) tussen 6 en 50 procent en lymfocyten tussen 14 en 80 procent (Damm et al., 2017).

Macrofagen worden geïdentificeerd als grootste celtype, met veel cytoplasma en een relatief kleine celkern. Ze zijn 8 tot 30 μm groot en bleek gekleurd. Lymfocyten zijn de kleinste immuuncellen (5-10 μm) en ze hebben een circulaire vorm. Hun kern omvat bijna de hele cel waardoor ze zo goed als geen cytoplasma hebben. PMNs situeren zich tussen de twee vorige in qua grootte (10-14 μm) met een in compartimenten onderverdeelde celkern (Schwarz et al., 2011b; Damm et al., 2017).

Een ontsteking wordt over het algemeen gedefinieerd als een toename van de witte bloedcellen in weefsels of lichaamsvloeistoffen die geïnficeerd zijn door pathogenen. Aan het begin van een uierontsteking kan er een verhoogde overdracht van neutrofielen uit het bloed naar het uierweefsel worden opgespoord. Hierdoor wordt een hoog neutrofielgehalte in de melk geaccepteerd als een belangrijke indicator voor mastitis (Schwarz et al., 2011a).

1.2.4.1 Macrofagen

Macrofagen vormen het overheersende celtype in melk en gezond uierweefsel (Sordillo et al., 1997). Het zijn actieve, fagocytische cellen die bacteriën, cellulaire resten en opgehoopte melkcomponenten kunnen opnemen. Bovendien herkennen zij binnendringende pathogenen en initiëren ze een immuunrespons door chemotaxines vrij te stellen. Deze immuunrespons leidt tot een snelle rekrutering van PMNs in het uierweefsel (Schwarz et al., 2011b; Damm et al., 2017). Macrofagen faciliteren zowel de aangeboren als de verworven immuunreacties. Ze dragen bij aan de inductie van specifieke immuunreacties door middel van antigeenprocessing en de presentatie ervan aan lymfocyten alsook de uitscheiding van modulators voor de rekrutering van lymfocyten (Bradley & Green, 2005). Net zoals PMNs, kunnen macrofagen ook diverse niet-specifieke functies uitvoeren, zoals fagocytose van onder andere *S. aureus* en ze blootstellen aan proteasen (Alnakip et al., 2014). De fagocyterende activiteit kan verhoogd worden door de aanwezigheid van opsonische antilichamen voor specifieke antigenen (Sordillo et al., 1997). De werking van macrofagen is echter minder effectief dan die van monocyten (macrofagen in de bloedbaan), omdat ze bestanddelen willekeurig opnemen, ook de melkcomponenten, en het feit dat hun proteasen schade kunnen aanrichten aan het epitheelweefsel (Alnakip et al., 2014). De macrofagen aanwezig tijdens de droogstand hebben een grotere bactericidewerking dan macrofagen tijdens de lactatie. Dit komt omdat macrofagen die aanwezig zijn tijdens de droogstand hogere hoeveelheden cytokines, specifiek tumornecrosefactor-alfa, vrijstellen dan macrofagen aanwezig in de uier tijdens lactatie (Denis et al., 2006). Belangrijker dan hun fagocyterende activiteit, is hun vermogen een lokale ontstekingsreactie te versnellen door bepaalde stoffen af te scheiden. Hierdoor wordt de migratie van neutrofielen en hun bijbehorende bactericide werking versneld (Alnakip et al., 2014).

1.2.4.2 Neutrofielen

Neutrofielen behoren tot het aangeboren immuunsysteem en zijn het overheersende celtype (meer dan negentig procent van de leukocyten) tijdens de beginstadia van een infectie (Sordillo et al., 1997; Verschelde, 2013). Neutrofielen zijn zelfs in gezond weefsel permanent aanwezig en komen bij infectie als tweede, na de macrofagen, op de proppen (Alnakip et al., 2014). Ze migreren vanuit het bloed naar het uierweefsel als reactie op chemotaxines (Sordillo et al., 1997). Stimuli, zoals de handelingen van het melken en de afvoer van de melk zelf, zorgen ervoor dat nieuwe polymorfonucleaire neutrofielen aangetrokken worden tot het uierweefsel (Alnakip et al., 2014). PMNs slokken vreemde materialen op, fagocyteren en vernietigen ze (Verschelde, 2013). Dit gebeurt via twee parallelle systemen. Het eerste is een zuurstofafhankelijk proces waarmee hydroxyl- en zuurstofradicalen gevormd worden en het tweede is een zuurstofonafhankelijk proces dat steunt op gevormde reactanten als peroxidasen, hydrolitische enzymen en lactoferrine. Buiten de fagocyterende werking van de neutrofielen, spelen zij ook een rol in de coördinatie van de aangeboren en verworven immuniteit en bovendien bezitten hun cellulaire granulen bacteriedodende peptiden (de defensinen), enzymen en proteasen. Helaas zijn die proteasen niet-selectief waardoor ze verkeerdelijk de vetbolletjes en caseïne in de melk kunnen degraderen. Na het vervullen van hun taak ondergaan neutrofielen een geprogrammeerde celdood, waarna ze opgeruimd worden door macrofagen (Alnakip et al., 2014). Melk afkomstig van koeien met mastitis kan tot 95 procent PMNs bevatten (Schwarz et al., 2011a).

1.2.4.3 Lymfocyten

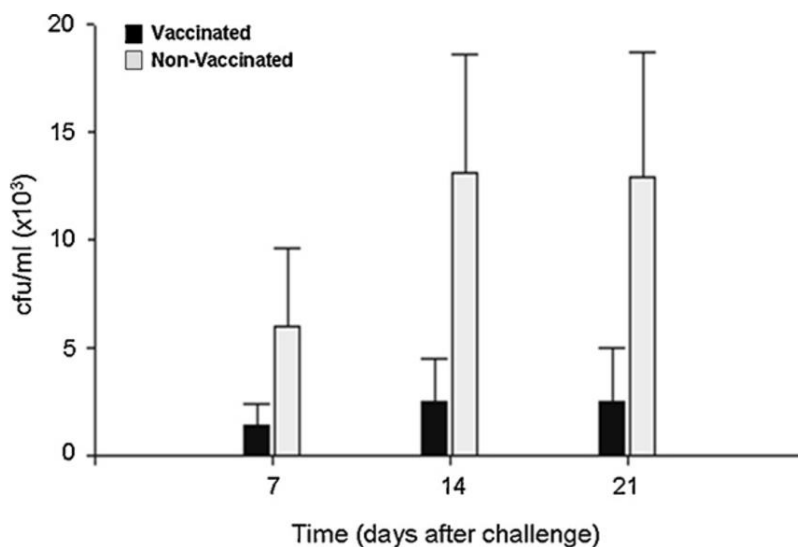
Lymfocyten behoren tot de specifieke immuniteit en richten zich op één bepaald pathogeen (Goldsby, Kindt, & Osborne, 2007). Ze reguleren de inductie (en onderdrukking) van immuunreacties (Damm et al., 2017). Ze herkennen een hele range antigene structuren met behulp van membraanreceptoren: dit karakteriseert hun specificiteit, diversiteit en hun vermogen om pathogenen te memoriseren. Men onderscheidt drie typen lymfocyten: T- en B-lymfocyten en “natural killer”-cellen (NK-cellen). Zodra lymfocyten zijn geactiveerd, kunnen zij echter zowel de specifieke als niet-specifieke immuunreacties reguleren. De exacte rol van lymfocyten tijdens een intramammaire infectie is niet geheel gedefinieerd in de literatuur (Alnakip et al., 2014). Waarschijnlijk is hun rol in het onderdrukken van mastitis te verwaarlozen omdat koeien na het kalven zeer vatbaar zijn voor mastitis, terwijl de lymfocyten dan juist massaal aanwezig zijn (Pellegrino et al., 2010). Een van de belangrijkste functies van B-lymfocyten is het produceren van antilichamen tegen invallende pathogenen, vooral bacteriën (de humorale respons) (Alnakip et al., 2014). Ze gebruiken hun oppervlaktereceptoren om specifieke pathogenen te herkennen. In tegenstelling tot T-lymfocyten, blijft het percentage B-lymfocyten gedurende de lactatie redelijk constant (Sordillo et al., 1997). B-lymfocyten kunnen differentiëren in plasmacellen of geheugen-B-cellen. T-lymfocyten verwijderen oude en beschadigde cellen waardoor het uierweefsel minder gevoelig wordt voor infecties (Pilla et al., 2012). Cytotoxische T-lymfocyten herkennen en elimineren cellen die antigenen presenteren (Verschelde, 2013). NK-cellen zijn grote, granulaire lymfocyten die behoren tot het niet-specifieke immuunsysteem en via hun receptoren een cytotoxische activiteit bezitten (Alnakip et al., 2014). De NK-cel bindt aan een targetcel (lichaamseigen, geïnfecteerde cellen) waarna zij worden aangetast door de granulaire vrijgestelde perforine (Sordillo et al., 1997). Het resultaat is lyse van de pathogenen (Alnakip et al., 2014).

1.2.5 Versterken van de specifieke immuniteit (vaccin)

Mastitisvaccinaties zouden het rekruteren van neutrofielen op de plaats van infectie kunnen stimuleren zodat de productie van specifieke antilichamen versneld wordt (Sordillo et al., 1997). Vaccins zouden kunnen bijdragen tot de mastitisbeheersing om zo uitbraken te voorkomen. Zo zouden ze ook een alternatief kunnen bieden voor de antibioticabehandelingen en aldus antibioticaresistente bacteriepopulaties kunnen terugdringen (Pellegrino, Giraudo, Raspanti, Odierno, & Bogni, 2010). Van de vaccins wordt verwacht dat ze chronische mastitis zouden uitschakelen, nieuwe gevallen van mastitis voorkomen en de gevolgen van klinische mastitis zouden temperen. De huidige vaccins lossen de verwachtingen naar de eerste twee criteria echter niet in, ze hebben tot hiertoe enkel de incidentie van klinische mastitis kunnen verlagen (Ruegg, 2012; Gomes & Henriques, 2015).

Het rekruteren van neutrofielen kan in de hand worden gewerkt door de afgifte van inflammatoire mediators door antigeen-specifieke lymfoïde populaties. De specifieke antilichamen zijn nodig voor de opsonisatie van bacteriën ter bevordering van het proces fagocytose. Antilichamen kunnen daarnaast ook bacteriële toxines neutraliseren, interfereren met bacteriële hechtingsmechanismen en lyse van binnenvallende pathogenen induceren (Sordillo et al., 1997). De kennis van mastitisvaccins is de laatste jaren aanzienlijk gestegen, maar tot op de dag van vandaag worden ze nog niet veel gebruikt in programma's voor mastitisbeheersing (Gomes & Henriques, 2015).

In een onderzoek naar de efficiëntie van een levend vaccin tegen de virulente stam *Staphylococcus aureus* steeg het celgetal van de behandelde koeien vierentwintig uur na de vaccinatie significant (>500 000 cellen/ml), om weer te dalen tot een normaal niveau binnen de 48 uur. Er werden geen bacteriën geïsoleerd uit de melk van pas gevaccineerde dieren en geen klinische symptomen werden waargenomen na het vaccineren. De gevaccineerde dieren hadden een significant lagere infectiekans dan de niet-gevaccineerde dieren. Het hoogst gemeten kiemgetal bij de gevaccineerde groep was $2,4 \times 10^3$ kolonievormende eenheden per milliliter (zie Figuur 1-2). Het celgetal van alle monsters van de gevaccineerde groep was lager dan dat van de controlegroep, maar dit resultaat was niet significant. De gehaltes aan IgG₁ en IgG₂ in het bloed van de testgroep stegen significant na toedienen van het vaccin en ook de opsonisatie verbeterde na vaccinatie (Pellegrino et al., 2010).



Figuur 1-2: Kiemgetal van melk afkomstig van gevaccineerde en niet-gevaccineerde vaarzen na blootstelling aan een *Staphylococcus aureus*-virulente stam (Pellegrino, Giraud, Raspanti, Odierno, & Bogni, 2010)

Volgens Blowey & Edmondson (2010) kan mastitis nooit volledig uitgeroeid worden, omdat er altijd infecties veroorzaakt kunnen worden door micro-organismen uit de omgeving, zoals *Escherichia coli*. Ze achten het ook weinig waarschijnlijk dat er ooit een alomvattend vaccin uitgevonden zal worden dat de verschillende bronnen van infecties onderdrukt. Een ander nadeel dat dient vermeld te worden, is de praktische toepassing van het vaccineren. De vaccinatie zou meerdere keren en op specifieke momenten tijdens de lactatie uitgevoerd moeten worden (GD, 2019).

1.3 Detectiemethodes

1.3.1 Opsporing mastitis

Mastitis vroeg detecteren is cruciaal om economische verliezen te beperken en de kans op genezing te verhogen (De Schutter, 2015). Tijdig ingrijpen kan voorkomen dat het klinische stadium bereikt wordt en de effectiviteit van de behandeling hangt in grote mate af van de snelheid waarmee men mastitis kan detecteren (De Schutter, 2015; Damm et al., 2017).

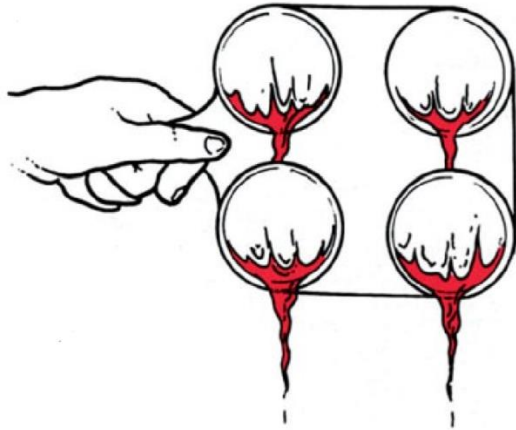
Somatische celtelling wordt gebruikt als sleutelindicator om mastitis op te sporen (Damm et al., 2017). Ondanks het feit dat het celgetal van bulkmelk in enkele jaren tijd stevig is gedaald (Schwarz et al., 2010), veroorzaakt mastitis nog altijd enorme economische verliezen. Daarom zijn er nieuwe methodes nodig zodat we mastitis beter kunnen beheersen, zoals het differentiëren van somatische cellen met behulp van flowcytometrie (DSCC). De differentiatie van somatische cellen geeft de verhouding weer tussen het aantal macrofagen en neutrofielen in de melk en verschaft aldus inzicht in de actuele gezondheidstoestand van de uier (Damm et al., 2017). Het microscopisch tellen van gekleurde cellen is arbeidsintensief en de resultaten zijn sterk persoonsafhankelijk. Hierdoor zit flowcytometrie in de lift (Wickström et al., 2009).

Zowel de totale SCC als de verhouding van de verschillende celtypen varieert tijdens het melken. Het celgetal van cisternale melk is hoog en daalt wanneer de alveolaire melk gewonnen wordt. Restmelk vertoont dan weer een hogere SCC (Pilla et al., 2012; Damm et al., 2017).

1.3.2 CMT

De diagnostiek van mastitis in een laboratorium kan duur en tijdrovend zijn, daarom kan de California Milk Test (CMT) een oplossing bieden (Petzer et al., 2013). CMT, uitgevonden door Schalm en Noorlander in 1957, is een eenvoudige screeningstest die gemakkelijk op een melkveebedrijf uitgevoerd kan worden (Vanden Bosch, 2014; Biebaut, 2018; Rossi et al., 2018). Deze (indirecte) test wordt gebruikt om het celgetal van de melk, dat wordt weerspiegeld door een bepaalde graad van verslijming, te meten. Hoe sterker de gelvorming, hoe hoger het celgetal van dat kwartier. Het testreagens bevat 3% natriumlaurylsulfaat en bromocresol dat de aanwezige afweercellen vernietigt waardoor het DNA ervan vrijkomt. Hoe meer DNA er vrijkomt, hoe meer het product zal indikken. Er bestaan twee typen tests: de klassieke test enkel op basis van de graad van verslijming en een waarbij de interpretatie gebeurt in combinatie met een kleurindicatie (Verschelde, 2013; Biebaut, 2018).

De melkveehouder ziet duidelijk het resultaat (zie Figuur 1-3) en kan hierdoor snel en gepast ingrijpen (Petzer et al., 2013). De test kan in de praktijk gebruikt worden om subklinische mastitis op te sporen, een gepast, dierafhankelijk droogstandsmanagement toe te passen en om een mastitisbehandeling te evalueren (Biebaut, 2018). Een eerste nadeel van CMT is dat ze tot wel 20 procent vals-negatieve resultaten kan geven. Dit kan een probleem vormen in uitroeiingsprogramma's omdat zo de pathogeenreservoirs blijven bestaan en nieuwe infecties kunnen introduceren (Rossi et al., 2018). Andere nadelen kunnen bestaan uit de subjectieve interpretatie van de test, het feit dat er slechts een ruwe indicatie van het celgetal bekomen wordt en er pas een zichtbare reactie optreedt vanaf 400 000 cellen per milliliter (ver boven de referentiewaarde) (Biebaut, 2018). De reactie moet ook binnen 15 seconden afgelezen worden omdat een zwakke reactie na die tijd verdwijnt (Vanden Bosch, 2014).



Figuur 1-3: Een positieve California Milk Test: alle kwartieren vertonen een sterke verslijming (Blowey & Edmondson, 2010)

1.3.3 Somatisch celgetal

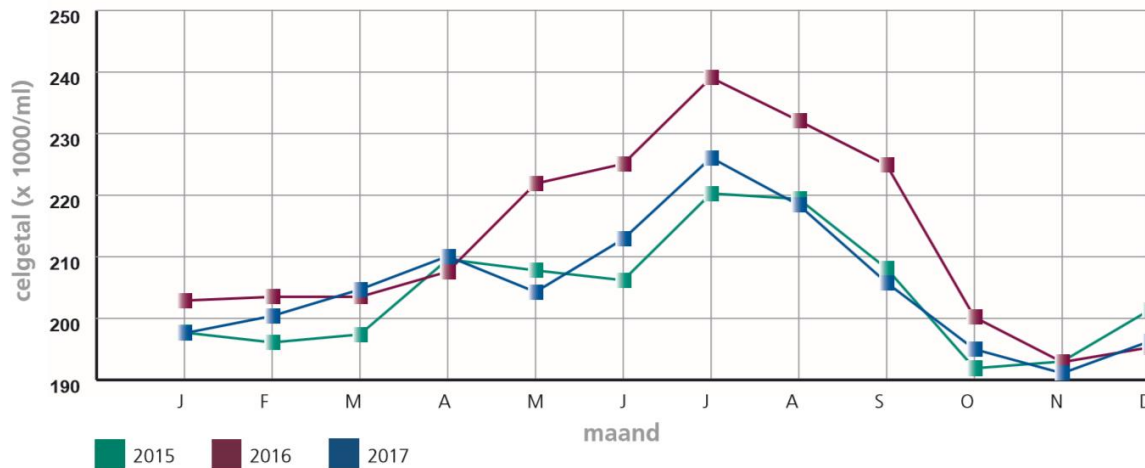
Of mastitis wordt veroorzaakt of niet hangt in grote mate af van de activiteit van de reeds aanwezige en verworven leukocyten in de vroege stadia van de pathogenese. De hoeveelheid leukocyten in de melk wordt gemeten aan de hand van het somatisch celgetal (Sordillo et al., 1997). De somatische cellen waar we het over hebben zijn lymfocyten, neutrofielen en macrofagen, alsook een kleine hoeveelheid epitheelcellen (Verschelde, 2013). Als gevolg van een intramammaire ontsteking kan het celgetal stijgen tot meer dan 1 000 000 cellen per milliliter binnen enkele uren (Sordillo et al., 1997). Dit komt doordat tijdens de infectie immuuncellen worden aangetrokken en epitheelcellen loskomen, ongeacht de ernst van de infectie (Alnakip et al., 2014).

De somatische celtelling (SCC: somatic cell count) is een robuuste, kwantitatieve meetmethode om het aantal somatische cellen in de melk (op koe- of zelfs kwartierniveau) te meten (Damm et al., 2017). SCC wordt algemeen gebruikt als indicator voor de uiergezondheid (Schwarz et al., 2011). Met SCC worden de immuuncellen echter niet onderverdeeld (Damm et al., 2017). Het aantal somatische cellen in de melk wordt als normaal beschouwd als de SCC zich onder de 200 000 cellen per milliliter bevindt (voor vaarzen 150 000 cellen/ml). Een SCC van 200 000 cellen/ml is dus de referentie. Lager dan 200 000 neemt men aan dat de uier gezond is en hoger dan 200 000 wordt aangenomen dat de melkklieren geïnficeerd zijn (Schwarz et al., 2011; De Schutter, 2015). Een studie toonde aan dat er al vanaf een celgetal van 100 000 cellen/ml productieverliezen optreden (Pilla et al., 2012). Wanneer de infectie verdwenen is, zal het celgetal na een paar weken weer zijn gedaald tot een normaal niveau (Verschelde, 2013). De meest betrouwbare manier om mastitis op te sporen is het celgetal op kwartierniveau meten (De Schutter, 2015).

Een hoog celgetal is geassocieerd met een lagere melkproductie (Bobbo et al., 2017). Een te laag celgetal echter blijkt ook niet opportuun te zijn. Koeien met een laag celgetal zouden aan een niet-detecteerbare mastitisaandoening kunnen leiden die een licht effect uitoefent op de melkgift, het caseïnegetal en het lactosegehalte (Bobbo et al., 2016). Het celgetal vertoont een dalende trend: in 2010 bedroeg het gemiddeld tankmelkcelgetal nog 227 545 cellen per milliliter, in 2017 nog maar 205 800 (Verschelde, 2013; MCC Vlaanderen, 2017). Blijvende

aandacht voor uiergezondheid blijft wel nodig want in 2018 steeg het tankmelkcelgetal opnieuw licht (M-team, 2019).

Het SCC varieert hoofdzakelijk in reactie op een uierinfectie, maar is ook afhankelijk van de leeftijd van het dier, de status van lactatie, het stressniveau, het tijdstip en de frequentie van melken en het seizoen (Schwarz et al., 2011a). Tijdens de winter is het celgetal het laagst en het bereikt een piek in juli en augustus (zie Figuur 1-4). Dit zou te verklaren zijn door de hogere temperaturen in de zomer en een grotere populatie vliegen die fungeren als vector voor *S. aureus*. Melkstalen die 's ochtends worden genomen, hebben een hoger celgetal dan stalen die 's avonds genomen zijn (Verschelde, 2013).



Figuur 1-4: Verloop van het gemiddeld celgetal (MCC Vlaanderen, 2017)

Bij oudere koeien is er een hogere prevalentie aan intramammaire infecties en dus hebben ze doorgaans een hoger celgetal. Dit betekent dat er meer oudere koeien aan een intramammaire infectie lijden dan vaarzen of jongere koeien (Verschelde, 2013). Per lactatie stijgt het celgetal gemiddeld met 100 000 cellen per milliliter. Een veestapel die drie keer per dag gemolken wordt, heeft relatief minder koeien met een hoog celgetal dan een veestapel die twee keer per dag gemolken wordt. Dit zou verklaard kunnen worden doordat melken telkens zorgt voor de “keratine-flush” waarbij de bacteriën samen met de keratine worden weggespoeld uit de uier (Reneau, 1986; Vanden Bosch, 2014). Naarmate het lactatiestadium vordert, stijgt ook het somatisch celgetal (Verschelde, 2013).

Streptococcus agalactiae is een van de meest voorkomende pathogenen én is zeer besmettelijk. Intramammaire infecties veroorzaakt door *S. agalactiae* zijn geassocieerd met zeer hoge SCC-waarden, met een geometrisch gemiddelde van 1 129 000 cellen per milliliter, en een daling van de melkproductie van 1,6 tot 4,5 kg per geïnfecteerde koe per dag (Rossi et al., 2018).

1.3.4 Differentiële celtelling

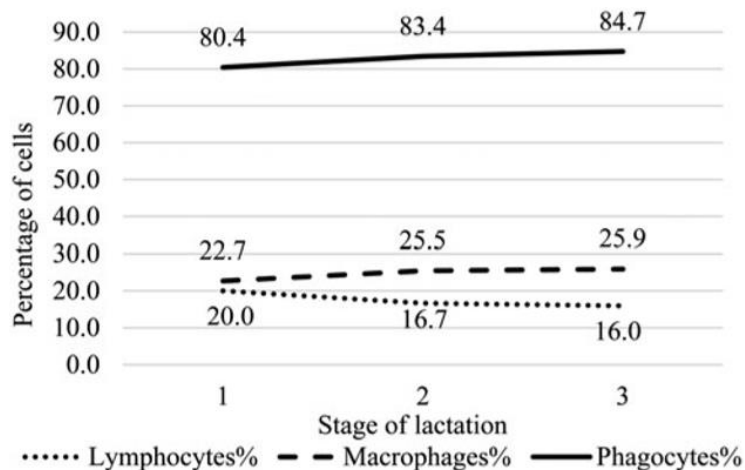
Naast de somatische celtellingen kunnen ook differentiële somatische celtellingen (DSCC) toegepast worden voor een meer gedetailleerde opvolging van de gezondheidsstatus van de uier (Schwarz et al., 2011; Zecconi; 2018). De differentiële celtelling detecteert veranderingen in relatieve celpopulaties al voordat het totaal aantal cellen toeneemt (Pilla, Schwarz, König, & Piccinini, 2012). Het gedifferentieerde celgetal geeft het aandeel polymorfonucleaire

leukocyten en lymfocyten weer. Het percentage macrofagen kan worden berekend door DSCC van 100% af te trekken. Naast leukocyten worden er ook epitheelcellen aangetroffen in de melk en dit voor 1 tot 3 procent. Hun immunologische eigenschappen zijn niet geheel duidelijk. Het aantal en de verdeling van de leukocyten in het uierweefsel speelt een rol in het succes van de verdediging tegen invallende pathogenen (Schwarz et al., 2011a). Als het celgetal toeneemt, zal het aantal PMNs ook toenemen, maar zal de proportie macrofagen afnemen. Het relatieve aantal aan lymfocyten blijft redelijk constant en laag (Damm et al., 2017). Zelfs als de SCC kleiner is dan 100 000 cellen/ml, kan er een (latente) ontsteking aanwezig zijn in de uier. Studies hebben een verhoogde concentratie PMNs gevonden in melk afkomstig van (volgens SCC) gezond uierweefsel. Hieruit blijkt dat de bepaling van de individuele populaties immuuncellen in de melk nuttig is voor het onderzoeken van de uiergezondheid (Damm et al., 2017). Sommige monsters met een SCC vanaf 9 000 cellen per milliliter vertoonden al een overmaat aan lymfocyten, wat wijst op een ontstekingsreactie (Schwarz et al., 2011a).

Zoals eerder besproken, is de leukocytenverdeling in melk afkomstig van gezond uierweefsel variabel, maar bevat hoofdzakelijk macrofagen en lymfocyten (Pillai, Kunze, Sordillo, & Jayarao, 2001; Schwarz et al., 2011a). In de loop van de lactatie neemt het aantal lymfocyten af en nemen het aantal PMN en macrofagen toe (Pilla et al., 2012). Het gehalte aan PMNs kan in melk van koeien met mastitis oplopen tot 95% (Damm et al., 2017). Tijdens de verschillende fasen van ontsteking verandert de differentiële celtelling (Schwarz et al., 2011a).

Door subklinische mastitis te detecteren bij een drachtige koe en enkel bij geïnfecteerde koeien een gepaste droogstandsbehandeling toe te passen, wordt het antibioticumgebruik verlaagd met 47 procent zonder een toename van het aantal infecties de eerste 10 dagen postpartum. Het uitvoeren van de melkleukocytentest op kritieke tijdstippen tijdens de lactatiecyclus zoals kort na het kalven en voor het droogzetten kan zorgen voor een betere diergezondheid, melkkwaliteit en bedrijfseconomie (PR Newswire, 2013).

De pariteit, de dag van staalname en de positie van het kwartier oefenen geen van alle invloed uit op de differentiële resultaten (Dosogne et al., 2003). Het aantal dagen in lactatie (DIL) beïnvloedt wel de resultaten van de leukocytendifferentiatie. Hoe meer dagen een koe in lactatie is, hoe meer macrofagen en hoe minder lymfocyten er aanwezig zijn in de melk. Het percentage macrofagen stijgt in een onderzoek van Gonçalves et al. van 22,7 % naar 25,9 % en het percentage lymfocyten daalt van 20,0 % naar 16,0 %. Het aantal fagocyten stijgt ook met een stijgend aantal dagen in lactatie van 80,4 % naar 84,7 %. Dit wordt weergegeven in Figuur 1-5, waarbij lactatiestadium 1 staat voor 4 tot 100 DIL, 2 voor 101 tot 200 DIL en 3 voor 201 tot 431 DIL (Gonçalves et al., 2017).

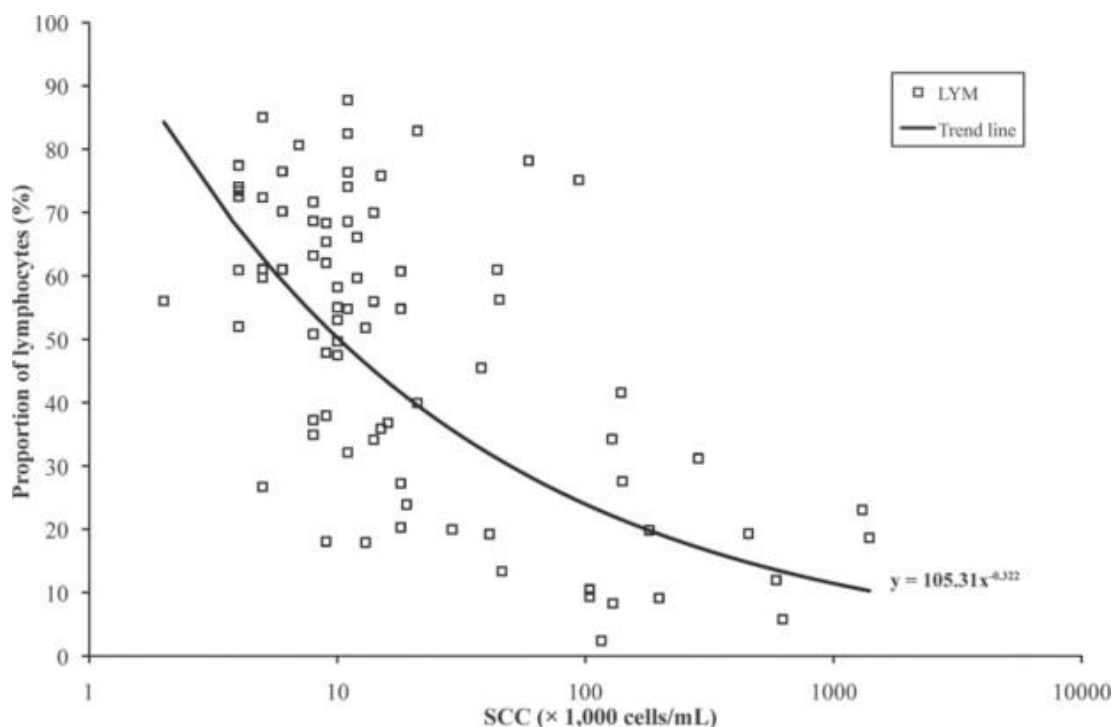


Figuur 1-5: Het effect van het lactatiestadium op het percentage macrofagen, lymfocyten en fagocyten (Gonçalves et al., 2017)

De meeste flowcytometrische technieken om melkleukocyten te differentiëren zijn gebaseerd op fluorescente labeling met monoklonale antilichamen tegen CD-moleculen of DNA-labeling (Dosogne, Vangroenweghe, Mehrzad, Massart-leën, & Burvenich, 2003). CD-moleculen (differentiatiecluster) zijn celoppervlaktemoleculen die tot expressie worden gebracht op leukocyten (Clark et al., 2016). Voor de DSCC-bepaling wordt er een antilichaamkleuring uitgevoerd. Voor de identificatie van PMN en macrofagen gaat het om niet-geconjugeerde monoklonale antilichamen tegen CD11b- en CD14-moleculen. PMNs worden gemeten als CD11b-cellen terwijl macrofagen worden gedefinieerd als zowel CD11b- als CD14-cellen (Schwarz et al., 2011a). Lymfocyten worden gedifferentieerd op grootte (voorwaartse lichtverstrooiing) en granulariteit (zijwaartse lichtverstrooiing). De monsters worden verdund, geïncubeerd en gecentrifugeerd. De gekleurde monsters worden geanalyseerd met een flowcytometer met argonionenlaser en een rode diodenlaser met een excitatiegolflengte van respectievelijk 488 en 635 nanometer (Rivas, Quimby, Blue, & Coksaygan, 2001; Schwarz et al., 2011a).

Bij SCC-waarden kleiner dan 10 000 cellen/ml is het aandeel lymfocyten in de melk meer dan 60 procent. Stijgt de SCC echter (tot wel 1 miljoen), dan zal de hoeveelheid lymfocyten afnemen tot minder dan 20 procent. Gezond uierweefsel (<100 000 cellen/ml) bevat als overheersende immuuncelpopulatie dus lymfocyten (zie Figuur 1-6) (Schwarz et al., 2011a).

Statistische analyse bracht een significant negatieve correlatie aan het licht tussen lymfocytenpercentages en het somatisch celgetal. Kweeknegatieve kwartieren (geen infectie) hadden ook een significant hoger lymfocytenpercentage dan kweekpositieve (wel een besmetting). Lymfocyten zijn aldus de dominante celpopulatie in gezond uierweefsel (zie Figuur 1-6). SCC-waarden kleiner dan 6 250 vertoonden tot 88 procent (gemiddeld 63 %) lymfocyten en monsters met een celgetal tussen 6 250 en 25 000 bevatten nog 58 procent lymfocyten (Schwarz et al., 2011a).

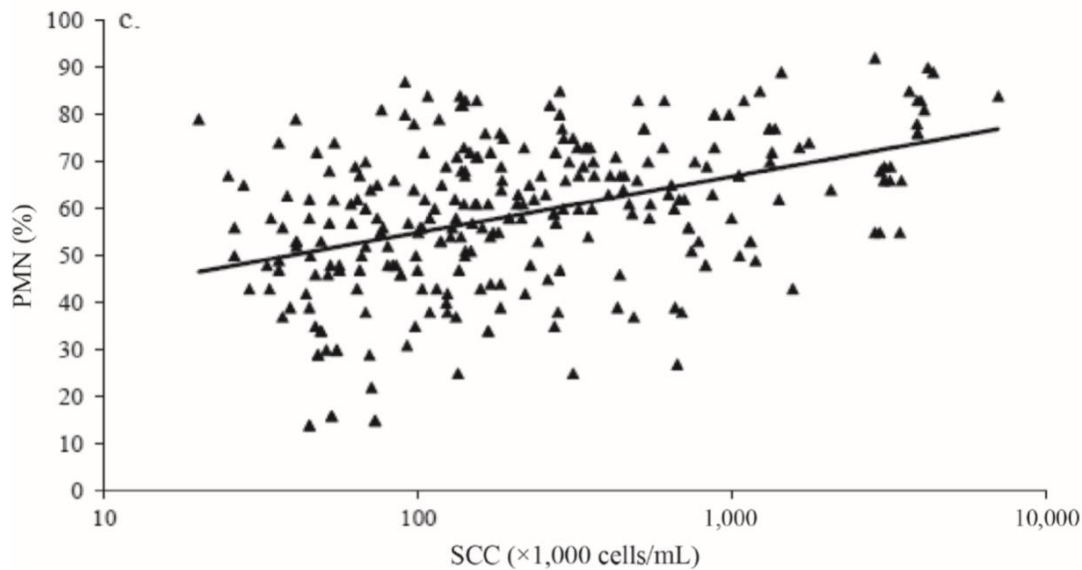


Figuur 1-6: Gehalte lymphocyten in functie van het celgetal (Schwarz et al., 2011a)

Het gehalte aan polymorfonucleaire neutrofiele leukocyten neemt toe als het celgetal toeneemt (zie Figuur 1-7). Het gehalte aan PMN en het celgetal zijn significant positief gecorreleerd en ook vertonen kweekpositieve kwartieren significant hogere PMN-percentages dan kweeknegatieve (Damm et al., 2017; Schwarz et al., 2011a). Een studie stelde dat PMNs domineerden in 86 procent van de geïnfekteerde monsters (Schwarz et al., 2011a). Dit verklaart waarom een ontsteking in de literatuur vaak gedefinieerd wordt als een toename van het aandeel polymorfonucleaire neutrofiele leukocyten. Een hoog PMN-percentage is een belangrijke indicator van ontstekingsreacties. Aan het begin van een uierontsteking zal er namelijk een verhoogde migratie van PMNs vanuit het bloed naar het uierweefsel waar te nemen zijn (Schwarz et al., 2011a). PMNs zijn aldus het dominante celtype in melk afkomstig van geïnfekteerd uierweefsel en zijn het minst vertegenwoordigd in gezond uierweefsel (Wickström et al., 2009; Schwarz et al., 2011b; Gonçalves et al., 2017).

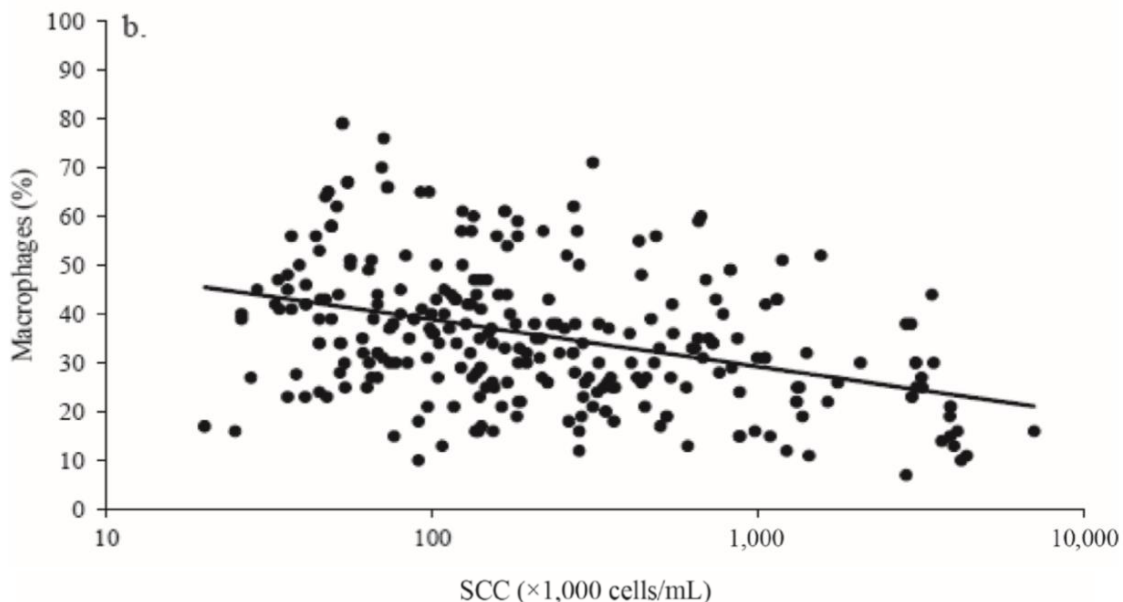
Een studie bewees dat ook kwartieren met subklinische mastitis hogere gehaltenes neutrofielen hebben dan gezonde kwartieren. In melkmonsters met een celgetal tussen 10 000 en 25 000 cellen per milliliter waar minorpathogenen in gedetecteerd zijn, waren de verhoudingen PMN al twee keer zo hoog dan bacteriologisch kweeknegatieve monsters (Schwarz et al., 2011a). Een andere studie van Schwarz et al. (2011b) vond dat in melkmonsters met een celgetal vanaf 43 000 cellen/ml PMN het overheersende celtype is met een gehalte van 62 procent.

In een studie van Schwarz et al. (2011a) overheersten bij 6 van de 41 melkmonsters met een celgetal tot 46 000 cellen per milliliter PMNs met gehaltenes van 56 tot 75 procent, wat op een ontstekingsreactie wijst. Dit werd bevestigd door de kweekculturen waarin in deze studie CNS en *Corynebacterium* spp. gevonden werden. In het overgrote deel van de monsters van geïnfekteerde kwartieren (> 100 000 cellen/ml) werden PMNs als dominante celpopulatie gevonden.



Figuur 1-7: Percentage PMNs in functie van het celgetal (Damm et al., 2017)

Macrofaagpercentages zijn het hoogst in gezond uierweefsel (zie Figuur 1-8) (Gonçalves et al., 2017). Statistische analyse toonde een significant negatieve correlatie tussen macrofagen en het celgetal (Schwarz et al., 2011b). Het absolute aantal macrofagen is hoger in een geïnfecteerd kwartier dan in een gezond kwartier, maar het percentage macrofagen is hoger in een gezond kwartier. Dit komt omdat mastitis een stijging in absolute aantallen leukocyten (en dan vooral PMNs) in de uier veroorzaakt. Tijdens de infectie daalt dus het percentage macrofagen en stijgt het percentage neutrofielen (Gonçalves et al., 2017). De grote aantallen neutrofielen worden door macrofagen opgeruimd als de infectie onder controle is. Verhoogde aantallen macrofagen wijzen dus op een herstellende ontsteking (Roos, 1995).



Figuur 1-8: Percentage macrofagen in functie van het celgetal (Damm et al., 2017)

1.3.4.1 QScout MLD

De QScout MLD (milk leucocyte differential) identificeert en differentieert leukocyten in melk en geeft het absolute aantal en het relatieve percentage ervan weer. Het gebruikt

fluorescentiemicroscopie voor het tellen en differentiëren van de immuuncellen in de melk (Gonçalves et al., 2017). De QScout gebruikt een algoritme van de celtypen, percentages en totale tellingen van elk type om te bepalen of er zich subklinische mastitis heeft ontwikkeld in een kwartier. Het toestel geeft het resultaat weer door middel van een rode (geïnficeerd) of groene (niet geïnficeerd) kleur (Dickrell, z.d.). Dit toestel mengt 80 µl melk met 20 µl van een meta-chromatische kleurstof, waarna het staal direct geanalyseerd kan worden. De software van de QScout herkent de drie types immuuncellen en geeft aan hoeveel procent van elk aanwezig is in het staal, alsook het totale celgetal. De PMNs worden het donkerst gekleurd, de lichte zones geven de lymfocyten weer en de macrofagen zijn intermediair gekleurd (Rodriguez & Galanaugh, 2007).

Gonçalves et al. testten in 2017 de effectiviteit van de QScout in vergelijking met het detecteren van mastitis met behulp van microbiologische culturen. Ze vonden dat 65,4 procent van de monsters die positief testten met MLD ook kweekpositief waren, maar 20,7 procent van de MLD-negatieve monsters waren ook kweekpositief. Ze stellen aldus dat leukocytendifferentiatie gebruikt kan worden voor celtelling en een meer gedetailleerde evaluatie van de gezondheidsstatus van de uier. Zoals beschreven bij Figuur 1-7, bewees de studie met behulp van de QScout dat er zeer weinig neutrofielen aanwezig zijn in laag celgetalmelk. In dit onderzoek zijn bij geïnficeerde kwartieren 33 tot 49 procent van de gedifferentieerde cellen afkomstig van PMNs, tegenover 17 tot 25 procent bij gezonde kwartieren. Ook dit ligt in de lijn van wat eerder werd beschreven. Twee studies van Hockett et al. (2014a; b) evalueerden het gebruik van antibiotica bij het droogzetten. Ze vergeleken de droogstandstherapie na diagnose van infectie met QScout en een blinde therapie met verschillende soorten antibiotica. Bij de blinde therapie werden alle koeien systematisch met antibiotica drooggezet. Het gebruik van QScout MLD zorgde voor een vermindering van het gebruik cefapirine benzathine met 47% en cloxacilline met 58% en met als resultaat een vergelijkbare infectiegraad, celgetal en productie in vergelijking met het blind gebruik van antibiotica. Gonçalves et al. (2017) besluit dat de QScout MLD een toestel is dat eenvoudig te gebruiken is om koeien met een terugkerend hoog celgetal te screenen op kwartierniveau en de differentiële resultaten te gebruiken om een gepaste behandeling te starten.

1.3.4.2 Fossomatic DC

Het tellen en differentiëren van somatische cellen met behulp van de Fossomatic DSCC-methode steunt op het kleuren van celkernen en andere celcompartimenten, die dan fluorescent oplichten (Damm et al., 2017). Met de Fossomatic kunnen tot 600 monsters per uur geanalyseerd worden. Het toestel gebruikt een LED-laser en drie detectoren ontvangen het fluorescent licht en de morfologische informatie, vooral de granulariteit, van elke cel die de laser passeert (Schwarz, z.d.). Het aantal geregistreerde pulsen is een maat voor het aantal somatische cellen in het monster (Kroll, Rieke, & Wüzburg, 1988).

De leukocyten worden in dit proces onderverdeeld in twee groepen: groep B zijn de polymorfonucleaire leukocyten en groep A omvat de rest van de witte bloedcellen. Dit in tegenstelling tot de QScout die zowel de macrofagen, lymfocyten als de neutrofielen kan differentiëren. De differentiële celtelling gebeurt door middel van differentiërende merkers zoals de meta-chromatische kleuring of fluorescente of radioactieve microkorrels die een of meer meetbare eigenschappen hebben afhankelijk van het type cel waarmee de merkers geassocieerd worden. De merkers verkleuren dus afhankelijk van het soort cel waarmee ze gebonden zijn. Een cytometer telt vervolgens de cellen met behulp van een detectiesysteem

dat gevoelig is voor de verschillen in kenmerken, zoals veranderingen in fluorescerende eigenschappen (Holm, 2010).

De klassieke methode voor flowcytometrie omvat enkele staalvoorbereidende handelingen. Eerst zijn er enkele centrifugatiestappen om interfererende deeltjes in het melkmonster te verwijderen en daarna gebeurt een verdunning (Holm, 2010). Tijdens de centrifugatie bestaat echter het risico dat macrofagen associëren met de vetlaag en dus gedeeltelijk verwijderd zullen worden. Dit resulteert in een hoger percentage PMNs in studies die uitgevoerd werden op basis van (uitstrijkjes van) gecentrifugeerde monsters (Wickström et al., 2009). In sommige gevallen kan het monster zo sterk gewijzigd worden dat het niet langer representatief is voor het geheel. Nu heeft men ontdekt dat men zonder verdunning en zonder centrifugatie een differentiële meting kan uitvoeren door een oordeelkundige keuze van de gebruikte hoeveelheid differentiële merker (zie verder). Aan 50 µl gekoelde melk wordt 50 µl acridine-oranje toegevoegd en 10 µl Na₂H₂-EDTA en dit wordt gemengd. Daarna wordt er 100 µl fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) toegevoegd. Het fluorescente licht wordt geëxciteerd door een blauwe laser (488 nm) (Holm, 2010).

De gebruikte reagentia zijn acridine-oranje, ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA) en een fosfaatgebufferde zoutoplossing. Acridine-oranje is een nucleïnezuurbindende kleurstof die groen fluorescent licht emitteert wanneer gebonden aan dubbelstrengig DNA (Invitrogen, z.d.). Een te lage hoeveelheid acridine-oranje (2-10 µl) verschaft niet voldoende differentiatie. Er wordt dan maar één celpopulatie waargenomen. Bij het gebruik van 50 µl acridine-oranje worden wel verschillende populaties waargenomen. Een hoge concentratie acridine-oranje in combinatie met EDTA zorgt voor een verhoging van de groen-fluorescerende activiteit van de cellen wat ervoor zorgt dat ze beter zichtbaar worden. Tenslotte zorgt het toevoegen van de isotone, fosfaatgebufferde zoutoplossing ervoor dat er minder ruis geproduceerd wordt en dat de celpopulaties beter gescheiden worden (geen overlapping meer). Men concludeert dat de beste differentiatie verwezenlijkt wordt bij een toevoeging van een concentratie acridine-oranje van 0,2 mg/ml of meer (Holm, 2010).

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Probleemstelling en onderzoeksvragen

Het merendeel van de antibiotica die gebruikt worden in de melkveehouderij is voor de behandeling en preventie van mastitis. Het vroeg detecteren van (sub)klinische mastitis is een cruciaal element in de rendabiliteit van een melkveebedrijf: mastitis kost namelijk € 240 per melkgevende koe per jaar. Er is dus nood aan een nieuwe parameter die de melkveehouder kan helpen om mastitis vroeger op te sporen en aldus beter te beheersen. De nieuwe parameter, het gedifferentieerd somatisch celgetal (DSCC), geeft de verhouding weer tussen het aantal macrofagen en neutrofielen in de melk en biedt een nauwkeurigere weergave van de gezondheidstoestand van de uier weer dan het totale somatisch celgetal. Er is echter nog maar weinig geweten over het gedifferentieerd somatisch celgetal, daarom dit onderzoek om de parameter beter te begrijpen en gericht te kunnen inzetten.

Enkele onderzoeksvragen die te stellen zijn over het onderwerp zijn de volgende:

- “Zal de nieuwe parameter de melkveehouder helpen (sub)klinische mastitis automatisch en betrouwbaar op te volgen?”
- “Heeft het differentiëren van het somatisch celgetal een meerwaarde in mastitisbeheersingsprogramma’s?”
- “Hoe snel zal de DSCC van de melk veranderen bij uierinfecties en hoe zal deze zich herstellen wanneer de ontsteking geneest?”
- “Bestaat er een correlatie tussen DSCC en andere parameters, zoals de SCC en het vet- en lactosegehalte?”
- “Zal deze nieuwe parameter bijdragen aan een meer duurzame melkproductie?”

Met dit onderzoek moet er getoetst worden of volgende hypothesen in de praktijk gelden: “De nieuwe parameter, het differentiëren van somatische cellen, kan helpen in het vroegtijdig opsporen van (sub)klinische mastitis en aldus de impact ervan te verkleinen.”; “De DSCC zal een meerwaarde bieden in mastitisbeheersingsprogramma’s en aldus bijdragen aan een meer duurzame melkproductie.”; “De DSCC verandert sneller dan de SCC en zal zich ook sneller herstellen bij een uierontsteking.”

2.2 Verzamelen van data

Voor dit thesisonderzoek werden er verschillende bronnen van data gebruikt. Allereerst werd er gedurende zeven weken een praktijkproef uitgevoerd op de Hooibeekhoeve, zoals besproken wordt in “2.2.1 Onderzoekproef”. Daarnaast zijn er twee grote datasets van de Coöperatieve Rundveeverbetering (CRV) en van MCC Vlaanderen ter beschikking gesteld waarin alle informatie die gegenereerd werd via wekelijkse MelkProductieRegistratie (MPR) staat. Dit wordt toegelicht in “2.2.2 Historische dataset”. Als laatste werd er gebruik gemaakt van de Mastiman dataset waarin onder andere een protocol wordt bijgehouden voor alle klinische mastitis cases en ook de bacteriologie voor deze cases ter beschikking wordt gesteld, dit wordt uitgelegd in “2.2.3 Klinische mastitis dataset”.

2.2.1 Onderzoeksproef

De onderzoeksproef ging door op de Hooibeekhoeve te Geel. Er werden 24 melkkoeien zeven weken lang, van 21 oktober 2019 tot 13 december 2019, individueel opgevolgd: er werd elke werkdag en één weekenddag per week een CMT-test uitgevoerd om het celgetal van elk van de vier kwartieren te schatten, de lichaamstemperatuur werd opgemeten en daarnaast werden enkele uier-, melk- en diergerelateerde parameters visueel onderzocht. Wat betreft de uier werd er gecontroleerd op een rood, hard, gezwollen of pijnlijk kwartier; wat betreft de melk werden vlokken, brokken, waterige melk of bloed in de melk opgespoord en ten slotte werd er nagegaan of de eetlust van de dieren in orde was en of de ogen niet diep lagen (dit kan wijzen op een colimastitis). Een keer per week werd er van de 24 dieren van elk van de vier kwartieren een staal genomen voor bacteriologisch onderzoek (zie 2.2.1.6). Tijdens elke melking werd er een monster genomen waarvan de melksamenstelling, de LDH, het OCC-celgetal en de conductiviteit werd geanalyseerd. De DSCC werd in MCC Vlaanderen geanalyseerd met twee Foss-toestellen zoals beschreven in 1.3.4.2.

Voor elk van de bovenstaande onderzochte onderdelen werden er scores toegekend per dier met behulp van een scoreformulier (zie Tabel 2-1: Scoreformulier onderzoeksproef).

Tabel 2-1: Scoreformulier onderzoeksproef

VMS	Dier	Nr.	†	CMT				Uier				Melk				Koe			Opm.	BO		
				LV	RV	LA	RA	Rood	Hard	Zwelling	Pijn	Vlokken	Brokken	Waterig	Bloed	Eetlust	Koorts	Ogen				

Er werd een verscheidenheid aan dieren geselecteerd voor deze proef (zie Tabel 2-2: Geselecteerde dieren). Een eerste indeling gebeurde op basis van de pariteit. De helft van de dieren zijn van pariteit 1, de andere helft pariteit 2 of meer. Als tweede werden de dieren opgedeeld op basis van hun lactatiestadium op 21/10/2019. De helft van de vaarzen waren minder dan 60 dagen in lactatie, de andere helft meer dan 60 dagen in lactatie (DIL). Idem voor de tweede- of meerderekalkskoeien: de ene helft was minder dan 60 DIL, de andere meer dan 60 DIL.

Tabel 2-2: Geselecteerde dieren

<i>Diernummer</i>	<i>Pariteit = 1</i>	<i>Pariteit > 1</i>	<i>DIL < 60</i>	<i>DIL > 60</i>
8640	X		X	
8646	X		X	
8634	X		X	
8636	X		X	
8641	X		X	
8644	X		X	

8615	X		X
8626	X		X
8630	X		X
8632	X		X
8637	X		X
8639	X		X
8604		X	X
8608		X	X
8623		X	X
5866		X	X
5874		X	X
7823		X	X
6036		X	X
6040		X	X
8620		X	X
9604		X	X
9611		X	X
910		X	X

2.2.1.1 *Temperatuur*

Alle dieren werden dagelijks rectaal getemperatuur met een digitale thermometer. Wanneer de lichaamstemperatuur hoger was dan 39,5 °C, werd er bij 'koorts' score 1 toegekend. Zo niet, werd score nul toegekend.

2.2.1.2 *CMT*

Het somatisch celgetal werd geschat met behulp van een CMT-test. Dit gebeurt in een zogenaamde vierkwartierschaal, die grondig gereinigd wordt voor gebruik (zie Figuur 2-1: 1). Eerst wordt iedere speen voorgestraald, omdat in de eerste melkstralen vaak een hoge concentratie witte bloedcellen aanwezig zijn (2). Daarna wordt in elk van de vier schaaltes een kleine hoeveelheid melk gebracht (3), waarna de overtollige melk weggegoten wordt totdat er in elk schaalte twee milliliter melk overblijft (4). Nadien wordt er twee milliliter van het CMT-reagens toegevoegd per schaalte (5; dit komt overeen met één pompje). Ten slotte wordt de vierkwartierschaal gedurende 15-20 seconden rondgedraaid om een vermenging te creëren (6). Het gebruikte reagens, de Keno™test van CID Lines, Ieper, België combineert een verslijming en een kleurverandering om een verhoogd celgetal duidelijk te maken.



Figuur 2-1: Gebruik CMT-test (geraadpleegd van <http://www.dacnoordwolde.nl/plaatjes-landbouw/rund/koeien/instructiekaart%20cmt%20test.pdf>)

Score nul werd toegewezen aan negatieve testen waar er geen enkele verslijming of kleurverandering te zien was. Het celgetal van deze melk ligt tussen 0 en 200 000 cellen per milliliter.


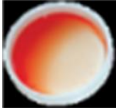
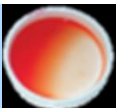

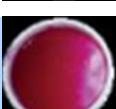
Melk met een celgetal van om en bij de 150 000 – 200 000 cellen per milliliter vertoont bij menging met het reagens een lichte verslijming, die niet standvastig is en verdwijnt na tien seconden. Aan deze testen wordt een score 'S' toegeschreven: sporen van verslijming.

Een positieve CMT-test creëert een verslijmde substantie die standvastig is, maar wel nog goed vloeibaar. Het celgetal van deze melk ligt tussen 150 000 en 300 000 cellen per milliliter en hieraan wijzen we score 1 toe.

Een sterk positieve CMT-test zorgt voor een gel die kleeft aan het schaalpje. Het is sterk aaneenklevend en reeds verkleurd. Deze stalen hebben een celgetal van 300 000 – 1 000 000 cellen per milliliter en krijgen score 2.

Stalen met een celgetal van één miljoen cellen per milliliter en hoger krijgen score 3. De gevormde substantie is vergelijkbaar met eiwit, is zeer sterk verkleurd en zeer dik.

Tabel 2-3: CMT-scores

<i>CMT-score</i>	<i>Resultaat</i>	<i>Celgetal (cellen per milliliter)</i>	<i>Kleurindicatie</i>
0	Vloeibaar zonder gel	0 – 200 000	
Sporen (S)	Sporen van gel, weg na 10 seconden	150 000 – 200 000	
1	Lichte gel, standvastig	150 000 – 300 000	
2	Gel, substantie kleeft aan schaalpje	300 000 – 1 000 000	
3	Sterke gel, vergelijkbaar met eiwit	> 1 000 000	

2.2.1.3 Uier

Alle kwartieren van de uier werden visueel en via palpatie gescoord op afwijkingen. Roodheid, een hard kwartier, een gezwollen kwartier of pijn werd gequoteerd met nul (afwezig) of één (aanwezig). Een afwijking aan de uier wijst op een infectie.

2.2.1.4 Melk

De melk werd eveneens visueel gescoord op afwijkingen zoals vlokken of brokken in de melk, waterige melk of bloedbimenging. Abnormaliteiten werden opgespoord door middel van voorstralen. Waterige melk wijst op een colimastitis. De aanwezigheid van een afwijking werd gescoord met één, de afwezigheid werd gequoteerd met nul.

2.2.1.5 Koe/systemisch

Onder de hoofding 'koe' werd de algemene fysieke toestand van de koe gescoord. Met name de eetlust, koorts en de ligging van de ogen werden bijgehouden. Afwezigheid van eetlust werd opgespoord aan de hand van een ingevallen pens/hongergroeve, koorts werd aangeduid als de lichaamstemperatuur hoger was dan 39,5 °C (zie 2.2.1.1

Temperatuur) en 'ogen' kregen de score 1 als de ogen diep lagen.

2.2.1.6 Bacteriologisch onderzoek

Gedurende de gehele looptijd van de praktijkproef werd één keer per week, op maandag, van elke koe op kwartierniveau een staal genomen. Deze stalen werden onderzocht in het Melkcontrolecentrum Vlaanderen. Deze organisatie is door BELAC geaccrediteerd om alle routine- en diagnostische melktesten uit te voeren. Voor mastitisonderzoek houdt ze zich aan de richtlijnen van de National Mastitis Council. De monsters werden, gezien de praktijkomstandigheden, zo steriel mogelijk genomen en koel bewaard. In het laboratorium wordt 0,01 milliliter melk uitgespreid op een aesculine bloedagarplaat aerob geïncubeerd voor 24 uur. Hierna wordt de voedingsbodem beoordeeld op de groei van micro-organismen.

Bij groei wordt er nog eens uitgeplaat op een McConckey-agarplaat. Wanneer er groei wordt waargenomen van minstens één kolonie, wordt de melk als cultuurpositief aanschouwd. De manier waarop de kolonies groeien, evenals het resultaat van een gram-kleuring, wordt gebruikt om gram-negatieve bacteriën te scheiden van gram-positieve. Een positieve katalasetest onderscheidt stafylokokken van bacteriën van de *Streptococcus-Enterococcus* species. Binnen de stafylokokkengroep wijst de DNase-activiteit *staphylococcus aureus* uit en geen DNase-activiteit duidt op andere *Staphylococcus* sp. Isolaten uit de streptokokken-enterokokkengroep worden verdeeld op basis van de aesculinereactie. Binnen de aesculine-negatieve kokken maakt de CAMP-test het mogelijk om *Streptococcus dysgalactiae* te onderscheiden van *Strep. Agalactiae*. Binnen de aesculine-positieve kokken worden de groeikenmerken, gal-aesculine-agar en 6,5% NaCl gebruikt om *Streptococcus uberis* te differentiëren van andere aesculine-positieve kokken zoals enterokokken, lactokokken en aerokokken. Binnen de gram-negatieve bacteriën wordt de verschijning ervan op de McConckey-agar, het resultaat van de KOH-test, de indolproductie en de drievoudige suikerijzertest gebruikt om onderscheid te maken tussen *Escherichia coli*, *Klebsiella* species en anderen. Andere bacteriën zoals *Corynebacterium bovis*, gisten, schimmels, *Bacillus* sp. enzovoort worden geïdentificeerd op basis van hun verschijning op de aesculine bloedagarplaat en/of aan de hand van hun morfologie op de gram-kleuring. Indien er meer dan twee verschillende soorten kolonies werden geïdentificeerd, wordt het monster als gecontamineerd gedefinieerd (Supré et al., 2014).

2.2.2 Historische dataset

Er zijn twee grote, historische datasets van CRV en MCC Vlaanderen ter beschikking gesteld. Deze bevatten alle informatie die gegenereerd werd via wekelijkse MelkProductieRegistratie (MPR). De eerste dataset waarmee er gewerkt werd, was afkomstig van CRV en werd aangeleverd door de Hooibeekhoeve. Deze bevat onder andere het levensnummer van het dier, de datum van staalname, het lactatiestadium, het aantal dagen in lactatie, de melkgift, het gecorrigeerd vet- en eiwitpercentage, het lactosegehalte, het celgetal, het ureumgetal, het aantal keer verhoogd celgetal enzovoort. Wat betreft een verhoging van het celgetal wordt er een opsplitsing gemaakt in vaarzen en multipare koeien. Een verhoogd celgetal voor vaarzen wil zeggen dat ze een celgetal van meer dan 150 000 cellen per milliliter hebben en voor koeien dat ze een celgetal van meer dan 250 000 cellen per milliliter hebben.

De tweede dataset was afkomstig van MCC Vlaanderen en bevatte onder andere de datum waarop het staal werd aangemeld in Lier, het celgetal, de DSCC, het vet-, eiwit-, en lactosegehalte, de pH.... Voor de DSCC wil dit concreet zeggen dat het gaat om metingen vanaf mei 2018, maar pas vanaf september 2018 is er voor elk melkstaal een DSCC-analyse beschikbaar. Dit komt omdat het tweede Fossomatic DC toestel pas in augustus 2018 geïnstalleerd is. De twee datasets, die heel 2018 doorlopen, bevatten beide dus zeer uitgebreide informatie van alle bemonsterde koeien van de Hooibeekhoeve.

2.2.3 Klinische mastitis dataset

Sinds 2015 wordt er op de Hooibeekhoeve een protocol toegepast op alle klinische mastitisgevallen. Deze informatie wordt bijgehouden in de Mastiman dataset. Er worden klinische scores bijgehouden op 0, 3, 7, 14 en 21, vergelijkbaar met wat toegepast is tijdens de praktijkproef (lichaamstemperatuur, CMT-test, klinische scores van melk, uier en algemeen

voorkomen van de koe...). Op dag 0, 7, 14 en 21 wordt er een monster genomen van het geïnfecteerde kwartier en opgestuurd voor bacteriologisch onderzoek. Voor de kiem aanwezig op dag 0 wordt er eveneens een antibiogram opgesteld.

2.3 Dataverwerking

Voor de uitwerking van deze masterthesis waren er dus veel data ter beschikking. Met al deze informatie wordt getracht een antwoord te vinden op de onderzoeksvragen. Alle data werden gekoppeld (zie 2.3.1) met Matlab en geanalyseerd enerzijds met behulp van Matlab en anderzijds via grafieken gemaakt in Excel (zie 2.3.2). De DSCC-parameter kon met behulp van de twee historische datasets gelinkt worden aan andere parameters.

2.3.1 Matlab

Matlab is een samentrekking van Matrix Laboratory. Dit is software die uitgegeven is door The Mathworks in Natick, Massachusetts in de Verenigde Staten. Het programma werd gebruikt om alle data waarmee er gewerkt werd in dit onderzoek statistisch te verwerken en resultaten te genereren. De DSCC-parameter kon met behulp van de twee historische datasets gelinkt worden aan andere parameters. Er waren echter enkele beperkingen in verband met de twee historische datasets. De dataset van MCC Vlaanderen bevatte de DSCC-waarden voor elk monster, maar niet de koenummer. De dataset van de Hooibeekhoeve bevatte per koenummer alle informatie zoals beschreven in "2.2.2 Historische dataset", met uitzondering van de DSCC-waarden. Op basis van het celgetal, lactosegehalte, het ureumgetal, de datum van monsternamen en de datum van aanmelding bij MCC werden de gegevens van beide datasets gekoppeld. Het ureumgetal werd niet op dezelfde manier weergegeven in beide bestanden: de ene keer in milligram per liter en de andere keer in milligram per deciliter, er moest dus een factor 10 én een afronding in rekening gebracht worden. De datum van aanmelding was maximum drie dagen na de staalname. Op basis van al deze criteria was het mogelijk om de DSCC te koppelen aan de koenummers en bijbehorend aan alle andere gegevens. Koppeling op basis van het vet- en eiwitgehalte was niet mogelijk omdat de waarden van deze parameters in de dataset afkomstig van CRV gecorrigeerd werden. Dit omdat er slechts één MPR-staal per koe genomen werd in de melkrobot en niet een 's ochtends en een 's avonds. De waarden in de dataset van MCC zijn de ruwe analyseresultaten en werden dus niet gecorrigeerd.

Om een algemeen beeld te krijgen van de data werden met Matlab enkele statistische kengetallen berekend. Om deze parameters te berekenen en voor alle verdere testen werden de nullen in de datasets weggelaten om het verkeerdelijk nemen van beslissingen te vermijden. Dit omdat de DSCC-meting die hoort bij een SCC lager dan 50 000 cellen per milliliter onbetrouwbare resultaten geeft, en hierdoor automatisch een DSCC van nul wordt gegenereerd. De invloed van enkele parameters zoals de pariteit, het aantal dagen in lactatie, het somatisch celgetal en de historiek van infecties op de DSCC werd nagegaan met Kruskal-Wallis tests uitgevoerd in Matlab. De correlatie tussen DSCC en SCC werd onderzocht, alsook de eventuele correlatie met melkgift, lactosegehalte, vetgehalte, lichaamstemperatuur...

2.3.2 Excel

Het Mastiman-protocol dat toegepast wordt op de Hooibeekhoeve werd gedigitaliseerd in Excel. De resultaten worden namelijk bijgehouden op posters waarop de scores geschreven worden. Ook de resultaten van de praktijkproef werden gedigitaliseerd in Excel. Daarna werden dan grafieken gegenereerd die daarna visueel geïnspecteerd werden. Er werden grafieken gemaakt van klinische mastitis cases waarbij de daling van het vetgehalte, het lactosegehalte en de melkproductie visueel aangetoond wordt. Daarnaast werden klinische cases visueel voorgesteld waarin de snellere stijging van de DSCC ten opzichte van de SCC weergegeven wordt. Het is duidelijk zichtbaar op de grafieken dat een DSCC boven de treshold van 80 procent weldra gevolgd wordt door een stijging in SCC. Aan de andere kant werden er ook grafieken gemaakt van klinische mastitisgevallen waarbij de DSCC weer daalt beneden de 80 procent, waarna dit gevolgd wordt door een stabilisatie van het celgetal. Een geval van chronische mastitis, waarbij de DSCC continu boven de 80 procent blijft, werd eveneens voorgesteld met een grafiek gegenereerd in Excel. Er werd ook getoetst of de grafieken dezelfde patronen volgen als beschreven in de literatuur.

3 RESULTATEN

3.1 Geïsoleerde pathogenen uit bacteriologisch onderzoek

Tijdens de gehele looptijd van de proef werd er één keer per week, op maandag, een staalname gedaan op kwartierniveau van alle deelnemende koeien om bacteriologisch onderzoek op te doen. Er werden in totaal 759 monsters genomen, waarvan er 377 bacteriologisch negatief testten. De resultaten zijn te zien in Tabel 3-1: Resultaten wekelijks bacteriologisch onderzoek.

Tabel 3-1: Resultaten wekelijks bacteriologisch onderzoek

	LV	RV	LA	RA	Totaal (n)	Totaal (%)
<i>Aerobe cultuur negatief</i>	103	84	96	94	377	49,7
<i>Staphylococcus</i> sp.	67	87	61	70	281	37,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	3	8	12	24	3,2
<i>Aerococcus</i> sp.	0	1	4	1	6	0,8
<i>Corynebacterium</i> sp.	4	3	3	1	11	1,5
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	5	0	0	0	5	0,7
<i>Gisten</i>	0	0	0	1	1	0,1
<i>Schimmels</i>	0	0	0	1	1	0,1
<i>Bacillus</i> sp.	2	4	5	6	17	2,2
<i>Polybacterieel</i>	10	8	12	6	36	4,8
<i>Totaal</i>					759	100

Onder aerobe cultuur negatief wordt verstaan dat er geen enkele mastitispathogeen geïsoleerd kan worden. Dit wil echter niet per se zeggen dat er geen klinische mastitis of hoog celgetal aanwezig kan zijn. Enkele redenen hiervoor zijn: de bacterie is reeds verdwenen uit het aangetaste kwartier (bijvoorbeeld *E. coli*), een recente antibioticumbehandeling onderdrukt de groei van de pathogeen in het labo of het gaat om specifieke kiemen die niet tot moeilijk groeien in-vitro (bijvoorbeeld *Mycoplasma*). In bijna de helft van de monsters (49,7 %) werd geen pathogeen teruggevonden op kwartierniveau. Tot de *Staphylococcus* species of zogenaamde niet-aureus stafylokokken behoren verschillende soorten stafylokokken met een eerder beperkte virulentie en veroorzaken meestal een milde ontsteking met slechts een lichte verhoging van het celgetal. Dit was de tweede grootste groep met 37,0 % van de stalen. *Staphylococcus aureus* is een zeer uitgesproken schadelijke majorpathogeen die zich makkelijk handhaaft op de uierhuid en vooral verspreid wordt tijdens het melken. Dit is ook te zien aan de spreiding van de pathogeen naargelang de kwartieren: de helft van de isolaties gebeurde in één kwartier (rechtsachter) en meer dan 80 % in kwartieren rechtsachter en linksachter samen. 8 dieren van de 24 waren tijdens de proef één of meer keer geïnfecteerd met *S. aureus*. De pathogeen evolueert meestal tot een chronische en moeilijk te behandelen uierinfectie. *Aerococcus* species zijn aesculine-positieve kokken (zij reageren dus positief op

de aesculine-test: er vindt een kleurreactie plaats door hydrolyse) die eerder uitzonderlijk geïsoleerd worden uit melkmonsters van klinische mastitis of kwartieren met een hoog celgetal. De zes besmettingen die werden gedetecteerd deden zich telkens voor bij verschillende koeien. *Corynebacterium* sp. is een minorpathogeen en wordt het vaakst geïsoleerd uit subklinisch besmette kwartieren, omdat de ontstekingsreactie en de bijbehorende verhoging van het celgetal eerder beperkt blijven. De bacterie werd gevonden bij zes verschillende dieren, waarbij het celgetal telkens beperkt bleef tot maximum 297 000 cellen per milliliter. *Streptococcus dysgalactiae* is een majorpathogeen die zowel in de omgeving als op het dier zelf kan overleven. *S. dysgalactiae* veroorzaakt meestal klinische mastitis met een verhoging van het celgetal. De pathogeen werd vijfmaal teruggevonden bij koe 5866 ter hoogte van kwartier linksvoor gedurende week 3 tot en met week 7 van de proef. Deze koe vertoonde gedurende de hele proef regelmatig een licht verhoogde temperatuur tot koorts en had steeds een sterk positieve CMT op dat kwartier met waarden voor het celgetal van 776 000 cellen per milliliter tot meer dan 7 000 000 cellen per milliliter. Schimmels worden zelden geïsoleerd uit melkmonsters. Ze komen voor in de omgeving en kunnen in de uier terechtkomen bij het onvoldoende hygiënisch toedienen van uierpreparaten. Typerend is dat ze niet reageren op antibiotica en hierdoor kent de mastitis vaak een klinisch verloop. Er werd tijdens de monsternames maar bij één staal schimmels teruggevonden, namelijk bij koe 8604 tijdens de eerste week (21 oktober 2019). Ze had geen klinische symptomen en het celgetal was eveneens niet verhoogd. Net zoals bij schimmels, werd er maar één maal gisten geïsoleerd uit alle staalnames. Dit gebeurde bij koe 9611 tijdens de zevende week van de onderzoeksproef. Deze koe vertoonde een positieve CMT-test een dag vóór de staalname en op de dag van staalname zelf (1 en 2 december 2019) met een celgetal van 1 594 000 cellen per milliliter. Tot 6 dagen na de monstername vertoonde de koe op dat kwartier een verhoogde CMT-test. Gisten reageren net zoals schimmels niet op antibiotica en worden zowel bij klinische als subklinische mastitis geïsoleerd. Bij 2,2 procent van de stalen werd *Bacillus* sp. teruggevonden. Deze bacteriën zouden mastitis kunnen veroorzaken, maar meestal gaat het om een contaminatie van het monster. In 4,8 procent van de gevallen was de uitslag polybacterieel. Dit betekent dat er drie of meer verschillende organismen geïsoleerd werden doordat er onvoldoende hygiënisch gewerkt werd tijdens de monstername of door suboptimale bewaring of transport van de monsters.

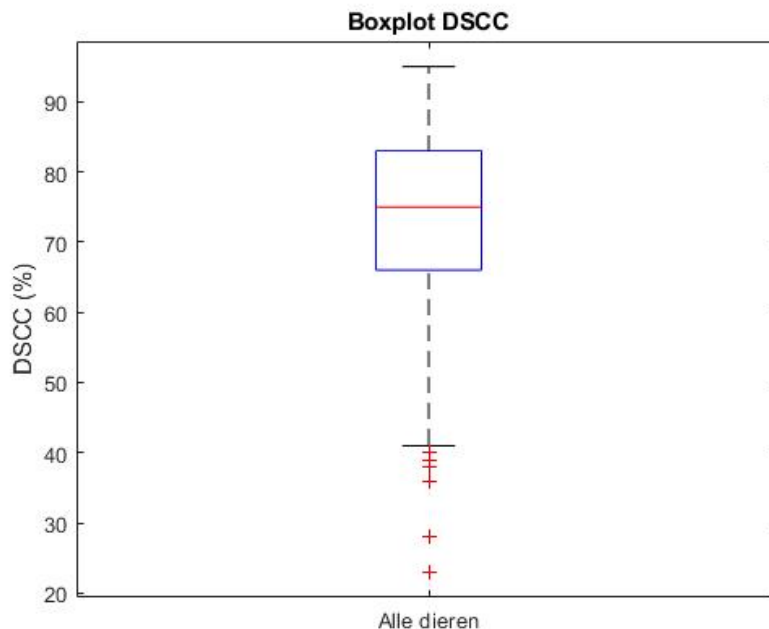
3.2 Statistische kengetallen

Van alle beschikbare informatie van MCC Vlaanderen, dit wil zeggen van begin 2018 tot eind 2019, werden verschillende statistische kengetallen berekend om een goed beeld te krijgen van deze kengetallen.

Tabel 3-2: Statistische kengetallen

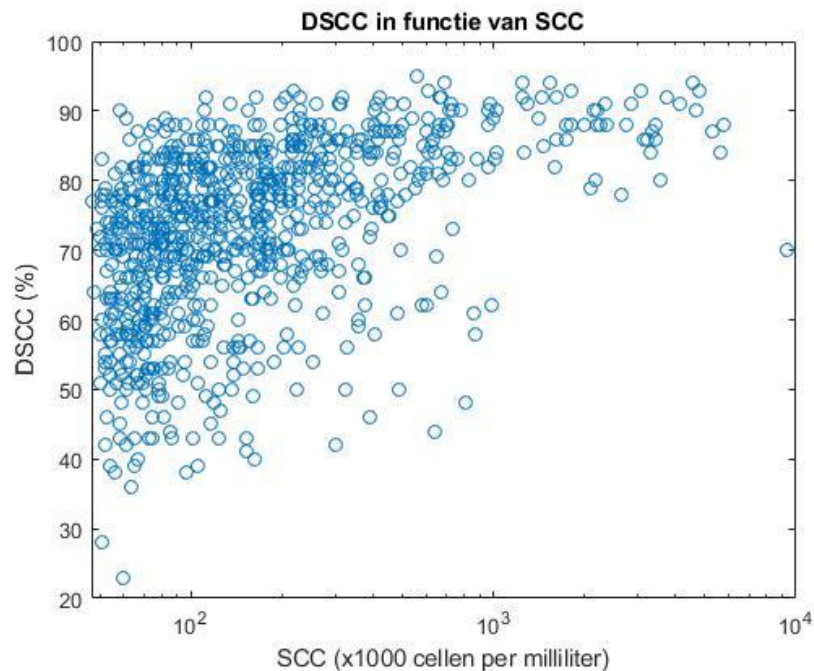
	DSCC (%)	SCC (x1000 cellen/ml)
Minimum	23	1
Maximum	95	20 533
Gemiddelde	73,00	195,41
Standaardafwijking	11,64	632,85
Mediaan	75	59
Q1	66	27
Q3	83	141

Tabel 3-2 geeft de statistische kengetallen van de gegevens weer. De bruikbare DSCC-waarden liggen tussen 23 % en 95 %. Dit betreft enkel de bruikbare gegevens, want een SCC van lager dan 50 000 cellen per milliliter geeft automatisch een DSCC van 0% omdat de meting ervan niet betrouwbaar is (Schwarz et al., 2019). De nullen werden uit de dataset geëlimineerd omdat deze aanleiding zouden geven tot verkeerde conclusies. Het gemiddelde ligt op 73,00 %. Hieruit volgt dat het percentage macrofagen 27,00 % van het totale celgetal bedraagt. De standaardafwijking bedraagt 11,64 %. De mediaan van de DSCC-waarden is 75 %, dit is te zien op de rode lijn van de boxplot op Figuur 3-1, en de helft van de waarden liggen tussen 66 en 83 %. Er is een vrij grote spreiding aanwezig in de data, alsook enkele uitschieters naar beneden. De resultaten van de dataset liggen in de buurt van eerder gevonden resultaten in andere studies. Het onderzoek van Damm et al. in 2017, dat zich focuste op de robuustheid van de analysemethode van de DSCC, vond gemiddelde DSCC-waarden van 72,68 tot 76,12 procent, met een minimum van 20 % en een maximum van 96 %.

**Figuur 3-1: Boxplot DSCC**

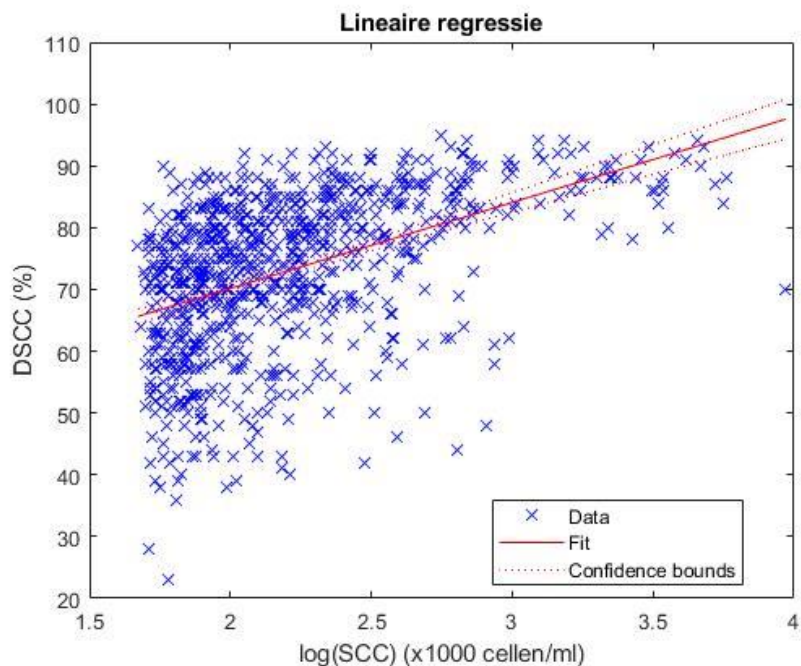
3.3 Relatie DSCC-SCC

3.3.1 Correlatie



Figuur 3-2: DSCC in functie van SCC

Zoals in Hoofdstuk 2 “Materiaal en methoden” is beschreven, werd de SCC en de DSCC van de historische datasets van CRV en MCC gekoppeld om de onderlinge relatie te onderzoeken. De SCC van de metingen varieert van 1000 cellen per milliliter tot 20 533 000 cellen per milliliter. De DSCC-resultaten varieerden van 28 tot 95 procent. Ze vertonen beide een vrij grote spreiding, analoog met de studie van Damm et al. in 2017 waar de DSCC varieerde van 34 tot 79 procent. Dit patroon (Figuur 3-2) is reeds teruggevonden in de literatuur (Kirkeby et al., 2020; Schwarz et al., 2019). Brede ranges van DSCC zijn beschreven bij lage waarden van SCC, maar als de SCC stijgt, zal de DSCC stijgen en zich in een minder groot bereik bevinden (Wall et al., 2018). Dat er zowel hoge als lage DSCC-waarden horen bij lage SCC-waarden, wil zeggen dat er meerdere fasen van een infectie vertegenwoordigd worden. Dit is ook reeds gesuggereerd door Aref et al. in 2018. Hoge DSCC-waarden (dit wil zeggen veel PMN's) in monsters met een lage SCC, kunnen gebruikt worden als indicator voor mastitis. Dit is zeer interessant omdat een lage SCC als niet-verdacht wordt beschouwd (Damm et al., 2017). Hoge SCC-waarden (meer dan 200 000 cellen per milliliter) in combinatie met hoge DSCC-waarden (meer dan 80 procent) zijn indicators voor vroege infectiefasen van mastitis. Er worden namelijk veel neutrofielen aangetrokken om een immuunreactie te induceren. Aan de andere kant worden hoge SCC-waarden in combinatie met lage DSCC-waarden gerelateerd aan de herstellende fase van de infectie (Wall et al., 2018), omdat lage DSCC-waarden overeenkomen met een hoog percentage macrofagen, die een goede uiergezondheidstoestand weerspiegelen (Damm et al., 2017).



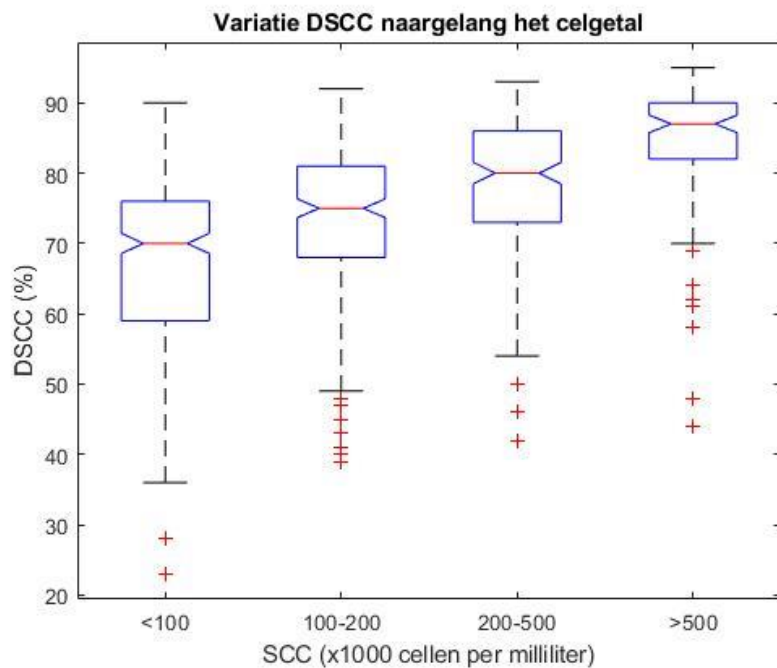
Figuur 3-3: Lineaire regressie DSCC - logSCC

Op Figuur 3-3 is het lineaire verband te zien tussen de DSCC en de logaritme van de SCC. Het is duidelijk dat wanneer de logaritme van de SCC stijgt, de DSCC ook stijgt. Meerdere auteurs van literatuur vonden al een positieve correlatie tussen logSCC en DSCC (Damm et al., 2017; Kirkeby et al., 2020; Schwarz et al., 2011). Ook in deze dataset is die trend terug te vinden. De p-waarde van de test is lager dan 0,001 (hij benadert zelfs de nul) wat een zeer sterk significante aanduiding is voor een lineair verband. De correlatie zelf is echter matig tot zwak: $R^2=0,22$. Het lineaire model geeft volgende formule: $DSCC = 13,89 \times \log(SCC) + 42,41$. Ander onderzoek (Damm et al., 2017) vond ook dat DSCC-waarden toenamen naarmate de logSCC-waarden toenamen (zie Figuur 1-7). Zij vonden eveneens een zwakke correlatie ($R^2=0,15$).

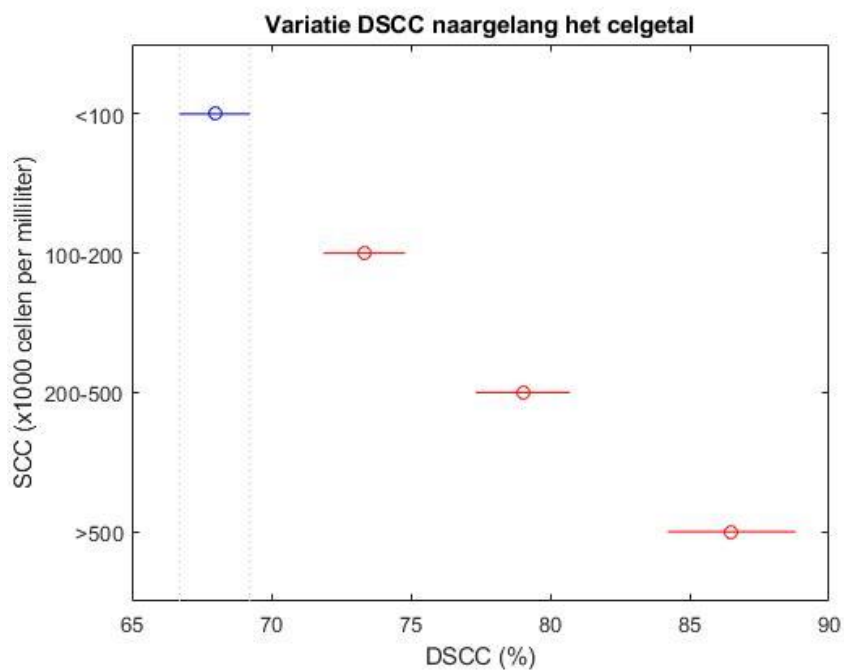
3.3.2 Relatie

Om de relatie tussen het somatisch celgetal en het gedrag van de DSCC na te gaan, wordt er een Kruskal-Wallis test uitgevoerd op SCC- en DSCC-data van de historische datasets. De waarden van het somatisch celgetal worden hiervoor opgesplitst in vier categorieën: kleiner dan 100 000 cellen per milliliter, tussen 100 000 en 200 000 cellen per milliliter, tussen 200 000 en 500 000 cellen per milliliter en groter dan 500 000 cellen per milliliter. De H_0 -hypothese, alle gemiddeldes zijn gelijk, wordt verworpen. De p-waarde van de test benadert namelijk de nul. Op Figuur 3-4 is te zien dat hoe hoger het celgetal stijgt, hoe hoger de gemiddelde DSCC-waarden worden. Figuur 3-5 toont dat deze gemiddeldes significant van elkaar verschillen. Een studie van Pilla et al. in 2012 toonde aan dat er al productieverliezen optreden vanaf een celgetal van 100 000 cellen per milliliter en meerdere auteurs (Damm et al., 2017; Schwarz et al., 2011a) vonden dat het gehalte aan PMN's significant positief gecorreleerd zijn aan de DSCC. Dit sluit aan bij het gevonden resultaat: de DSCC van de eerste categorie is het laagste, wat wil zeggen dat er het meeste macrofagen aanwezig zijn. Macrofagen zijn de typische bewoners van gezond uierweefsel. Een SCC van 200 000 cellen per milliliter wordt tot op de dag van vandaag gebruikt als "magische grenswaarde" om de uiergezondheid te beoordelen.

Op Figuur 3-4 is te zien dat de gemiddelde DSCC-waarden horende bij SCC-waarden lager dan 200 000 cellen/ml beneden de 80 % blijven. Een DSCC van 80 % kan gebruikt worden als nieuwe threshold om te beoordelen of een uier gezond is of niet.



Figuur 3-4: Invloed SCC op DSCC



Figuur 3-5: Invloed SCC, vergelijking van gemiddeldes

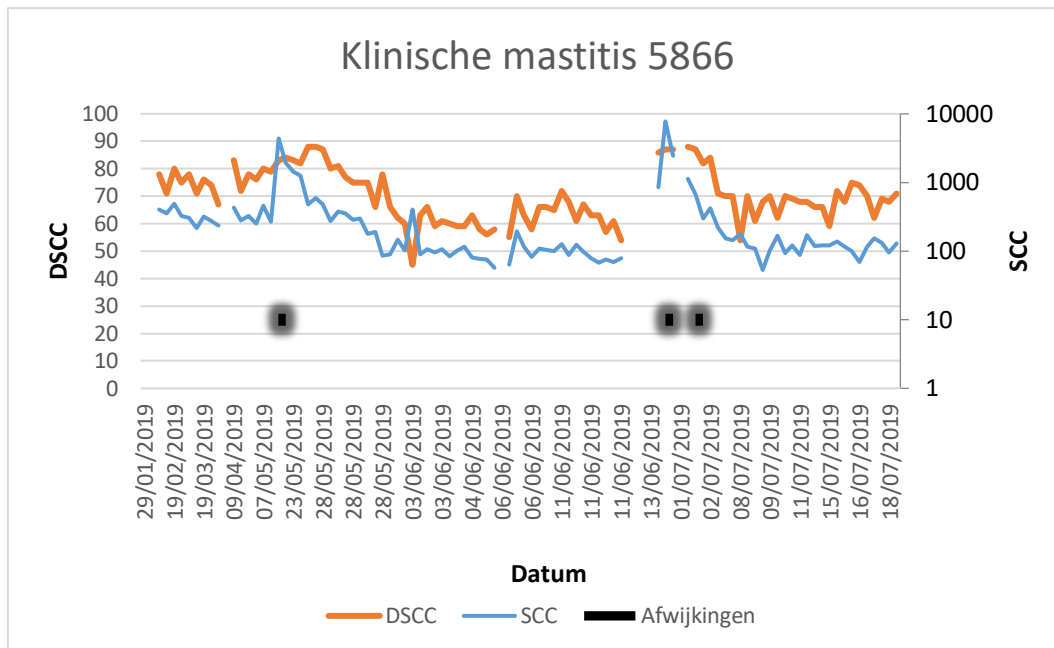
3.3.3 Variatie DSCC

3.3.3.1 Stijging DSCC

Zoals reeds aangehaald in diverse literatuur (Schwarz et al., 2011; Pilla et al., 2012), stijgt het gedifferentieerd celgetal sneller dan het somatisch celgetal. Dit is onder andere te zien in Figuur 3-6, Figuur 3-7 en Figuur 3-8. Deze figuren werden gegenereerd op basis van de Mastiman datasets voor klinische mastitisgevallen. In de datasets zijn er verschillende metingen waarbij de DSCC stijgt, maar waarbij de SCC nog niet gestegen is. Dit is niet altijd het geval in de beschikbare datasets, maar wel vaak, zodat er aangenomen kan worden dat deze drie besproken cases geen alleenstaande gevallen zijn. Omdat de MPR wekelijks gebeurt, kan het zijn dat bij de ene MPR-staalname nog niets aan de hand is en zowel de SCC als de DSCC laag zijn, maar de infectie bijvoorbeeld een dag na de stalname plaatsvindt. Bij de volgende MPR zal dan zowel de DSCC als de SCC gestegen zijn. De snellere stijging van de DSCC ten opzichte van de SCC kon dus niet statistisch aangetoond worden.

Verhoogde DSCC-waarden kunnen gebruikt worden als een vroege indicator voor mastitis (Wall et al., 2018). Een DSCC-drempel voor de differentiatie van een gezond en een geïnfecteerd kwartier zou 80 % kunnen zijn. Een DSCC-waarde van meer dan 80 % wordt dus vaak (even later) gevolgd door een stijging van het somatisch celgetal. Enkele voorbeelden hiervan worden onderstaand geïllustreerd in de genoemde figuren, die een voor een worden besproken. Een andere studie, bijvoorbeeld deze van Wall et al. in 2018, zette deze threshold op 86 %.

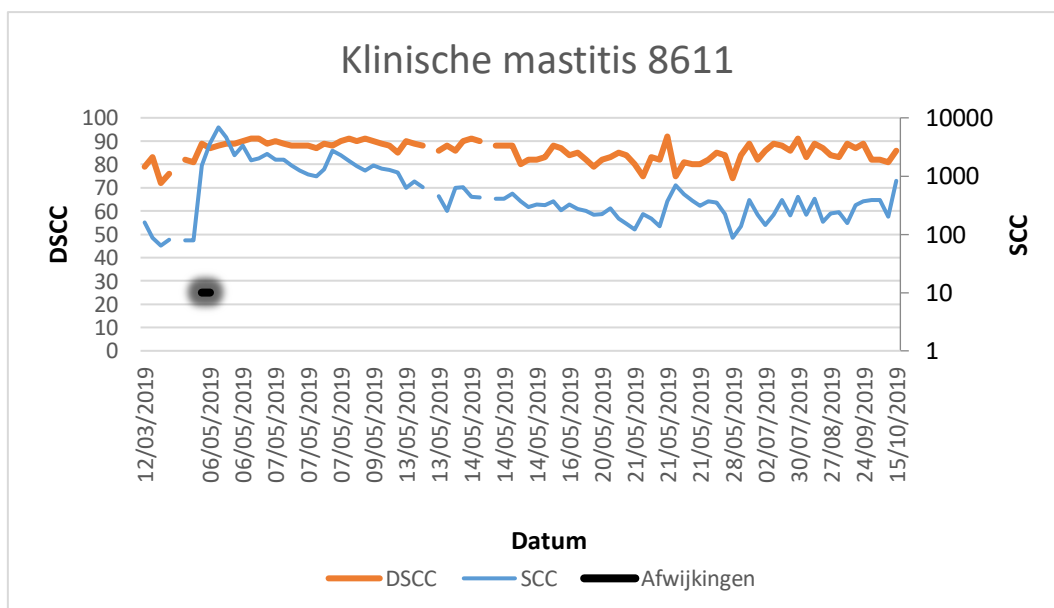
Op Figuur 3-6 is de klinische case van koe 5866 te zien. Bij deze koe stijgt de DSCC voor de eerste maal boven de 80 % uit op 09/04/2019 (namelijk 83 %). Daarna zakt de DSCC lichtjes, maar op 07/05/2019 bereikt de DSCC weer de 80 %. Twee weken later, op 21/05/2020, stijgt de SCC tot boven de 4 miljoen cellen per milliliter. Het alarmsignaal van de DSCC boven de threshold van 80 % werd dus gevolgd door klinische mastitis met bijbehorende stijging van het celgetal. Op 21 mei werden er ook vlokken waargenomen afkomstig van het desbetreffende kwartier (zie zwarte aanduiding op Figuur 3-6). Bacteriologisch onderzoek kon geen kiem identificeren. Wanneer de DSCC enkele dagen later (op 28 mei 2019) terug onder de 80 % daalt, is het celgetal ook al gedaald tot 355 000 en later genormaliseerd tot 85 000 cellen per milliliter. In de periode hierna blijft de DSCC lager dan 80 procent en blijft het celgetal normaal. Even later, op 25 juni 2019, hervalt de koe weer en als we dan kijken naar DSCC en SCC zien we dat de DSCC > 80 % en de SCC gestegen is tot 7,7 miljoen cellen per milliliter. De monstername wees uit dat het kwartier in kwestie, linksvoor, besmet was met *Streptococcus dysgalactiae*. Er werd op dag 0, 3 en 7 een positieve CMT-test gedaan en er werden eerst brokken en daarna vlokken gedetecteerd (zie zwarte markering op Figuur 3-6).



Figuur 3-6: Klinische mastitis 5866

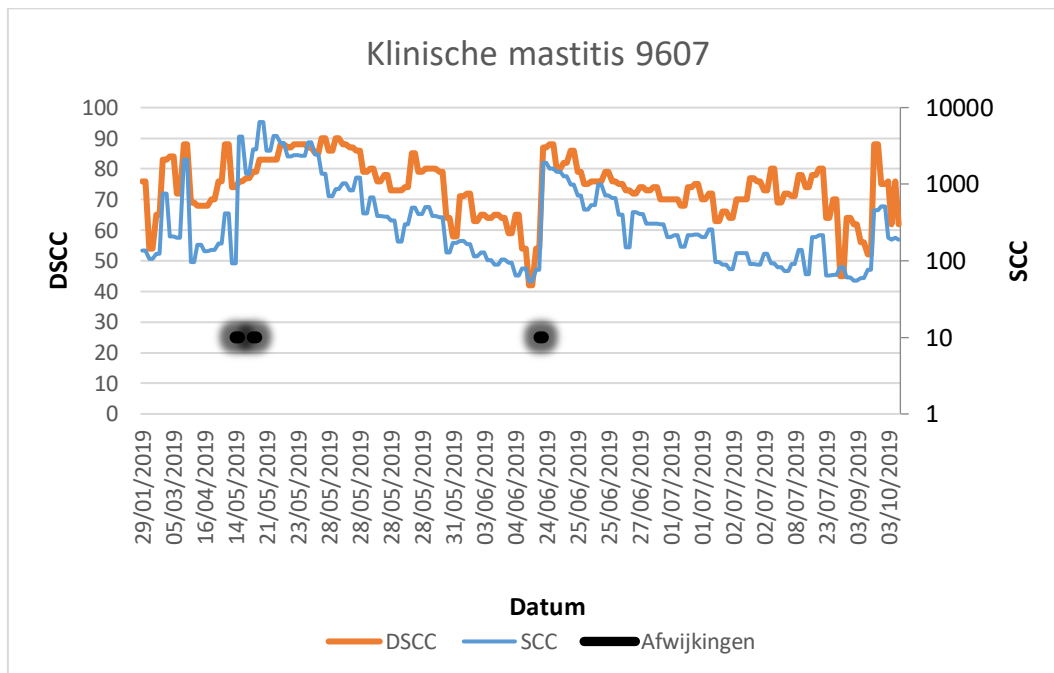
Voor koe 8611 zien we op

Figuur 3-7 dat de DSCC boven de threshold van 80 % stijgt op 23 april 2019, toch is het celgetal dan nog niet gestegen: de analyse wijst een SCC van 78 000 cellen per milliliter uit. Bij de eerstvolgende staalname op 30 april 2019 is het celgetal reeds gestegen tot 1 534 000 cellen per milliliter en blijft de DSCC hoog. De infectie vond plaats rechtsvoor. Op de dag van de start van de klinische symptomen (30 april) werd een staal genomen voor bacteriologisch onderzoek: de geïsoleerde kiem was *Streptococcus dysgalactiae*. Echter, 21 dagen later op 21/05/2020, was de pathogeen nog altijd terug te vinden in het genomen monster. Dit kan verklaren waarom de DSCC niet mooi opnieuw daalt enkele dagen na de infectie, zoals bijvoorbeeld bij de vorige case (koe 5866). Er werden op de dag van staalname ook heel wat klinische symptomen waargenomen, zoals een rood, hard en pijnlijk kwartier, waaruit waterige melk kwam met vlokken en brokken.



Figuur 3-7: Klinische mastitis 8611

Zoals te zien op Figuur 3-8, vertoont koe 9607 een lichte stijging in het celgetal, dat ook weer voorgelopen wordt door een stijging in DSCC tot 83 procent. Even later daalt de DSCC onder de 80 procent waarbij het celgetal ook weer daalt tot beneden de 200 000 cellen per milliliter. Op 7 mei 2019 is de DSCC terug gestegen tot 88 % en op 21 mei 2019 is dan de SCC gestegen tot een maximum van 6 842 000 cellen per milliliter. Het bacteriologisch onderzoek uitgevoerd op een staal van 16/05/2020 wees *Escherichia coli* uit. Dit was ook de eerste dag van de klinische symptomen. De symptomen bestonden uit een hard en gezwollen kwartier, vlokken in de melk en waterige melk (typisch voor een infectie met *E. coli*). Drie dagen later was het kwartier nog gezwollen en de melk nog steeds waterig. Tot zeven dagen na de start van de waarnemingen was de CMT-test positief. In de monsternames op dag 7, 14 en 21 kon geen pathogeen meer geïsoleerd worden: het is typisch voor deze pathogeen om snel weer te verdwijnen, de geproduceerde toxines richten echter aanzienlijke schade aan. Op de grafiek is te zien dat de koe hervalt en opnieuw serieus stijgt in DSCC en SCC. Monstername wees uit dat het ook een tweede keer ging om een *E. coli*-infectie. De infectie volgt hetzelfde stramien als de eerste keer, met dezelfde symptomen en een pathogeen die direct weer verdwijnt.



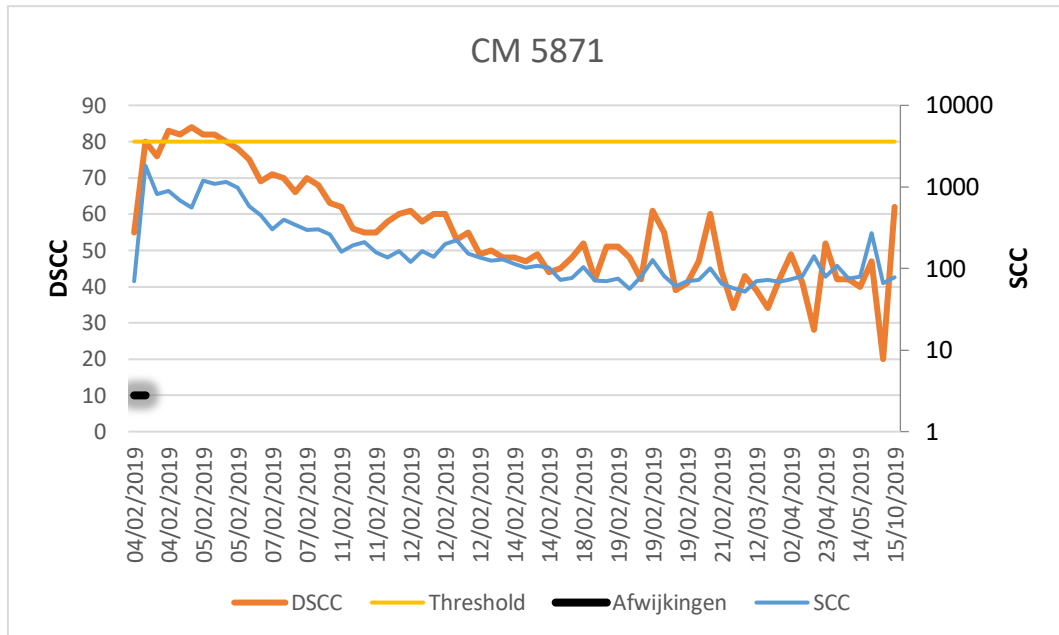
Figuur 3-8: Klinische mastitis 9607

3.3.3.2 Daling DSCC

Onderstaande figuren tonen verschillende cases van dieren met klinische mastitis. Telkens wanneer de DSCC een waarde van lager dan 80 % aanneemt en ook onder die threshold van 80 % blijft, kunnen we stellen dat het celgetal weer verlaagd is tot een normaal niveau en dat het celgetal ook gestabiliseerd is. De pathogeen is bestreden en de infectie is opnieuw hersteld. De gele horizontale lijn op de figuren is de threshold op DSCC van 80 %. Dit is voor de duidelijkheid geen threshold op SCC.

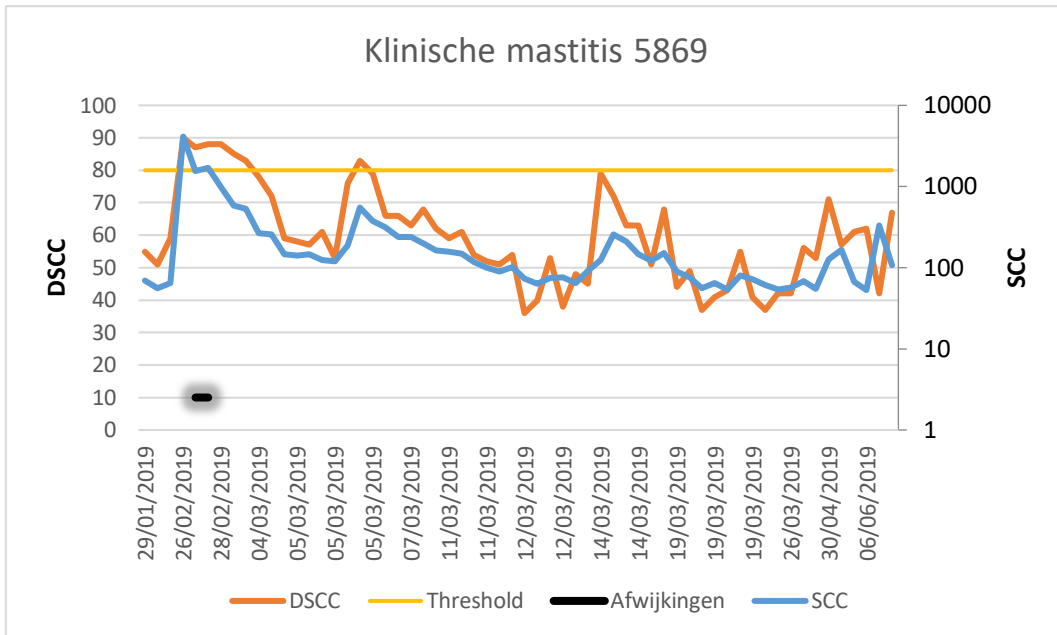
Figuur 3-9 laat de klinische case van koe 5871 zien. Het geïnfecteerde kwartier rechtsvoor toonde tot zeven dagen na de klinische waarneming een positieve CMT-test. Op dag nul was het kwartier pijnlijk en werden er brokken en vlokken gedetecteerd. De pathogeen die werd

geanalyseerd op dag nul was *Escherichia coli*, op dag 7, 14 en 21 werd geen pathogeen meer teruggevonden. Dat de (toxines van de) pathogeen aanzienlijke schade aanrichten, bewijst de positieve CMT-test en het feit dat de DSCC niet onmiddellijk weer daalt. Als de DSCC toch daalt, wil dit zeggen dat de infectie bestreden is en dat het weefsel hersteld is. Het celgetal stabiliseert analoog aan de DSCC.



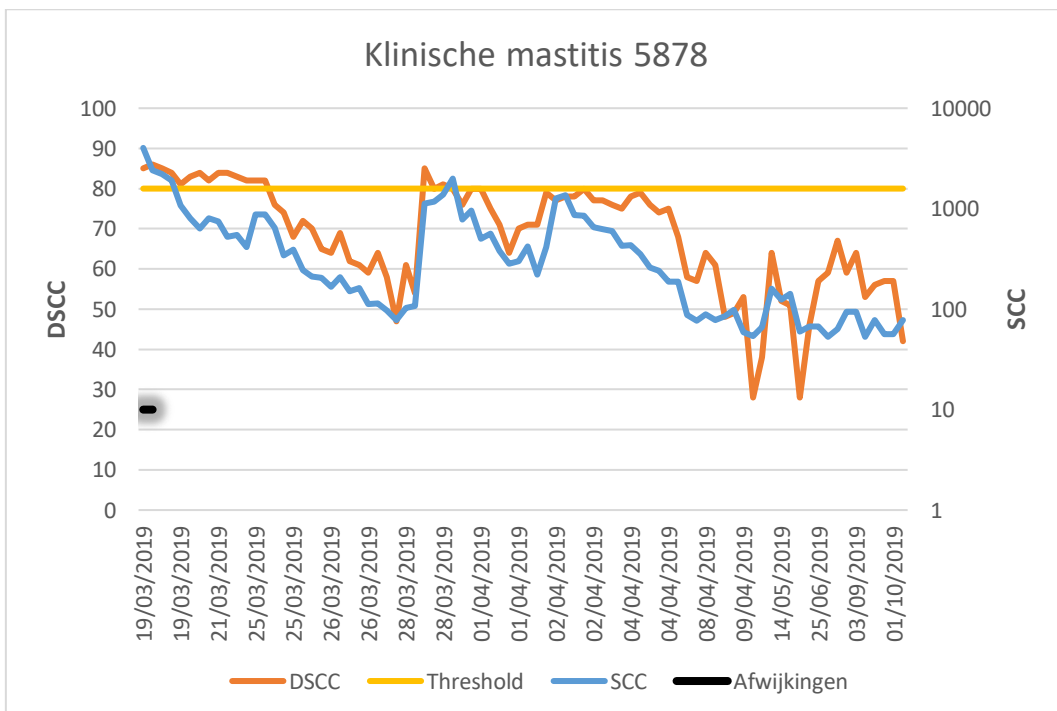
Figuur 3-9: Daling DSCC 5871

Koe 5869 (Figuur 3-10) was rechtsvoor geïnfecteerd met *Streptococcus dysgalactiae*. Op dag nul (26/02/2019) was er een zwelling waar te nemen op het desbetreffende, pijnlijke kwartier en er waren vlokken en brokken aanwezig. Op dag 7 werd er geen pathogeen meer teruggevonden, maar op dag 14 (12/03/2020) werden er wel *Staphylococcus species* geanalyseerd. Op de grafiek zijn er verschillende opstoten van DSCC waar te nemen (waarbij ook telkens het celgetal stijgt), wat wil zeggen dat er toch nog een sluimerende infectie aanwezig is.



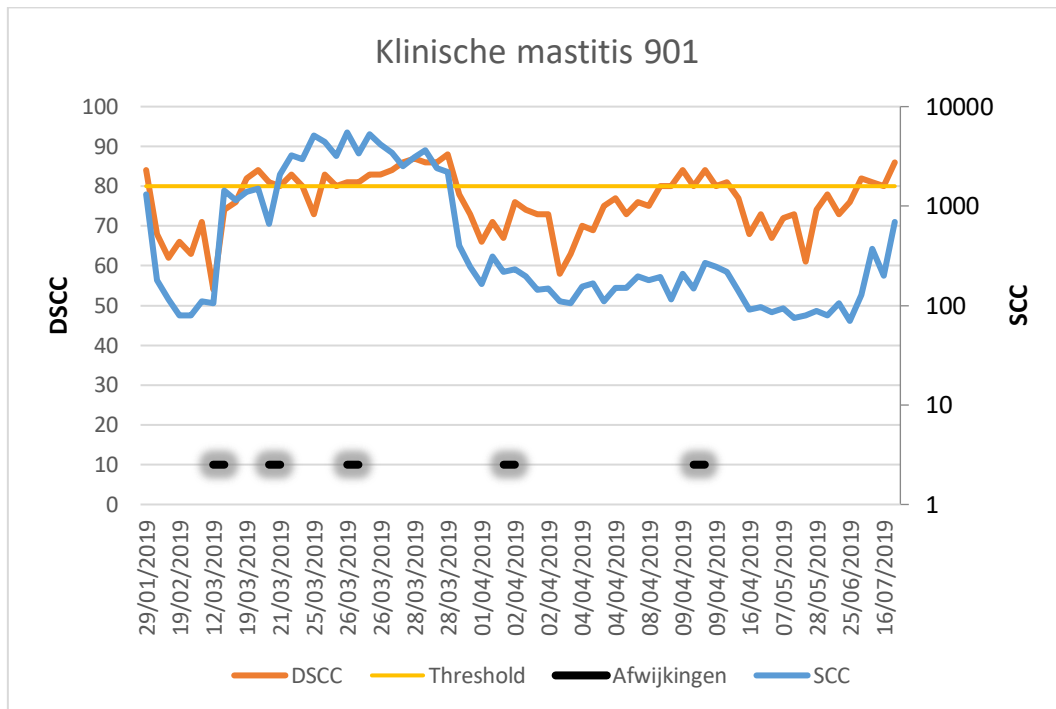
Figuur 3-10: Daling DSCC 5869

Op 16 maart 2019 werd er een monster genomen van het kwartier linksachter van koe 5878, na verschillende afwijkingen waar te nemen: een hard, gezwollen en pijnlijk kwartier, vlokken in melk die waterig is en met bloedbijmenging. Het staal wees op een infectie met *E. coli*. Op 19 maart 2019 waren er nog vlokken waar te nemen, maar er werd geen pathogeen meer gedetecteerd op dag 7, 14 en 21. Op Figuur 3-11 is te zien dat op 28 maart 2019, 12 dagen na de eerste waarneming, de DSCC weer steeg tot boven de 80 %, waarna ook het celgetal weer steeg. Echter, wanneer de DSCC daalt beneden de 80 % en onder de threshold blijft, zal de SCC ook dalen en laag blijven totdat de DSCC weer stijgt.



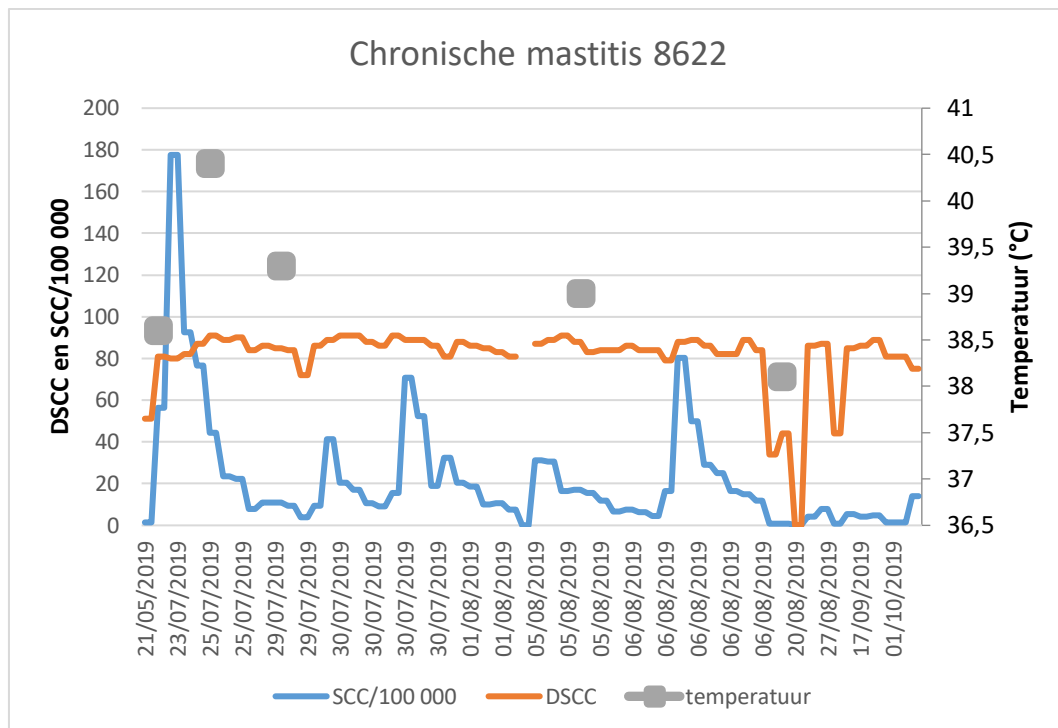
Figuur 3-11: Daling DSCC 5878

De klinische case van koe 901 is te zien op Figuur 3-12. Op 16 maart 2019 werd er een monster genomen van kwartier linksvoor nadat dat kwartier al vier dagen niet gemolken was geweest door de melkrobot. Gedurende de gehele looptijd van het protocol (dit is 21 dagen lang), werden er verschillende afwijkingen waargenomen: vlokken, brokken, waterige melk én bloed. Het kwartier was ook constant hard en gezwollen, soms pijnlijk. Het geanalyseerde monster wees *Streptococcus dysgalactiae* en *Trueperella pyogenes* uit. Deze laatste wordt ook wel wrang genoemd en veroorzaakt een zeer ernstige uierontsteking. Op de grafiek is te zien dat de DSCC, en bijbehorend ook het celgetal, lang hoog blijft en na het dalen verschillende opstoten heeft boven de threshold.



Figuur 3-12: Daling DSCC 901

3.3.3.3 Chronische mastitis



Figuur 3-13: Chronische mastitis 8622

Koe 8622 lijdt vermoedelijk aan chronische mastitis. Figuur 3-13 illustreert dit. Eerst zie je de DSCC boven de threshold van 80 procent komen, waarna de SCC volgt met stijgen tot bijna 18 000 000 cellen per milliliter. De stijging van de temperatuur ijlt na op de stijging van de witte bloedcellen. Daarna daalt de SCC tot een normaal niveau, maar de DSCC blijft boven de 80 %. Regelmatig zijn er opnieuw opstoten en stijgt de SCC tot respectievelijk 4 000 000, 7 000 000, 3 000 000 en 8 000 000 cellen per milliliter. De temperatuur daalt wel weer nadat de klinische mastitis verdwenen is. Bacteriologisch onderzoek op 22 juli 2019 wees uit dat het desbetreffende kwartier, linksvoor, besmet is met *Staphylococcus aureus*. Dit verklaart de chronische aard van de mastitis, daar *S. aureus* moeilijk te bestrijden is en vaak chronische mastitis veroorzaakt.

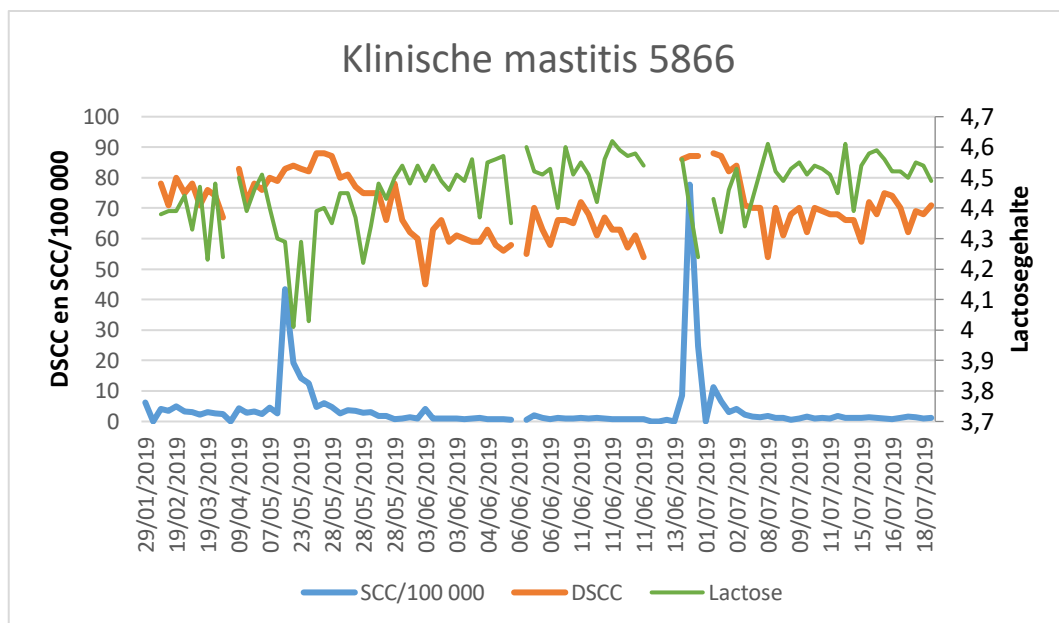
3.4 Correlatie DSCC andere parameters

In kop 1.1.3 “Effect mastitis op de melksamenstellingen” werd er besproken dat het lactosegehalte in melk afkomstig van een geïnfecteerd kwartier tot wel 20 procent kan dalen. In het kader van deze stelling werd met een correlatietest onderzocht of de DSCC en het lactosegehalte aanwezig in de historische datasets aan elkaar gecorreleerd zijn. De p-waarde van de test was nipt kleiner dan 0,05 en de correlatie was zeer zwak ($R^2=0,00512$). Hierover vallen dus weinig uitspraken te doen. In diezelfde paragraaf werd ook beschreven dat het vetgehalte tot wel 12 procent kan dalen bij een uierinfectie en dat de pH verhoogd. Deze relaties waren niet significant. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de metingen niet op kwartierniveau gebeurden en er dus sprake is van verdunning. Er zijn indicaties dat een suboptimale ureumconcentratie gelinkt is met een lagere weerstand, en dus mogelijk een

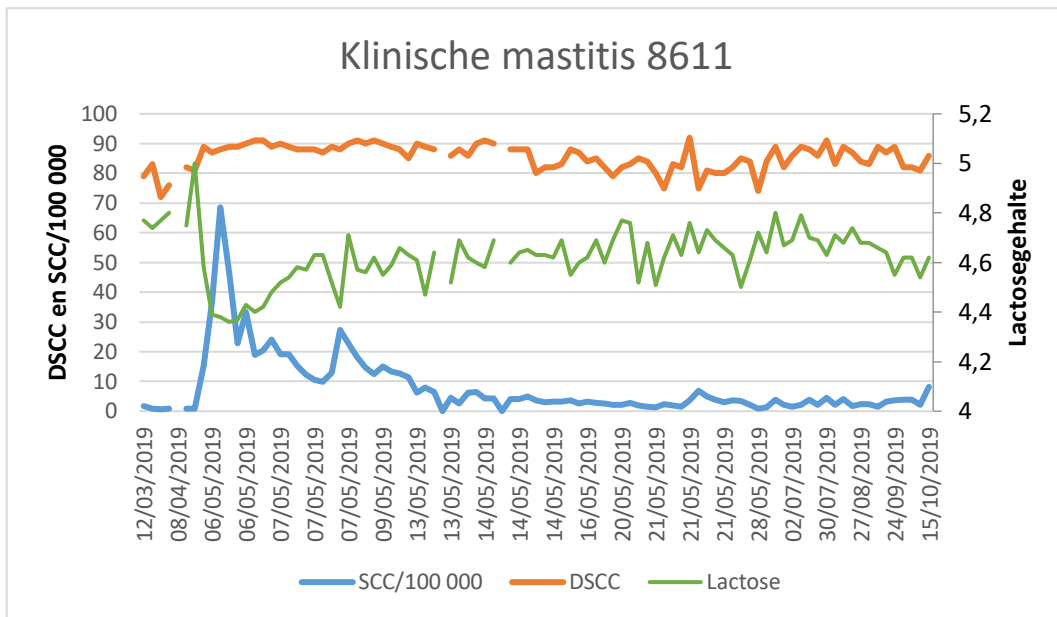
effect uitoefent op de uiergezondheid. De correlatie tussen het ureumgehalte en de DSCC was echter niet significant.

3.4.1 Variatie lactosegehalte, vetgehalte en melkproductie

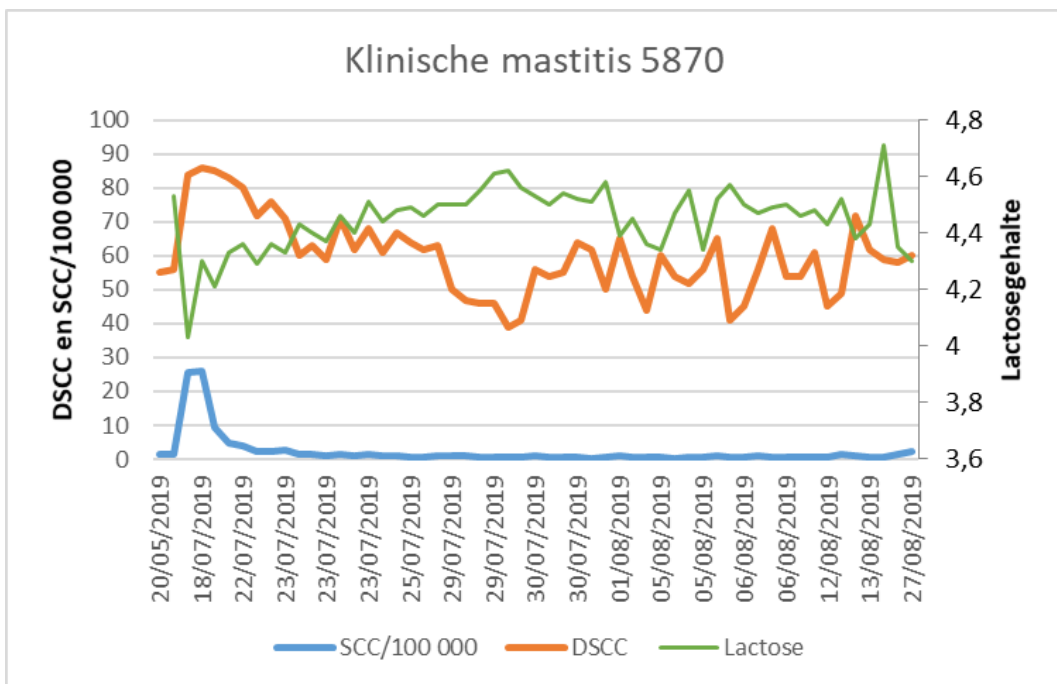
In overeenstemming met bovenstaande werden enkele grafieken gegenereerd op basis van het protocol dat op de Hooibeekhoeve wordt toegepast voor klinische cases. Op Figuur 3-14, Figuur 3-15 en Figuur 3-16 is duidelijk te zien dat het lactosegehalte (groene curve) sterk daalt bij een uierinfectie. Dit zijn grafieken gemaakt van de koeien die klinische mastitis vertonen en dus extra bemonsterd en nagekeken worden. Bij deze koeien is er dus sprake van een verhoogde monsterfrequentie in de periode dat het protocol loopt. De x-as is bijgevolg niet lineair verdeeld, maar categorisch om het verloop van de parameters duidelijker weer te geven. De SCC is gedeeld door 100 000 om duidelijk weer te geven wanneer het celgetal sterk stijgt. De correlatie tussen de DSCC en het lactosegehalte was, zoals hierboven besproken, significant, de correlatie met het vetgehalte niet. De daling van het lactosegehalte is veel duidelijker te zien op de grafieken.



Figuur 3-14: Daling lactosegehalte 5866

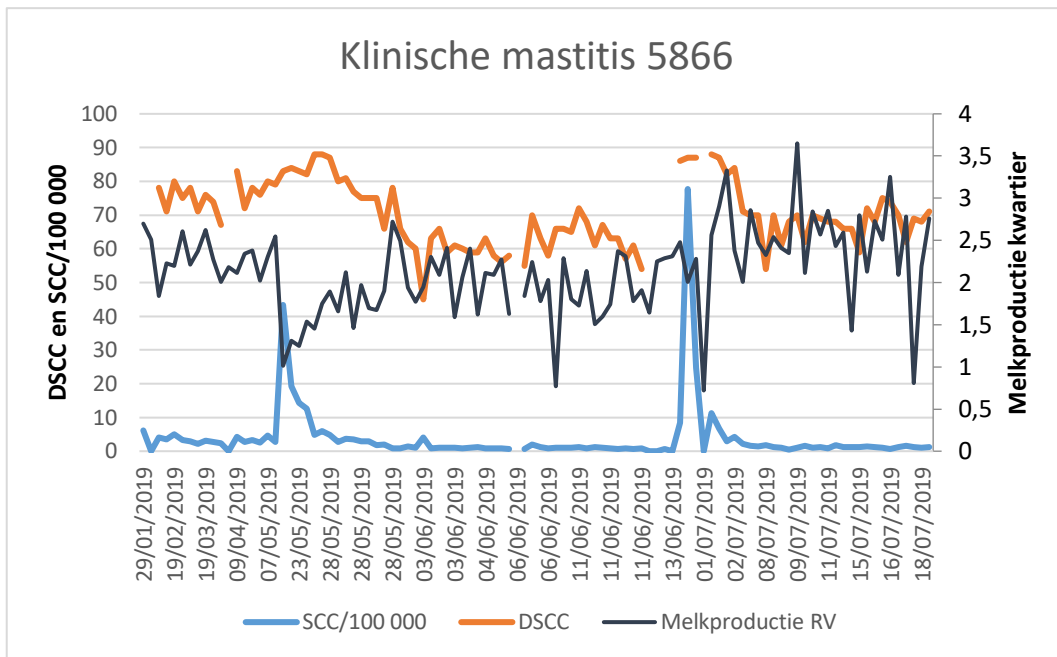


Figuur 3-15: Daling lactosegehalte 8611

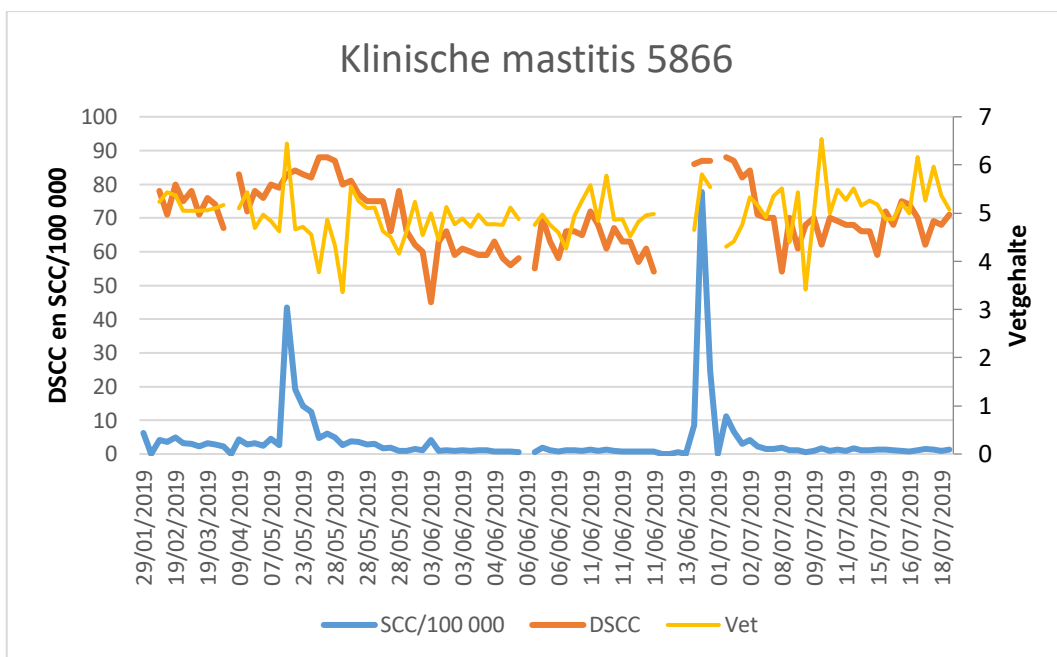


Figuur 3-16: Daling lactosegehalte 5870

Op dezelfde manier als hierboven werden grafieken gegenereerd om het gedrag van de melkproductie en het vetgehalte bij klinische mastitis te onderzoeken. Als gevolg van mastitis kan het vetgehalte tot wel 12 procent dalen. Ook is geweten dat de melkproductie (tijdelijk) vermindert. Figuur 3-17 en Figuur 3-18 zijn grafieken van een koe met klinische mastitis en waarop het protocol van de Hooibeeekhoeve is toegepast. De frequentie van de monsternames werd weer verhoogd en hierdoor werd er gekozen voor een categorische, niet-lineaire, x-as. Dit om het gedrag van de parameters tijdens en kort na de klinische mastitis in detail te kunnen weergeven. Tweemaal is er een piek waar te nemen in het somatisch celgetal. Hierop reageert de melkgift én het vetgehalte met een daling.



Figuur 3-17: Daling melkproductie 5866



Figuur 3-18: Daling vetgehalte 5866

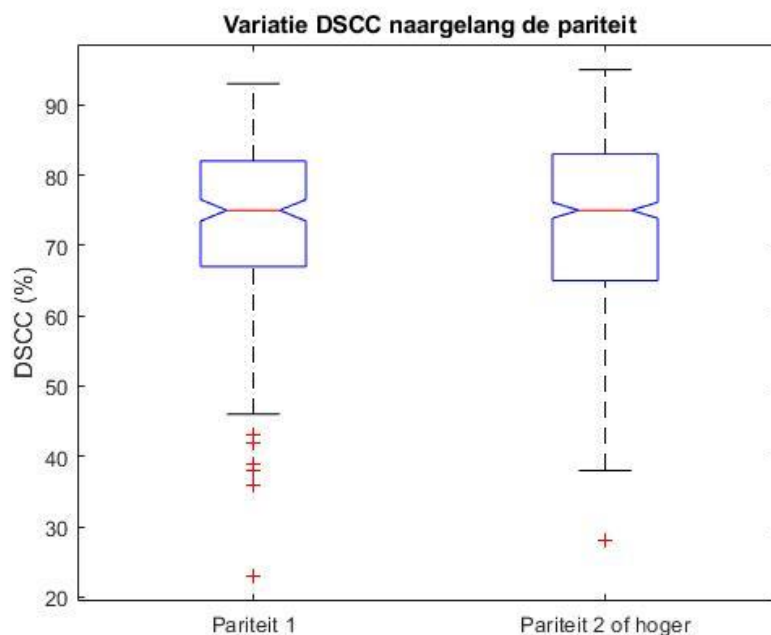
3.5 Kruskal-Wallis testen

Om de onderlinge gelijkheid van twee of meer verwachtingswaarden te vergelijken, wordt de Anova-test gebruikt. Echter, om deze test te mogen gebruiken, moeten de data normaal verdeeld zijn en moet aan de gelijkheid van de standaardafwijking voldaan zijn. Het resultaat van de Levene-test voor elk van onderstaande gevallen is een p-waarde groter dan 0,05: er is dus geen reden om te twifelen aan de homoscedasticiteit, of met andere woorden, er is voldaan aan de gelijkheid van de standaardafwijking per groep. Aan de voorwaarde voor

normale verdeling is echter niet voldaan, voor geen van de invloedsfactoren. Daarom wordt als alternatief gekozen voor de niet-parametrische Kruskal-Wallis test. Hiermee wordt de gelijkheid van medianen getest. Deze test is een uitbreiding van de Wilcoxon rank-sum test.

3.5.1 Variatie DSCC naargelang de pariteit

De invloed van de pariteit op het verloop van de DSCC-waarden wordt nagegaan met een Kruskal-Wallis test. Om de invloed van de pariteit te testen, werden de dieren opgedeeld in primipaar (eerstekalfs) en multipaar (twee of meer). Op Figuur 3-19 is te zien dat de mediaan van de DSCC van multipare koeien niet erg verschilt van de mediaan van de DSCC van primipare koeien. De p-waarde van de test is 0,98, wat betekent dat de H_0 -hypothese (=de gemiddeldes verschillen niet van elkaar) niet verworpen wordt. De spreiding is wel groter bij de multipare koeien dan bij de primipare groep, maar dit verschil in standaardafwijking is niet significant. Bij de primipare koeien zijn er meer uitschieters naar beneden. Dit is in lijn met wat eerder gevonden werd in de literatuur: in het experiment van Kirkeby et al. (2020) werd er ook geen verschil gevonden in DSCC-waarden bij stijging van de pariteit, ook ander onderzoek (Dosogne et al., 2003) wees uit dat de pariteit geen invloed uitoefent op de differentiële celtelling.

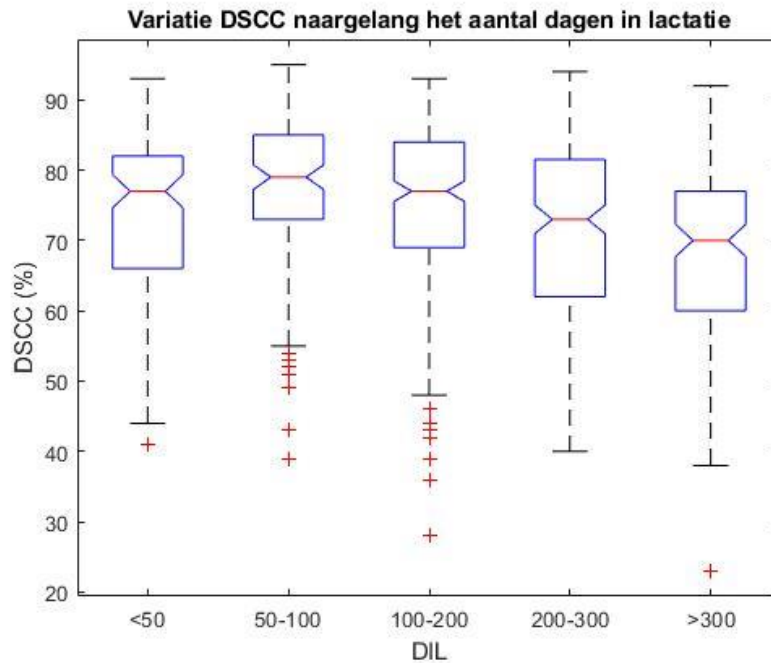


Figuur 3-19: Invloed pariteit op DSCC

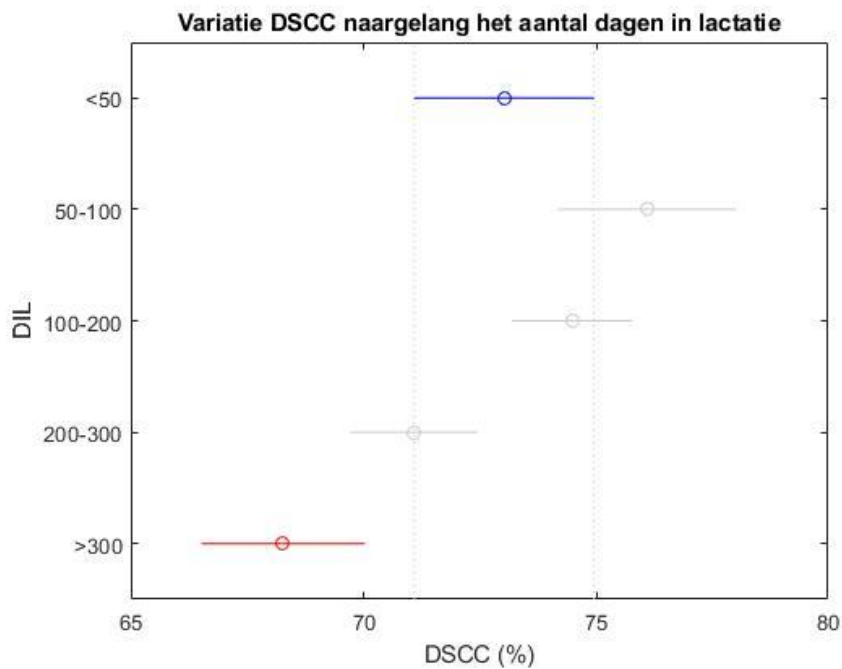
3.5.2 Variatie DSCC naargelang het aantal dagen in lactatie

Op Figuur 3-20 is te zien hoe de DSCC zich gedraagt naarmate het aantal dagen in lactatie stijgt. Er werd een opsplitsing gemaakt in nieuwmelkte koeien (<50 DIL), koeien op de piek van hun lactatie (50-100 DIL), koeien in het midden van de lactatie (100<DIL<200), koeien die dalende zijn in hun melkproductie (200-300 DIL) en dieren tegen het einde van de lactatie (>200 DIL). Ook hier was het resultaat van de Levene-test een p-waarde groter dan 0,05. De homoscedasticiteit wordt niet verworpen. De p-waarde van de Kruskal-Wallis test is kleiner dan 0,001, wat wil zeggen dat er een significante aanduiding is om de H_0 -hypothese (er is

geen verschil in gemiddeldes) te verwerpen. Figuur 3-21 laat zien dat de mediaan van de laatste groep (meer dan 300 dagen in lactatie) duidelijk lager is dan de mediaan van de andere groepen. Het gedifferentieerd celgetal volgt het patroon van een lactatiecurve: lichte stijging in het begin van de lactatie, om af te nemen naar het einde van de lactatie toe, zoals te zien is in Figuur 3-20. Kirkeby et al. (2020) deden dezelfde vaststelling tijdens hun onderzoek, namelijk dat de DSCC lichtjes afnam naarmate een koe langer in lactatie is. Diezelfde bron vond ook dat er een grotere spreiding is in de waarden naarmate het aantal dagen in lactatie stijgt.



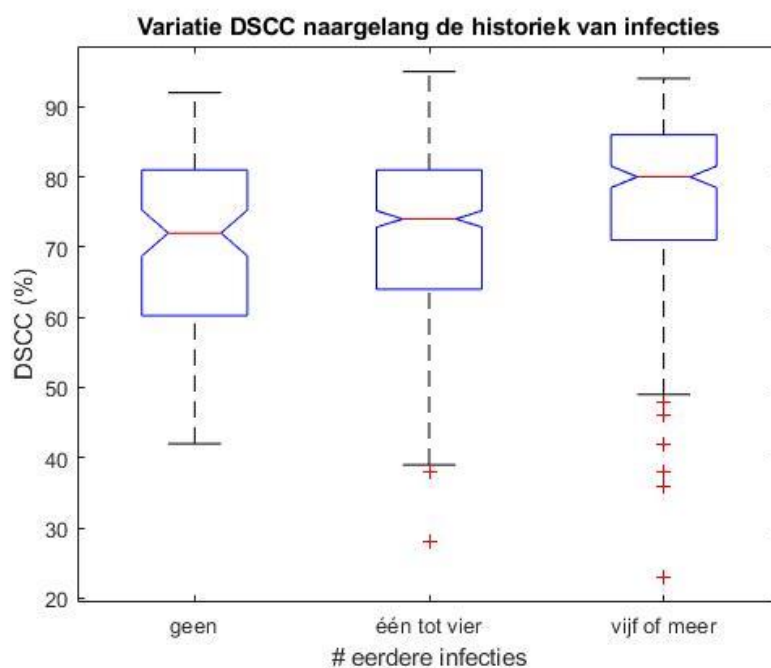
Figuur 3-20: Invloed lactatiestadium op DSCC



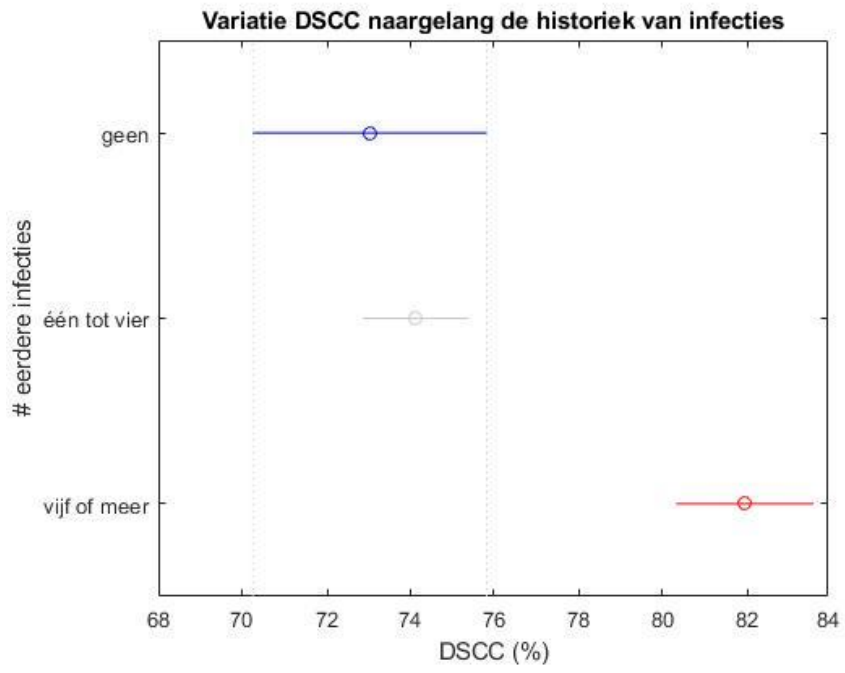
Figuur 3-21: Invloed lactatiestadium, vergelijking van gemiddeldes

3.5.3 Variatie DSCC naargelang historiek eerdere infecties

Er wordt een Kruskal-Wallis test uitgevoerd om na te gaan of het DSCC-getal stijgt naargelang er een historiek is van eerdere infecties. Het resultaat is te zien in Figuur 3-22, waarop duidelijk te zien is dat het gedifferentieerd celgetal hoger is bij dieren die al eerder vijf keer of meer een verhoogd celgetal vertoonden in de metingen (vanaf begin 2018) dan bij dieren die nog geen enkele keer tot maximum vier keer een verhoogd celgetal vertoonden. De p-waarde is kleiner dan 0,001: het verschil in gemiddeldes van groep 1 en 2 ten opzichte van groep 3 is dus zeer sterk significant, zoals te zien op Figuur 3-23. De variatie in DSCC is duidelijk groter bij dieren waarbij er nog nooit een verhoogd celgetal gemeten werd en de waardes spreiden zich ook meer naar de lagere waarden. Dieren zonder een historiek van infecties hebben namelijk meer gezond uierweefsel, met typisch veel macrofagen (bewoners van gezond weefsel). Dit zorgt ervoor dat de DSCC laag is. Dieren met een historiek van infecties hebben meer aangetast weefsel waarin neutrofielen zich huisvesten, dit resulteert in een hoge DSCC.



Figuur 3-22: Invloed historiek dier op DSCC



Figuur 3-23: Invloed historiek, vergelijking van gemiddeldes

4 DISCUSSIE

Over de nieuwe DSCC-parameter is nog niet veel geweten, daar een accurate en geautomatiseerde meetmethode nog maar recent ontwikkeld is. Tot op heden wordt de diagnose van intramammaire infecties gesteld op basis van het somatisch celgetal (SCC) en eventueel bacteriologie. Als alternatief hiervoor wordt onderzocht of het differentiëren van het somatisch celgetal een meerwaarde kan bieden in mastitisonderzoek. Het gedifferentieerd celgetal laat toe het totaal somatisch celgetal op te splitsen in PMN's en lymfocyten enerzijds en macrofagen anderzijds. Volgens het onderzoek van Pilla et al. in 2012 zou de DSCC veranderingen in relatieve celpopulaties detecteren voordat het totaal somatisch celgetal toeneemt. De differentiatie gebeurt met behulp van flowcytometrie. Dit heeft als voordeel dat de analyses aan hoge snelheid kunnen plaatsvinden (600 analyses per toestel per uur) en dat het resultaat betrouwbaar en herhaalbaar is. Het aantal beschikbare cellen voor de bepaling van de DSCC hangt echter af van de SCC. Een minimale SCC van 50 000 cellen per milliliter is vereist voor een betrouwbare analyse: om die reden werden alle DSCC-waarden horende bij SCC-waarden lager dan 50 000 cellen per milliliter weggelaten. Andere studies (Wall et al., 2018) kozen ervoor om de DSCC van stalen met een SCC lager dan 50 000 cellen per milliliter op 45 procent te zetten. De verklaring hiervoor was dat een SCC van lager dan 50 000 cellen per milliliter in hoofdzaak voorkomt bij gezond uierweefsel en dat hierin macrofagen domineren, maar dit is niet altijd zo.

Als eerste werd er onderzocht welke pathogenen geïsoleerd werden uit de dieren die geselecteerd werden voor de proef. Het voorkomen en de prevalentie van de mastitispathogenen in dit thesisonderzoek is vergelijkbaar met wat eerder gevonden is in ander onderzoek (Schwarz et al., 2010; Schwarz et al., 2019; Piepers et al., 2007). De helft van de monsters waren cultuur negatief, wat wil zeggen dat er geen enkele mastitispathogeen geïsoleerd kon worden. Dit resultaat is vergelijkbaar met alle bovenstaande literatuur. Als tweede grootste groep werden in er 37 % van de stalen *Staphylococcus* species teruggevonden. Deze niet-aureus stafylokokken hebben een eerder beperkte virulentie en veroorzaken meestal een milde ontsteking. In vergelijking met ander onderzoek, onder andere met Schwarz et al. in 2019 en Piepers et al. in 2007, is dit vrij veel: zij isoleerden respectievelijk slechts 14,84 en 9,7 procent *Staphylococcus* sp. Wat betreft de major-pathogenen werden *Staphylococcus aureus* en *Streptococcus dysgalactiae* samen 29 keer teruggevonden, oftewel in 3,9 % van de monsters. Dit is ook weer een resultaat vergelijkbaar met dat van Schwarz et al. in 2010 (namelijk 5,9 %) en Piepers et al. in 2007 (namelijk 3,5 %). Andere pathogenen zoals *Aerococcus* species en *Corynebacterium* species werden in totaal 17 keer teruggevonden in 2,3 % van de genomen stalen. Het valt op dat er weinig *Corynebacterium* teruggevonden werd in vergelijking met ander onderzoek. In 4,8 % van de stalen werden er drie of meer verschillende organismen geïsoleerd (polybacterieel) en 2,2 % van de monsters werden gecontamineerd tijdens de staalname (isolatie van *Bacillus* sp.).

Om de betrouwbaarheid van de verkregen datasets te onderzoeken, werden er enkele statistische kengetallen bepaald. De bruikbare DSCC-waarden liggen tussen 23 en 95 procent, met een gemiddelde van 73 % en een mediaan van 75 %. De standaardafwijking is 11,64 % en de helft van de waarden liggen tussen 66 en 83 procent. Dit betekent dat er een vrij grote spreiding aanwezig is in de DSCC-waarden, maar de resultaten liggen in de buurt van eerder gevonden resultaten in ander onderzoek. Het lactosegehalte en de DSCC zijn gecorreleerd

aan mekaar, maar de correlatie is zeer zwak ($R^2=0,00512$). Hier werd dus niet dieper op ingegaan. Het is wel duidelijk te zien op de getoonde grafieken dat het lactosegehalte sterk daalt wanneer de DSCC en de SCC stijgt. Het vetgehalte en de melkproductie lijden ook onder mastitis, zoals aangehaald door Blowey & Edmonson in 2010. Dit werd ook geïllustreerd met grafieken opgesteld met gegevens afkomstig van het protocol voor klinische mastitis dat wordt toegepast op de Hooibeekhoeve. De relatie tussen DSCC en botervet en pH was niet significant.

Om een beeld te krijgen van de exacte relatie tussen DSCC en SCC, werd de SCC uitgezet in functie van de DSCC. Hierin is duidelijk te zien dat de DSCC breed varieert bij lage SCC-waarden en een minder groot, maar hoger bereik beschrijft bij hogere SCC-waarden. Dit suggereert dat een laag celgetal niet per se staat voor een goede uiergezondheid, hetgeen vaak wordt aangenomen (Rivas et al., 2001). Hogere DSCC-waarden in laag-SCC-monsters zijn namelijk indicators voor mastitis (Damm et al., 2017), maar deze gevallen konden niet teruggevonden worden in de beschikbare data. Aan de andere kant worden hoge SCC-waarden gekoppeld met lage DSCC-waarden gerelateerd aan de herstellende fase van de infectie. Er bestaat een lineair verband tussen de tiendelige logaritme van SCC en de DSCC, dat wordt gestaafd door een zeer sterke significantie. Wanneer de logaritme van de SCC stijgt, dan stijgt ook de DSCC. Ander onderzoek (Damm et al., 2017) vond ook reeds dat de DSCC-waarden toenamen naarmate de logSCC-waarden toenamen. De positieve correlatie die gevonden is in dit onderzoek, werd reeds door meerdere auteurs bevestigd. (Damm et al., 2017; Kirkeby et al., 2020; Schwarz et al., 2011) De R^2 is 0,22 en het lineaire model geeft volgende formule: $DSCC = 13,89 \times \log(SCC) + 42,41$. De R^2 is vrij laag, wat een zwakke tot matige correlatie aanduidt. De relatie tussen het somatisch celgetal en het gedifferentieerd somatisch celgetal werd nagegaan met een Kruskal-Wallis test. De H_0 -hypothese (alle gemiddeldes zijn gelijk) werd vanzelfsprekend verworpen met een p-waarde die quasi nul is. Des te hoger de SCC is, des te groter wordt de DSCC.

Er kan een threshold van DSCC op 80 procent worden gezet, zoals nu de threshold van SCC op 200 000 cellen per milliliter staat. Stijgt de DSCC boven de 80 %, dan is dit een indicatie voor een uierontsteking en zal de SCC weldra stijgen. Doordat de DSCC vlugger stijgt dan de SCC, kan er sneller ingegrepen worden en zal de infectie efficiënter bestreden kunnen worden. Daalt de DSCC echter weer beneden de 80 %, dan is dit een aanwijzing voor een daling en stabilisatie van het somatisch celgetal. De pathogeen is bestreden. Blijft de DSCC boven de 80 %, kan dit ook een aanwijzing zijn voor chronische mastitis. Ander onderzoek (Wall et al., 2018) zette deze threshold op 86 %.

De invloed van verschillende parameters op het verloop van de DSCC werd nagegaan met een Kruskal-Wallis test. In de gebruikte datasets verschilt de DSCC van multipare koeien niet statistisch van de DSCC van primipare koeien. Ook Dosogne et al. (2003) en Kirkeby et al. (2020) vonden geen verschil in DSCC-waarden bij stijging van de pariteit. Het aantal dagen in lactatie speelt wel een rol. De DSCC volgt namelijk het patroon van een lactatiecurve: op het begin van de lactatie stijgt de DSCC lichtjes, om tegen het einde van de lactatie af te nemen tot een minimum. Ander onderzoek (Kirkeby et al., 2020) deed dezelfde vaststelling. Het gemiddelde gedifferentieerd celgetal is hoger naarmate de dieren een historiek van infecties hebben. Dieren die al vijf of meer keer eerder leden onder een uierinfectie, vertoonden een significant hogere DSCC dan dieren die reeds vier keer of minder een verhoging in somatisch celgetal vertoonden. Dit werd niet aangetoond in de eerder besproken literatuur en zou een uitstekende aanzet kunnen zijn voor verder onderzoek.

5 BESLUIT

Het grote voordeel van de nieuwe parameter, het gedifferentieerd celgetal, is dat hij sneller verandert dan het somatisch celgetal. Hierdoor kan mastitis vlugger opgespoord worden en efficiënter behandeld. Ook subklinische mastitis wordt gedetecteerd door de differentiatie van het celgetal. De threshold op DSCC werd in dit onderzoek op 80 % gezet: dit wil zeggen dat als de DSCC groter dan 80 % wordt, dit een indicatie voor mastitis is. Hierdoor zal de DSCC vast en zeker bijdragen tot het verduurzamen van de melkproductie en de verbetering van de beheersing van mastitis. Wanneer de DSCC weer daalt en laag blijft, kan ervan uitgegaan worden dat de uiergezondheidstoestand weer normaal is en de infectie bestreden is. Vermoedelijk blijft de DSCC hoog bij een chronische infectie. Een sterke correlatie tussen de DSCC en parameters zoals het vetgehalte lactosegehalte of de pH kon niet aangetoond worden. Het lactosegehalte en de DSCC zijn gecorreleerd aan mekaar, maar slechts zeer zwak. Wel is er uiteraard een sterk positieve correlatie met de SCC en kon er een lineair verband opgesteld worden tussen DSCC en $\log_{10}(\text{SCC})$. Naargelang het celgetal stijgt, zal ook de DSCC stijgen. Dit werd gestaafd met een Kruskal-Wallis test waarvan de p-waarde nul benaderde. De DSCC van multipare koeien verschilt niet significant van deze van primipare koeien. De relatie tussen de DSCC en het aantal dagen in lactatie is treffend: de DSCC volgt het patroon van een lactatiecurve. Het gedifferentieerd celgetal is significant hoger bij dieren die al vijf of meer keer eerder een verhoogd celgetal vertoonden. Om deze nieuwe parameter gericht te kunnen inzetten, zal er echter nog veel onderzoek moeten gebeuren - onder andere naar de threshold op DSCC en hoe snel de parameter verandert tijdens een infectie - maar deze masterthesis licht veel potentieel toe.

Referenties

- AAD. (2015). *What is subclinical mastitis?* Geraadpleegd van <https://www.qscoutlab.com/what-is-subclinical-mastitis>
- AB Register. (2019). *Producenten*. Geraadpleegd van <https://www.abregister.be/PRODUCENTEN.php>
- Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I., Caamaño-Antelo, S., Calomata, P., & Barros-Velázquez J. (2014). The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *Journal of Veterinary Medicine*, 2014(31).
- Aref, N., Sayed, A., Zahran, A., Abdelaal, G., & Nasser, E. (2018). Flow cytometric analysis of somatic cells and oxidant/antioxidant profile in dairy cows with subclinical mastitis. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 21(3), 347–357.
- Bobbo, T., Cipolat-Gotet, C., Bittante, G., & Cecchinato, A. (2016). The nonlinear effect of somatic cell count on milk composition, coagulation properties, curd firmness modeling, cheese yield, and curd nutrient recovery. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5104–5119.
- Bobbo, T., Ruegg, P.L., Stocco, G., Fiore, E., Ganesella, M., Morgante, M., Pasotto, D., Bittante, G., & Cecchinato, A. (2017). Associations between pathogen-specific cases of subclinical mastitis and milk yield, quality, protein composition, and cheese-making traits in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 4868–4883.
- Bobbo, T., Penasa, M., & Cassandro, M. (2019). Short communication: Genetic aspects of milk differential somatic cell count in Holstein cows: A preliminary analysis. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 4275–4279.
- Bradley, A. & Green, M. (2005). Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. *In Practice*, 27(6), 310–315.
- Biebaut, E. (2018). *Toepassingen en interpretatie van de california mastitis test als diagnostische tool voor subklinische mastitis bij melkvee* [masterthesis]. Gent: Universiteit Gent, Faculteit Diergeneeskunde.
- Breen, J.E., Green, M.J., & Bradley, A.J. (2009). Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. *Journal of Dairy Science*, 92(2009), 2551–2561.
- Blowey, R. & Edmondson, P. (2010). *Mastitis Control in Dairy Herds*. Ipswich: Farming press.
- Clark, G., Stickinger, H., Balderas, R., Val Zelm, M., Zola, H., Hart, D., & Engel, P. (2016). Nomenclature of CD molecules from the Tenth Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshop. *Clinical & Translational Immunology*, 5(1).
- Damm, M., Holm, C., Blaabjerg, M., Bro, M.N., & Schwarz, D. (2017). Differential somatic cell count—A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 4926–4940.
- De Hertogh, M. (2014). *Klinische mastitis, een veel voorkomend economisch probleem in de melkveeindustrie* [masterthesis]. Gent: Universiteit Gent, Faculteit Diergeneeskunde.
- De Schutter, H. (2015) *Droogzetten met beperkt gebruik van antimicrobiële middelen: Toepassing in de Vlaamse melkveehouderij* [masterthesis]. Geel: Katholieke Universiteit Leuven, Faculteit Industriële Ingenieurswetenschappen.
- De Vliegher, S., Fox, L.K., Piepers, S., McDougall, S., & Barkema, H.W. (2012). Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1025–1040.

- Denis, M., Parlane, N., Lacy-Hulbert, J., Summers, E., Buddle, B., & Wedlock, N. (2006). Bactericidal activity of macrophages against *Streptococcus uberis* is different in mammary gland secretions of lactating and drying off cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(1), 111–120.
- Dickrell, J. (z.d.). QScout Farm Lab Diagnoses Subclinical Mastitis. Geraadpleegd van <https://www.agweb.com/article/qscout-farm-lab-diagnoses-subclinical-mastitis-naa-jim-dickrell/>
- Dosogne, H., Vangroenweghe, F., Mehrzad, J., Massart-Leën, A.M., & Burvenich, C. (2003). Differential Leukocyte Count Method for Bovine Low Somatic Cell Count Milk. *Journal of Dairy Science*, 86(3), 828–834.
- GD (z.d.). *Slotgat en tepelkanaal*. Geraadpleegd op 24 april 2019 via <https://www.gddiergezondheid.nl/diergezondheid/management/uiergezondheid/weers-tand/slotgat-en-tepelkanaal>
- Gomes, F. & Henriques, M. (2015). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology*, 72(4), 377–382.
- Goldsby, R., Kindt, T., & Osborne, B. (2007). *Immunology* (6^e editie). New York, NY: W.H. Freeman and Co.
- Gonçalves, J.L., Lyman, R.L., Hockett, M., Rodriguez, R., Dos Santos, M.V., & Anderson, K.L. (2017). Using milk leukocyte differentials for diagnosis of subclinical bovine mastitis. *Journal of Dairy Research*, 84(3), 309–317.
- Halasa, T. (2012). Bioeconomic modeling of intervention against clinical mastitis caused by contagious pathogens. *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5740–5749.
- Huijps, K., De Vlieghe, S., Lam, T., & Hogeveen, H. (2009). Cost estimation of heifer mastitis in early lactation by stochastic modelling. *Veterinary Microbiology*, 134(1), 121–127.
- Hurley, W.L. (1989). Symposium: Mammary Gland Function During Involution and the Declining Phase of Lactation. *Journal of Dairy Science*, 72, 1637–1646.
- Hockett, M., Payne, M., & Rodriguez, R., (2014a). Evaluation of cow-level selective dry cow therapy based on diagnosis by milk leukocyte differential. *National Mastitis Council Regional Meeting Proceedings*, Gent: National Mastitis Council.
- Hockett, M., Payne, M., & Rodriguez, R., (2014b). Milk Leukocyte Differential as a Tool to Guide Quarter-Level, Selective Dry Cow Therapy. Gent: National Mastitis Council.
- Hogan, J. & Smith, K. L. (2003). Coliform mastitis. *Journal of Veterinary Research*, 34(2003), 507–519.
- Hogeveen, H., & Lam, T. (2012). *Udder Health and Communication*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers.
- Holm, C. (2010). *Nummer 2630487B1*. Hillerød, Denemarken: Octrooibureau Denemarken.
- IKM Vlaanderen. (2018). *Registratie antimicrobiële diergeneesmiddelen*. Geraadpleegd van http://www.ikm.be/news/files/Infobrief_verschaffers_sept2018.pdf
- Invitrogen. (z.d.). Acridine orange, geraadpleegd van <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A1301?SID=srch-srp-A1301>
- Kirkeby, C., Toft, N., Schwarz, D., Farre, M., Nielsen, S., Zervers, L., Hechinger, S., & Halasa, T. (2020). Differential somatic cell count as an additional indicator for intramammary infections in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1759-1775.
- Kirkpatrick, M.A., & Olson, J.D. (2015). Somatic cell counts at first test: More than a number. *National Mastitis Council 54th Annual Meeting: Proceedings*. Memphis, TN: National Mastitis Council.

- Kroll, W., Rieke, E., & Wüzburg, U. (1988). *Nummer 0342501A2*. Darmstadt, Duitsland: Octrooibureau Duitsland.
- M-team. (2019). *Aandacht voor uiergezondheid in Vlaanderen blijft nodig*. [Nieuwsbrief]
- MCC Vlaanderen. (2017). *Jaarverslag 2017*. Geraadpleegd van https://www.mcc-vlaanderen.be/sites/default/files/publicatiofiles/MCC_2017_JAARVERSLAG.pdf
- Murphy, J.M., Pfau, K.O., Lepard, O.L., & Bartlett, J.W. (1944). Comparison of the incidence of udder infection and mastitis in two cow families. *Cornell Veterinary*, *34*(1944), 185–192
- Østerås, O. & Sølverød, L. (2009). Norwegian mastitis control programme. *Irish Veterinary Journal*, *62*(4), 26–33.
- Pankey, J.W., Eberhart, R.J., Cuming, A.L., Daggett, R.D., Farnsworth, R.J., & Mcduff, C.K. (1984). Uptake on postmilking teat antiseptics. *Journal of Dairy Science*, *67*(6), 1336–1353.
- Pellegrino, M., Giraud, J., Raspanti, C., Odierno, L., & Boggi, C. (2010). Efficacy of immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine. *Vaccine*, *28*(28), 4523–4528.
- Petzer, I.-M., Karzis, J., Meyer, I.A., & van der Schans, T.J. (2013). A cost-benefit model comparing the California Milk Cell Test and Milk Electrical Resistance Test. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, *80*(1), 538.
- Piepers, S., De Meulemeester, L., de Kruif, A., Opsomer, G., Barkema, H., & De Vlieghe, S., (2007). Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Research*, *74*(4), 478–483.
- Pilla, R., Schwarz, D., König, S., & Piccinini, R. (2012). Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. *Journal of Dairy Science*, *95*(8), 4410–4420.
- Pillai, S.R., Kunze, E., Sordillo, L.M., & Jayarao, B.M. (2001). Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. *Journal of Dairy Science*, *84*(6), 1413–1420.
- Polk, B. & Frey, M. (2012). *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (5^e editie). Amsterdam: Elsevier.
- PR Newswire. (z.d.). *Advanced Animal Diagnostics Raises \$6 Million for On-farm Diagnostics*. Geraadpleegd van https://search-proquest-com.kuleuven.ezproxy.kuleuven.be/docview/1324975770?rfr_id=info%3Axri%2Fsid%3Aprimocenter
- Rees, A., Fischer-Tenhagen, C., & Heuwieser, W. (2017). Udder firmness as a possible indicator for clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, *100*(3), 2170–2183.
- Reneau, J. (1986). Effective Use of Dairy Herd Improvement Somatic Cell Counts in Mastitis Control. *Journal of Dairy Science*, *69*(6), 1708–1720.
- Reyher, K. K., Dohoo, I. R., Scholl, D. T., & Keefe, G. P. (2012). Evaluation of minor pathogen intramammary infection, susceptibility parameters, and somatic cell counts on the development of new intramammary infections with major mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, *95*(7), 3766–3780.
- Rivas, A.L., Quimby, F.W., Blue, J., & Coksaygan, O. (2001). Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *13*(5), 399–407.
- Rodriguez, R.R., & Galanaugh, C.F. (2007). *Nummer 2007112332A2*. Darmstadt, Duitsland: Octrooibureau Duitsland.

- Roos, D. (1995). In en om de neutrofiel: neutrofielen en ontstekingen. *NTKC*, 20, 76–81.
- Rossi, R.S., Amarante, A.F., Correia, L.B.N., Guerra, S.T., Nobrega, D.B., Latosinski, G.S., Rossi, B.F., Rall, V.L.M., & Pantoja, J.C.F. (2018). Diagnostic accuracy of Somaticell, California Mastitis Test, and microbiological examination of composite milk to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 101(11), 10220–10229.
- Ruegg, P.L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10381–10397.
- Shook, G.E. & Schutz, M.M. (1994). Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. *Journal of Dairy Science*, 77(1994), 648–658.
- Schalm, O. & Noorlander, D. (1957). Experiments and observations leading to the development of California mastitis test. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 130, 199–204.
- Schreiner, D.A., & Ruegg, P.L. (2003). Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 86(2003), 3460–3465.
- Schwarz, D. (z.d.) *Differential Somatic Cell Count with the Fossomatic 7 DC - a novel parameter*. Denemarken: Foss.
- Schwarz, D., Diesterbeck, U.S., Failing, K., König, S., Brügemann, K., Zschöck, M., Wolter, W., & Czerny, C.-P. (2010). Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hesse, Germany—A longitudinal study. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5716–5728.
- Schwarz, D., Diesterbeck, K., König, S., Brügemann, K., Schlez, K., Zschöck, M., Wolter, W., & Czerny, C.-P. (2011a). Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*, 94(10), 5033–5044.
- Schwarz, D., Diesterbeck, K., König, S., Brügemann, K., Schlez, K., Zschöck, M., Wolter, W., & Czerny, C.-P. (2011b). Microscopic differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Research*, 78(4), 448–455.
- Schwarz, D., Lipkens, Z., Piepers, S., & De Vliegher, S. (2019). Investigation of differential somatic cell count as a potential new supplementary indicator to somatic cell count for identification of intramammary infection in dairy cows at the end of the lactation period. *Preventive Veterinary Medicine* 172(2019).
- Sordillo, L.M., Shafer-Weaver, K., & Derosa, D. (1997). Immunobiology of the Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*, 80(8), 1851–1865.
- Supré, K., Lommelen, K., & De Meulemeester, L. (2014). Antimicrobial susceptibility and distribution of inhibition zone diameters of bovine mastitis pathogens in Flanders, Belgium, *Veterinary Microbiology*, 171(3-4), 374–381.
- Van Soest, F., Santman-Berends, I., Lam, T., & Hogeveen, H. (2016). Failure and preventive costs of mastitis on Dutch dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 8365–8374.
- Vanden Bosch, M. (2014). *Gestructureerde aanpak van uiergezondheidsproblemen op een melkveebedrijf – focus op Staphylococcus aureus* [masterthesis]. Gent: Universiteit Gent, Faculteit Diergeneeskunde.
- Verbeke, J., Piepers, S., Supré, K., & De Vliegher, S. (2014). Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6926–6934.

- Verschelde, J. (2013). *Lokale afweer van de uier: wordt het celgetal van een gezond kwartier beïnvloed door een infectie in naburige kwartieren?* [masterthesis]. Gent: Universiteit Gent, Faculteit Diergeneeskunde.
- Wall, S., Wellnitz, O., Bruckmaier, R., & Schwarz, D. (2018). Differential somatic cell count in milk before, during, and after lipopolysaccharide- and lipoteichoic-acid-induced mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *101*(6), 5362–5373.
- Wickström, E., Persson-Waller, K., Lindmark-Månsson, H., Östensson, K., & Sternesjö, Å. (2009). Relationship between somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte count and quality parameters in bovine bulk tank milk. *Journal of Dairy Research*, *76*(2), 195–201.
- Wilkinson, P. (1998). *Encyclopedia of Immunology* (2^e editie). Amsterdam: Elsevier.
- Zecconi, A., Vairani, D., Cipolla, M., Rizzi, N., & Zanini, L. (2018). Assessment of subclinical mastitis diagnostic accuracy by differential cell count in individual cow milk. *Italian Journal of Animal Science*, *18*(1), 460–465.

FACULTEIT INDUSTRIËLE INGENIEURSWETENSCHAPPEN
CAMPUS GEEL
Kleinhoefstraat 4
2440 GEEL, België
tel. + 32 14 72 13 00
iiw.geel@kuleuven.be
www.iw.kuleuven.be

