

**PPS-jaarrapportage 2019**

<b>Algemene gegevens</b>	
PPS-nummer	AF-17060
Titel	1H4F-Duurzame beheersing van kiemgetal in geitenmelk
Thema	TKI Agri & Food, Duurzame veehouderij
Uitvoerende kennisinstelling(en)	WBVR, UU
Projectleider onderzoek (naam + emailadres)	Henk Wisselink (henk.wisselink@wur.nl)
Penvoerder (namens private partijen)	Jeannette van de Ven, Peter Paree (ZLTO)
Contactpersoon overheid	A. Bouma
Totale projectomvang (k€)	546
Adres projectwebsite	<a href="https://www.1health4food.nl/nl/1health4food/show-1/1H4F-Duurzame-beheersing-van-kiemgetal-in-geitenmelk-.htm">https://www.1health4food.nl/nl/1health4food/show-1/1H4F-Duurzame-beheersing-van-kiemgetal-in-geitenmelk-.htm</a>
Startdatum	01-01-2018
Einddatum	31-12-2021

**Goedkeuring penvoerder/consortium**

De rapportage dient te worden besproken met de penvoerder/het consortium. De TKI's nemen graag kennis van eventuele opmerkingen over de rapportage.

De penvoerder heeft namens het consortium de rapportage

- goedgekeurd  
 niet goedgekeurd

Eventuele opmerkingen over de rapportage:

**Planning en voortgang (indien er wijzigingen zijn t.o.v. het projectplan svp toelichten)**

Loopt de PPS volgens planning?	Ja
Zijn er wijzigingen in het consortium/de projectpartners?	Ja, de AiO heeft aangegeven haar carrière op een andere wijze voort te willen zetten en niet meer bij het project betrokken te willen zijn. Een vervanger is direct gevonden en gestart op dit project en zal hier tevens een promotietraject van maken.
Is er sprake van vertraging en/of uitgestelde opleverdatum?	Nee, binnen de looptijd van het project zal een rapportage geschreven worden. Afronding van het proefschrift zal na afronding van het project plaatsvinden.
Is er sprake van inhoudelijke knelpunten, geef een korte beschrijving	Nee
Is er sprake van afwijkingen van het ingezette budget/de begroting?	Nee

**Korte omschrijving inhoud/doel PPS**

Wat is er aan de hand en wat doet het project daaraan?

Wat gaat het project opleveren en wat is het effect hiervan?

Omdat Nederland veel geitenmelk exporteert is een goede melkwaliteit uitermate belangrijk. Het kiemgetal op veel melkgeitenbedrijven is relatief hoog, en maar ten dele te verklaren door melksysteem gerelateerde oorzaken (bijv. hygiëne). In dit project werkt Wageningen Bioveterinary Research samen met Universiteit Utrecht en verschillende partners uit de melkgeitenhouderij om inzicht te krijgen in de samenhang tussen voeding, darmmicrobioom en

het uiteindelijke kiemgetal van de melk. Dit inzicht is vervolgens leidend in het onderzoek naar interventies waarmee het kiemgetal te beheersen is en de uiergezondheid bevorderd wordt.

Uit eerdere onderzoeken op een aantal probleembedrijven is gebleken dat kiemgetallen van de beide uierhelften significant aan elkaar gerelateerd zijn. Dit suggereert dat de bacterie-aantallen in de geitenuier niet slechts lokaal ontwikkelen, maar dat de bacteriën vanuit een andere bron in de geit afkomstig zijn. Dit is in lijn met diverse recente onderzoeken die aantonen dat er een mogelijke actieve passage van bacteriën uit de darm naar de melk is, de zogeheten darm-melkklier route. Deze route zou belangrijk zijn voor het doorgeven van relevante microbiota naar de darm van de lammeren vlak na de geboorte. Deze ontdekking biedt een mogelijke nieuwe verklaring voor hoge kiemgetallen. Het kiemgetal wordt daardoor in verband gebracht met het darmmicrobioom en dus met de voeding van de geit, een onderwerp dat nauwelijks onderzocht is.

In mei 2018 is een AiO onderzoeker aangesteld binnen het project die gegevens verzamelde, de analyses uitvoerde en een inventarisatie van de kiemgetalproblematiek binnen en tussen bedrijven (cross-sectioneel, m.b.v. enquête met een focus op voedingsinvloeden) in kaart bracht. Resultaten van de onderzoeken uit de eerste periode van de associaties tussen mest en melk microbiota en potentie van invloed van voedingsmiddelen op het kiemgetal in melk zijn in Q1 van 2019 de basis geweest voor de Go/NoGo beslissing van de stuurgroep.

Na de Go beslissing van de stuurgroep in april 2019 is besloten de nauwe onderzoeksfocus op de darm-melkklier route te verbreden tot onderzoek naar immunocompetentie en darmgezondheid van de geit. Na specificatie van deze wijziging in een onderzoeksvoorstel heeft de stuurgroep aangegeven met deze wetenschappelijke wijziging (welke geen consequenties heeft voor de praktische invulling en financiële insteek van het project) akkoord te gaan.

In september 2019 heeft de AiO onderzoeker aangegeven dat de functie niet goed bij haar ambities en talenten past en heeft daarom besloten te stoppen. Hierop is direct een nieuwe onderzoeker aangesteld, die de functie naast een huidige SiO aanstelling kan invullen. Hiervoor zijn duidelijke afspraken gemaakt met alle betrokkenen.

## **Resultaten 2019**

Geef een korte beschrijving van de high-lights van 2019

Geef een korte beschrijving van de projectdeliverables 2019

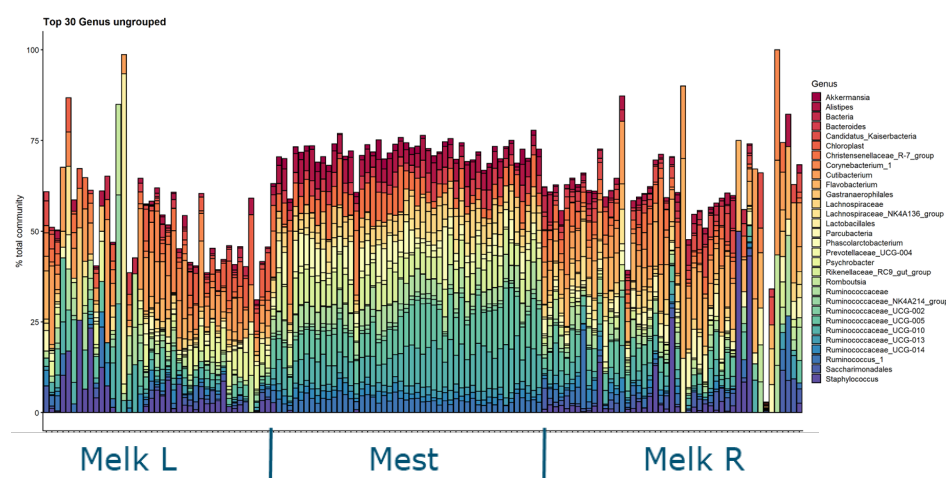
In 2018 zijn drie onderzoekslijnen uitgezet in dit project, die in Q1 van 2019 afgerond werden. Allereerst is in de pilot studie, waarin op twee bedrijven bij ieder van 50 geiten melk en mest verzameld is, een analyse uitgevoerd op monsters waarbij bij het eerste bedrijf helaas duidelijk werd dat de isolatie van DNA uit melk nog niet voldoende geoptimaliseerd was. Deze optimalisatie is vervolgd en de data van het tweede bedrijf waren wel bruikbaar. Deze data leverde echter geen hard bewijs voor het bestaan van de darm-melkklier route in geiten. Microbiota van melk liet grote hoeveelheden Streptococcus en Trueperella zien, welke naar alle waarschijnlijkheid verontreinigingen zijn geweest. Wanneer deze uit de analyse verwijderd werden was er echter geen verband gevonden tussen de mestmonsters en de beide uierhelft melkmonsters (zie figuur 1), en ook geen verband met de cel- en kiemgetal data uit de melkmonsters.

Daarnaast is er een inventarisatie studie gedaan van de kiemgetalproblematiek binnen en tussen bedrijven (cross-sectioneel) m.b.v. een enquête met een focus op voedingsinvloeden, opgezet met ondersteuning van faculteit sociale wetenschappen van de UU. De data van deze enquête zijn in februari 2019 geanalyseerd. Uit de resultaten bleek dat de krachtvoergift (kg/100 kg melk) een sterke samenhang heeft met het kiemgetal, waarbij een hogere krachtvoergift geassocieerd was met een hoger tankmelk kiemgetal. Dit was ook terug te zien in het feit dat de consistentie van de mest gerelateerd was aan het kiemgetal en (zoals was te verwachten) ook aan de krachtvoergift. Biologische bedrijven en bedrijven met weidegang (wat vaak samengaat) hadden gemiddeld lagere kiemgetallen dan reguliere bedrijven. Ook bedrijven die regelmatig voer aanschuiven (vaker dan 1 keer per dag) hadden lagere kiemgetallen dan bedrijven waar dit minder frequent gebeurt, net als bedrijven die enkel leidingwater gebruiken in plaats van bronwater. Het voeren van uitsluitend geitenbiest aan lammeren was ook geassocieerd met lagere kiemgetallen in vergelijking met voeren van koeienbiest, kunstbiest of combinaties van soorten biest. Al deze factoren zouden kunnen samenhangen met het type veehouder (en dus

indirect met het kiemgetal samenhangen), maar zouden ook verklaard kunnen worden vanuit de hypothese dat deze voedingsfactoren invloed hebben op darmgezondheid en/of immuunstatus van de geit en op die manier het kiemgetal direct beïnvloeden.

Verder is er in januari (drachtige geiten) en maart (pas gelammerde geiten) 2019 een pilotstudie opgezet waarin getracht werd de darm-melkklier route in geiten aan te tonen. Hierin werd probiotica met bekende bacterieculturen 4 dagen gegeven aan 20 melkgevende drachtige geiten in 2<sup>e</sup>-4<sup>e</sup> lactatie, welke vergeleken werden met 20 vergelijkbare geiten die niet de probiotica krijgen. Vervolgens werd gekeken of specifieke bacteriën uit de probiotica teruggevonden konden worden in de melk in de dagen erna (tot 15 dagen na eerste toediening). Hieruit bleek dat de bacteriën aanwezig in de probiotica niet meer teruggevonden werden in de melk van geiten waaraan de probiotica was toegediend vergeleken met de controle dieren. Dit gold voor zowel de drachtige als de pas gelammerde geiten.

Hoewel deze data het bestaan van de darm-melk route niet ontcrachten, bieden ze ook geen bewijs voor deze hypothese.



Figuur 1: Mest en melk top 30 genera microbiota zonder Streptococcus en Trueperella

Resultaten van deze 3 studies waren de basis voor de Go/NoGo beslissing in april 2019, waar besloten is het project door te zetten, maar de wetenschappelijke richting van het project te verleggen en de nauwe onderzoeksfocus op de dam-melkklier route te verbreden tot onderzoek naar immuuncompetentie en darmgezondheid van de geit. Na specificatie van deze wijziging in een onderzoeksvorstel heeft de stuurgroep in september 2019 aangegeven met deze wetenschappelijke wijziging akkoord te gaan. Het aangepaste voorstel is bijgesloten bij deze voorgaangsrapportage.

In november van 2019 is er een CCD voorstel ingediend voor de vervolgstudies getiteld "Onderzoek naar de mogelijke relatie tussen het kiemgetal in geitenmelk en het functioneren van het immuunsysteem en darmgezondheid en testen van mogelijke voederinterventies om het kiemgetal te beïnvloeden". Deze aanvraag geldt voor:

- (1) een observationele, longitudinale veldstudie waarin wordt onderzocht welke immunologische parameters, darmgezondheidsparameters en overige parameters samenhangen met de uitscheiding van bacteriën in de melk.
- (2) een interventiestudie, waarin diverse voedingsgerelateerde interventies die mogelijk het kiemgetal in de melk kunnen beïnvloeden op effectiviteit worden getest.

Verder zijn de overige voorbereidingen voor de longitudinale velstudie van begin 2020 begonnen.

<b>Aantal opgeleverde producten in 2019</b> (geef in een bijlage de titels en/of omschrijvingen van de producten of een link naar de producten op de projectwebsite of andere openbare websites)			
Wetenschappelijke artikelen	Rapporten	Artikelen in vakbladen	Inleidingen/workshops
	1		1

**Titels/omschrijvingen van belangrijkste producten in 2019 (max. 5) en hun doelgroepen**

**Aangepast voorstel projectplan** – gedeeld met alle betrokken partijen en goedgekeurd door stuurgroep.

**Inleiding 7/11/2019:** Duurzame beheersing van kiemgetal in geitenmelk: update voor de geitencontactcommissie.

Doelgroep: geitenhouders en geitendierenartsen en veevoedingsbedrijven actief in de melkgeitensector.

**Bijlage: Titels/omschrijvingen van alle producten in 2019 of een link naar deze producten op de projectwebsite of andere publieke websites**

Bijlage 1: Aangepast voorstel projectplan

# Voorstel aanpassing projectplan 'Duurzame beheersing van kiemgetal in geitenmelk'

Rowenda Geers, Gerrit Koop, Mark Bouwens, juli 2019

## Introductie

In januari 2018 is het project 'Duurzame beheersing van kiemgetal in geitenmelk' gestart, waarbij de promovendus in mei is aangesloten. Het GO/NO GO moment van dit PPS project, om het project na het eerste jaar waar nodig bij te kunnen sturen of stop te zetten indien er geen zicht was op potentiële interventies, heeft 17 april 2019 plaatsgevonden. Tijdens deze plenaire vergadering zijn de eerste resultaten gepresenteerd van de 3 studies die zijn uitgevoerd in het eerste jaar. De beslissing om het project voort te zetten hing af van of er aanwijzingen waren gevonden die de hypothese achter het project (de beïnvloeding van het kiemgetal door de aanwezigheid van de entero-mammary pathway in geiten) aantoont. De gepresenteerde resultaten gaven geen bewijs voor het bestaan van de entero-mammary pathway in geiten, maar er zijn wel voeding-gerelateerde risicofactoren voor hoog kiemgetal op bedrijfsniveau gevonden. Wij hebben daarom voorgesteld om het project voort te zetten, maar de wetenschappelijke focus te verbreden, waarbij niet meer alleen het bestaan van de entero-mammary pathway in geiten wordt onderzocht, maar de immuuncompetentie van het dier meegenomen wordt in het onderzoek. Hierbij is afgesproken dat het budget gelijk zou blijven, maar anders kan worden gealloceerd. De stuurgroep is hiermee akkoord gegaan en heeft opdracht gegeven om dit uit te werken in een concreet onderzoeksplan. Dit plan presenteren we hieronder. De vraag aan de stuurgroep is om haar reactie op dit plan te geven op basis waarvan het plan kan worden uitgevoerd of worden aangepast om goed aan te sluiten bij de ideeën en wensen van de stuurgroep.

## Interpretatie van resultaten uit eerste jaar

Hoewel er geen bewijs is gevonden voor de hypothese dat de entero-mammary pathway het kiemgetal beïnvloedt, zijn er wel voeding-gerelateerde factoren gevonden die sterk samenhangen met het kiemgetal. Uit de resultaten bleek dat de krachtvoergift (kg/100 kg melk) een sterke samenhang heeft met het kiemgetal, waarbij een hogere krachtvoergift geassocieerd was met een hoger tankmelk kiemgetal. Dit was ook terug te zien in het feit dat de consistentie van de mest gerelateerd was aan het kiemgetal en (zoals was te verwachten) ook aan de krachtvoergift.

Biologische bedrijven en bedrijven met weidegang (wat vaak samengaat) hadden gemiddeld lagere kiemgetallen dan reguliere bedrijven. Ook bedrijven die regelmatig voer aanschuiven (vaker dan 1 keer per dag) hadden lagere kiemgetallen dan bedrijven waar dit minder frequent gebeurt, net als bedrijven die enkel leidingwater gebruiken in plaats van bronwater. Het voeren van uitsluitend geitenbiest aan lammeren was ook geassocieerd met lagere kiemgetallen in vergelijking met voeren van koeienbiest, kunstbiest of combinaties van soorten biest. Al deze factoren zouden kunnen samenhangen met het type veehouder (en dus indirect met het kiemgetal samenhangen), maar zouden ook verklaard kunnen worden vanuit de hypothese dat deze voedingsfactoren invloed hebben op darmgezondheid en immuunstatus van de geit en op die manier het kiemgetal direct beïnvloeden. Wij achten de kans reëel dat voeding een oorzakelijk verband heeft op het kiemgetal en vinden het daarom nuttig om dit verder te onderzoeken om daarmee te proberen het mechanisme dat leidt tot de hoge kiemgetallen beter te snappen.

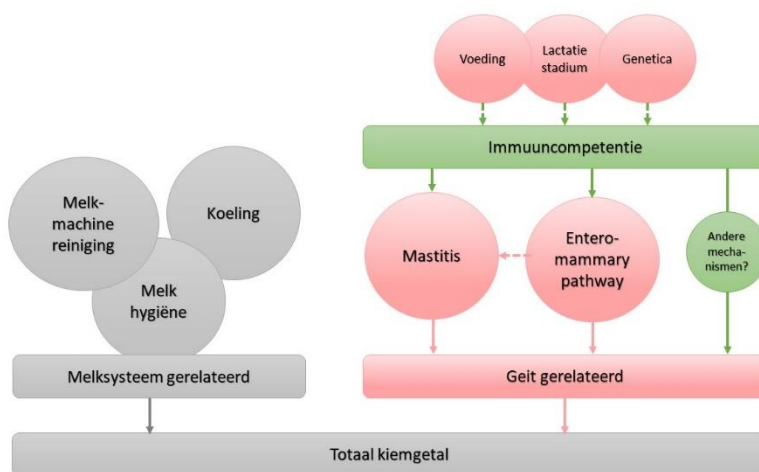
Het mechanisme waardoor voeding het kiemgetal beïnvloedt is onduidelijk. Uit wetenschappelijke literatuur is duidelijk dat krachtvoergift de microbiota van verschillende delen van de darmen van een geit beïnvloedt (Jiao et al., 2019, 2016; Liu et al., 2014). De samenstelling van de microbiota is niet alleen anders wanneer er überhaupt krachtvoer wordt gevoerd in vergelijking met weidegang, maar er is ook een verschil in microbiota tussen geiten met een lage vs. een hoge krachtvoergift. Daarnaast is er ook een effect op het immuunsysteem gevonden. Enerzijds vond er verhoogde activatie plaats van genen die betrokken zijn bij het ontstekingsbevorderend proces, terwijl anderzijds genen die coderen voor cellen die een belangrijke rol spelen in de afweer tegen micro-organismen minder actief werden. Het is dus duidelijk dat voeding een invloed heeft op het immunologisch functioneren van het dier, maar de daaropvolgende link met het kiemgetal en het mechanisme erachter zijn nog niet bekend. Door in vervolgonderzoek immuunparameters te bepalen

kunnen we inzichtelijk maken of individuele variatie in immuunparameters gelinkt kan worden aan de hoogte van het kiemgetal. Hierbij is het van belang om het precieze moment te bepalen wanneer het kiemgetal gaat stijgen (en weer daalt) op individueel en bedrijfsniveau, zodat mogelijke interventies in de toekomst op het juiste moment worden toegepast. Door het opzetten van een longitudinale studie rondom het aflammeren, waarbij voor een langere periode wekelijks metingen worden gedaan, kan naast het in kaart brengen van de individuele immuuncompetentie en de mogelijke verschillen in rantsoen tussen laag en hoog kiemgetal bedrijven, ook de dynamiek van het kiemgetal en het daarin aanwezige microbiom op individueel geitniveau in de tijd in kaart worden gebracht.

Verder is het voor het vervolgonderzoek belangrijk dat een goede meetmethode wordt gebruikt voor de kiemgetal analyses. Ondanks dat de BactoScan een gevalideerde methode is ter vervanging van de plaatmethode, is deze slechts beperkt getest met geitenmelk onder extreme omstandigheden (zeer hoge cel- en kiemgetallen) en zetten we op basis van de eerste resultaten toch enigszins vraagtekens bij de betrouwbaarheid van de metingen in geitenmelk. Het is bekend dat hogere viscositeit als gevolg van een hoog celgetal de kiemgetalmetingen met de BactoScan kunnen beïnvloeden waardoor de resultaten minder betrouwbaar zijn. Dit wordt bevestigd door het lab in Lier waar de analyses met de BactoScan werden uitgevoerd. Dit is vooral het geval bij de extreem hoge celgetal metingen. Door vooraf aan de longitudinale studie een validatie uit te voeren van de BactoScan als alternatief voor de plaatmethode, kan er voor de beste methode om het kiemgetal in kaart te brengen worden gekozen en kunnen we tevens vaststellen of, en in hoeverre, technische meetfouten bijdragen aan de hoge kiemgetallen.

### Werkhypothese en onderzoeksvragen

De hypothese van immuuncompetentie als verklarend mechanisme achter de geobserveerde samenhang tussen voeding en het hoge kiemgetal hebben we ingevoegd in de figuur uit het projectplan (groen gekleurde delen), waarin de oorspronkelijke hypothese ook zichtbaar is (Figuur 1).



Figuur 1: Mogelijke oorzaken van hoog kiemgetal, waarvan de melksysteem gerelateerde oorzaken (grijs) in eerder onderzoek al zijn aangetoond en de geit gerelateerde oorzaken (roze) in dit PPS project worden onderzocht. Nieuw is de hypothese van immuuncompetentie als drijfveer voor hoog kiemgetal (groen).

Hoewel we geen bewijs hebben gevonden voor de hypothese dat de entero-mammary pathway achter de gevonden voedingseffecten zit, kunnen we deze nog niet uitsluiten. Daarom is besloten om pragmatisch te werk te gaan om de kans op het vinden van effectieve interventies te maximaliseren waarbij voeding nog altijd het uitgangspunt zal zijn.

De hoofdvraag die hierbij centraal staat is als volgt:

#### **1- Welke geitgebonden factoren beïnvloeden het kiemgetal?**

Tijdens het eerste jaar lag de focus op de entero-mammary pathway om deze vraag te beantwoorden. In het gewijzigde plan willen we ook het immuunsysteem erbij gaan betrekken:

- a. *Heeft de immuuncompetentie van een dier invloed op de hoogte van het kiemgetal?*

Door het gebruik van eerder beschreven immuunparameters uit laag invasieve bloed monsters (bijv. immuun genen uit witte bloedcellen (Berry et al, 2018)) en non-invasieve (melk) monsters (bijv. uit melk fat globules (MFG) RNA (Brenaut et al. 2014)) kan de immuunresponse en competentie van de geit vergeleken worden met de hoogte van het kiemgetal.

*b. Is er een verschil in microbiota van geitenmelk tussen geiten met laag en hoog kiemgetal, gekoppeld aan een mogelijk verschil in (variatie in) immuunparameters?*

De gevonden immuunparameters die gelinkt kunnen worden aan kiemgetal hoogte kunnen vervolgens vergeleken worden met microbiota verschillen in geitenmelk tussen de hoog en laag kiemgetal dieren/bedrijven.

Daarnaast dienen de volgende nevenvragen beantwoordt te worden:

2- *Hoe verloopt het individuele kiemgetal door de tijd heen? M.a.w. hoe is de dynamiek van het kiemgetal?*

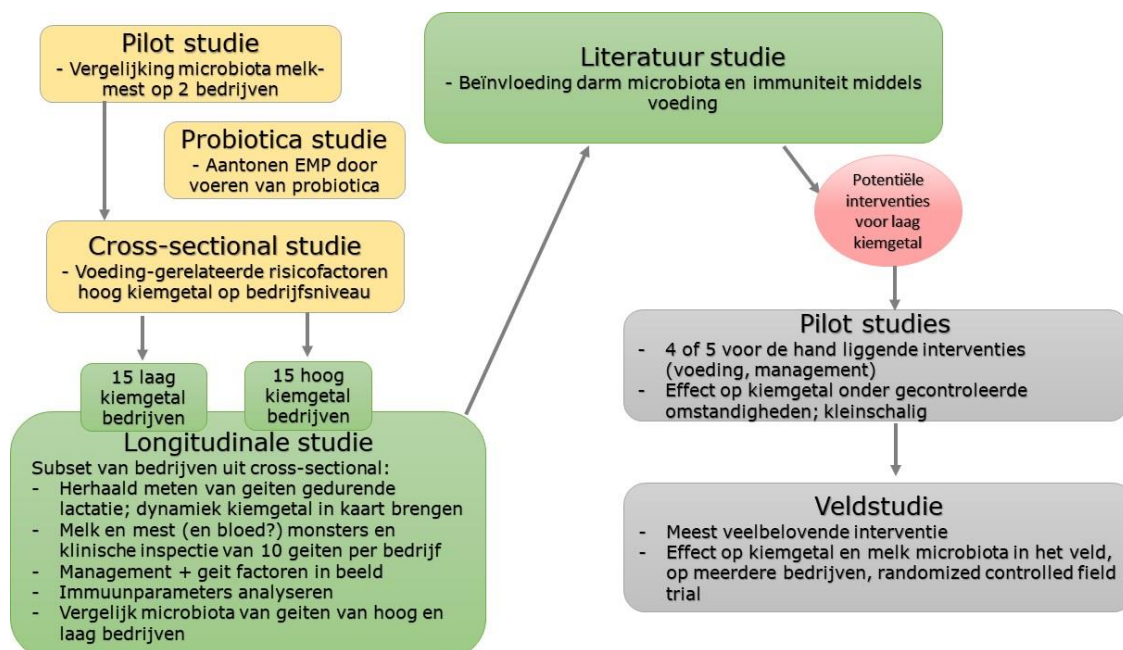
3- *Zijn er in de kiemgetal bepaling van geitenmelk met behulp van de BactoScan aanwijzingen voor technische meetfouten als oorzaak van hoge meetresultaten?*

### Onderzoeksoepzet

Het project zal dus voortgezet worden met als grootste wijziging ten opzichte van het originele projectplan een focus op overall immuuncompetentie in plaatst van alleen op de entero-mammary pathway. Dit leidt tot de volgende praktische aanpassing:

- De case-control studie verandert in een longitudinale studie waarbij over een langere periode, 2 maanden, rondom het aflammeren wekelijkse monsters worden genomen voor kiem- en celgetalmetingen. Hierbij zal de immuuncompetentie van individuele dieren worden meegenomen en zal van een subset monsters de microbiom samenstelling worden bepaald. Hiernaast zullen ook tankmelkmonsters genomen worden om ook op bedrijfsniveau de dynamiek van het kiemgetal in kaart te brengen rondom het aflammeren.
- Tijdens de literatuur studie zal ook de immuuncompetentie en de link met voeding en het kiemgetal worden bestudeerd.

Ondanks het wijzigen van het plan, is het doel nog altijd om uit te komen bij een shortlist van potentiële interventies die vervolgens in de praktijk getest gaan worden. In figuur 2 is het overzicht van het gehele PPS-project met de verschillende studies te zien, waarbij de groene onderdelen het gewijzigde plan weergeven.



Figuur 2: Overzicht van de verschillende studies in het project: uitgevoerde studies (geel), studies uit het originele plan (grijs) en de gewijzigde studies (groen).

## Slot

Door de richting te veranderen en de immuuncompetentie van de geit bij het vervolgonderzoek te betrekken hopen we de kans op succes om het mechanisme achter de verhoging van het kiemgetal beter te begrijpen te maximaliseren, zodat we gericht kunnen zoeken naar effectieve manieren om het kiemgetal op geitenbedrijven te kunnen beheersen. We hebben er vertrouwen in dat de vervolgonderzoeken hier een bijdrage aan zullen leveren, maar horen graag de ideeën en feedback van de stuurgroep. Daarmee kunnen we het plan indien nodig verder aanscherpen of bijsturen, om uiteindelijk een zo goed mogelijk plan te maken waarmee de kansen op succes maximaal zijn.

## Referenties

- Berry A, Wu CW, Venturino AJ, Talaat AM. 2018. Biomarkers for Early Stages of Johne's Disease Infection and Immunization in Goats. *Front Microbiol.* 9:2284. doi:10.3389/fmicb.2018.02284. eCollection 2018.
- Brenaut P, Lefèvre L, Rau A, Laloë D, Pisoni G, Moroni P, Bevilacqua C, Martin P., 2014. Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stages of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. *Vet Res.* 45:16. doi: 10.1186/1297-9716-45-16.
- Jiao, J., Lu, Q., Forster, R.J., Zhou, C., Wang, M., Kang, J., Tan, Z., 2016. Age and feeding system (Supplemental feeding versus grazing) modulates colonic bacterial succession and host mucosal immune maturation in goats. *J. Anim. Sci.* 94, 2506–2518. <https://doi.org/10.2527/jas2015-0081>
- Jiao, J., Zhang, X., Wang, M., Zhou, C., Yan, Q., Tan, Z., 2019. Linkages between Epithelial Microbiota and Host Transcriptome in the Ileum during High-Grain Challenges: Implications for Gut Homeostasis in Goats. *J. Agric. Food Chem.* 67, 551–561. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05591>
- Liu, J., Xu, T., Zhu, W., Mao, S., 2014. High-grain feeding alters caecal bacterial microbiota composition and fermentation and results in caecal mucosal injury in goats. *Br. J. Nutr.* 112, 416–427. <https://doi.org/10.1017/s0007114514000993>