

# Weerbaarheid verbeter

Diervoeding

[Carolien Makkink]

Een van de doelstellingen van Feed4Foodure is om via onderzoek bij te dragen aan het verbeteren van de weerbaarheid van landbouwhuisdieren. Een eerste proef met biggen toont aan dat stress invloed heeft op immunologische processen. Toediening van antibiotica in de vroege jeugd kan effect hebben op de immunocompetentie van het varken in het latere leven.

Kennis van de samenhang tussen voeding, darmmicrobiota en immunocompetentie biedt aanknopingspunten om via voer de gezondheid van landbouwhuisdieren gericht te verbeteren. In het publiek-private samenwerkingsverband Feed4Foodure (F4F) richt het onderdeel Voeding-Darmgezondheid-Immunitieit (VDI) zich op verschillende aspecten van deze samenhang. Onlangs werd PPS-F4F-VDI nader toegelicht voor het bedrijfsleven.

## Immunocompetentie

Immunocompetentie is het vermogen om adequaat te reageren op antigenen. Het dier moet in het geweer komen tegen infectieuze antigene stimuli (ziekteverwekkers) en tegen interne negatieve prikkels (kankercellen). Onschuldige (voedsel) antigenen moeten juist worden getolereerd door het immuunsysteem. Huub Savelkoul, hoogleraar celbiologie en immunologie aan Wageningen University, legt uit dat immunocompetentie op jonge

leeftijd moet worden ontwikkeld.

Het immuunsysteem wordt onderverdeeld in aangeboren weerstand (aspecifiek) en adaptieve weerstand (specifiek). In het aspecifieke systeem gaan neutrofiële granulocyten, macrofagen en natural killer cells via chemotaxis op zoek naar schadelijke bacteriën. Deze immunocompetente cellen maken de bacteriën onschadelijk en zorgen voor herstel van weefselschade. Via deze weg wordt 90 tot 95 procent van de indringers snel gedood. De resterende boosdoeners worden aangepakt door de lymfocyten van het specifieke immuunsysteem. Voor dit proces is een adaptatieperiode van drie tot vier dagen nodig. De T-cellen van het specifieke immuunsysteem hebben een geheugenfunctie, waardoor de reactie bij een tweede aanval van hetzelfde pathogeen sneller verloopt.

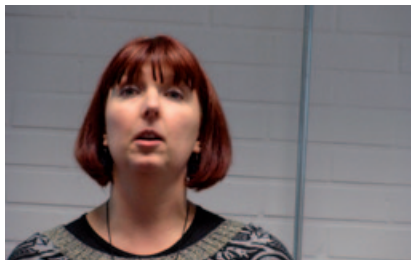
Binnen het onderzoeksprogramma F4F-VDI worden de interacties tussen voeding, darmmicrobiota en immuunsysteem

bestudeerd. "We onderzoeken voedingsinterventies die het evenwicht tussen stimulatie en suppressie van het immuunsysteem optimaliseren. Stimulatie is nodig als de reactie op pathogenen onvoldoende is en suppressie is wenselijk als het immuunsysteem te sterk reageert op onschadelijke stimuli. In dat laatste geval kunnen ontstekingsreacties, auto-immuunziekten en afstoting van transplantaten optreden", legt Savelkoul uit. De balans tussen respons en tolerantie wordt gestuurd door de dendritische cellen van het immuunsysteem.

"Meten is weten als je weet wat je meet", zegt Savelkoul. "Daarom werken we in F4F-VDI aan de ontwikkeling van bio-markers om de status van het immuunsysteem vast te stellen." Er is veel kennis beschikbaar over immunoreacties bij ziekte, maar niet over het immunologische evenwicht bij gezonde mensen en dieren. Het is dan ook niet zeker of dezelfde bio-markers kunnen worden gebruikt bij zowel gezonde als bij zieke dieren.

## Darmmicrobiota

Het immuunsysteem in de darm zit ingewikkeld in elkaar. De darmwand is bedekt met een mucuslaag die uit twee delen bestaat: een mobiele waterlaag waarin bacteriën zich vrij kunnen bewegen en een gel-laag die vrijwel ondoordringbaar is voor bacteriecellen. Voedingscomponenten kunnen op verschillende darmniveaus het immuunsys-



Astrid de Greeff



Marcel Hulst



Huub Savelkoul

# e ren via voer

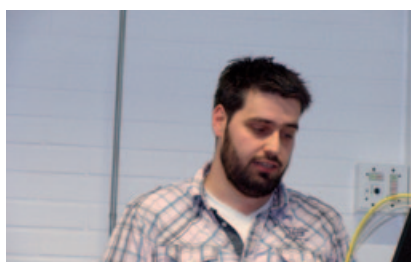
teem moduleren. Voercomponenten kunnen de samenstelling van de darm-microbiota en de productie van metabo-lieten beïnvloeden, interacteren met het darmepitheel (cytokineproductie, barriè-refunctie), lokaal immuuncellen active-ren en de migratie van immuuncellen beïnvloeden. Onderzoek naar de invloed van voeding op het immuunsys-teem moet zich dan ook richten op deze vier routes. De gebruikte onderzoeks-methoden en -technieken in F4F-VDI zijn dan ook divers.

### Gentechnieken

Astrid de Greeff, onderzoeker bij het Centraal Veterinair Instituut, vertelt over de mogelijkheden in dierexperimenteel onderzoek. In de darminhoud en mest van proefdieren kan de samenstelling van de microbiota worden bepaald. De darmwand kan histologisch worden onderzocht (bijvoorbeeld darmvloklen-gte, cryptediepte, aanwezigheid van Peyerse platen en slijmbekercellen). In de epitheelcellen van de darmvlokken of in het bloed kan de expressie van diverse genen worden vastgesteld. Met behulp van immunohistochemische tech-nieken wordt de influx van immuuncel-len in het darmweefsel bepaald. De samenstelling van de darmmicrobiota wordt geanalyseerd met genetische tech-nieken. "Dat is een grote sprong vooruit in vergelijking met traditionele kweekme-thodes in petrischaaltjes", legt De Greeff uit. "Slechts 5 procent van de bacteriën in

Tabel 1. Neonatale interventies bij pluimvee en varkens

<b>Pluimvee</b>		
Nutritionele factor	Type	Effect
Aminozuren	Arg Glx	Hogere titers tegen virus Meer gewichtstoename Meer IgG en IgA in serum
Grondstoffen	Tarwe/soja	Shift in microbiota Meer T-cel-infiltratie
Vetzuren	Middenlangketen	Betere groeiprestaties Minder Salmonella-kolonisatie
Prebiotica	GOS/FOS	Meer fecale bacteriën Betere heterofielfunctie
Probiotica	E. faecium en Lactobacillen	Betere dierprestaties Meer Bifido-bacteriën
Overig	Depletie vit. E en/of selenium	Minder lymfocytenmaturing Minder functionele capaciteit van lymfocyten
<b>Varkens</b>		
Nutritionele factor	Type	Effect
Aminozuren	Arg	Minder darmpermeabiliteit Minder necrotiserende enterocolitis
Vitaminen/mineralen	Thr ZnO	Meer mucine Snellere groei
Vetzuren	Kortketen Langketen	Meer epitheelproliferatie Sneller acuut herstel na ischemia
Prebiotica	GOS/FOS	Meer lactobacillen Meer melkzuur
Probiotica	E. faecium en Lactobacillen	Minder diarree Betere effectiviteit tegen E. coli
Overig	Spray-dried bloedplasma	Betere darmvlokontwikkeling Betere groeiprestaties Beter antioxidantsysteem



Dirk-Jan Schokker



Mari Smits



Jan van der Meulen

>>>

## >> Weerbaarheid verbeteren via voer

de darm laat zich kweken, terwijl je met sequencing op basis van een uniek stukje bacterie-DNA een volledig beeld krijgt van de microbiotasamenstelling.”

De genexpressie van de darmwand wordt vastgesteld in darmwandschraapsel. “De hoeveelheid RNA in een cel is een maat voor de ‘status’ van de darmwandcel. Met behulp van een microarray kunnen we snel vaststellen welke genen ‘up-gereguleerd’ of ‘down-gereguleerd’ zijn in de darmwandmucosa”, vertelt De Greeff. “Op die manier analyseren we netwerken van samenhangende genen. Het is vervolgens de vraag of we de genexpressie kunnen beïnvloeden door de microbiotasamenstelling te veranderen via de voeding.”

### Modellen

Jan van der Meulen is specialist darmfysiologie bij WUR-LR en tevens proefdierdeskundige. Hij geeft een overzicht van modellen die bruikbaar zijn binnen het F4F-VDI-onderzoeksprogramma. Bij in vitro-onderzoek worden componenten (losse cellen, stukjes weefsel) gebruikt, los van hun natuurlijke samenhang in het lichaam. Darmcellijnen zijn beschikbaar van de mens (Caco-2-cellen) en van het varken (Ipec-celijn). Met dergelijke cellijnen worden de interacties tussen darmwandcellen en diverse bacteriën onderzocht. Ook het effect van LPS (bacteriecelwandcomponent) op de genexpressie van darmepitheelcellen kan in vitro worden bestudeerd.

Bij ex vivo-onderzoek wordt de functie van weefsel bestudeerd. Door stukjes darmweefsel in een Ussing chamber te monteren, wordt de absorptie van verschillende stoffen gemeten. De volgen-

Tabel 2. Carry-over effecten van zeewier van zeug op big op vleesvarken.

Dracht	Lactatie	Groei big dag 0-21 (g/d)	Villus/crypt-ratio	Groei big/vlv dag 21-117 (g/d)
Geen	Geen	291 <sup>b</sup>	1,74 <sup>b</sup>	706 <sup>b</sup>
Wel*	Geen	334 <sup>a</sup>	1,91 <sup>a</sup>	778 <sup>a</sup>
Geen	Wel*	321 <sup>ab</sup>	1,96 <sup>a</sup>	793 <sup>a</sup>
Wel*	Wel*	344 <sup>a</sup>	1,87 <sup>ab</sup>	787 <sup>a</sup>

\*Het zeewierextract bevat 82% RAS, 10% laminarin en 8% fucoidan.  
Dosering: 10 gram zeewierextract per zeug per dag. (Bron: Leonard et al., 2011)

de halte is in situ-onderzoek. Hierbij blijft het weefsel in het (genarcotiseerde) dier en worden delen van de darm afgebonden en geperfuseerd met oplossingen. Omdat de bloedvoorziening van het darmkanaal intact blijft, wordt met in situ-onderzoek een beeld verkregen van absorptie en secretie.

In vivo-onderzoek maakt gebruik van het hele, levende organisme. Voor immunologisch onderzoek wordt vaak gebruikgemaakt van challenge-modellen, zoals het necrotische enteritis-model bij pluimvee (combinatie-challenge coccidiose en clostridium perfringens).

“Met al deze mogelijkheden is het de uitdaging om de uitkomsten van studies naar functionele voercomponenten met elkaar in verband te brengen”, benadrukt Van der Meulen. “Ook ‘in silico’-modellen zijn volop in ontwikkeling, waarbij computersimulaties worden ingezet om inzicht te krijgen in interacties. Deze computermodellen moeten wel worden gevoed met resultaten van experimenteel onderzoek”, merkt Van der Meulen op.

### Praktijkbehoeften

Voor de veehouderij is uiteindelijk alleen de economische invloed van nutritionele interventies van belang. Naast het fundamentele onderzoek in F4F-VDI is er dan ook een onderzoeksprogramma Meer Met Minder (F4F-MMM), gericht op de effecten van interventies op groei, voederconversie en financiële resultaten voor de veehouderij. In dit F4F-onderdeel zijn de drijfveren verbetering van de gezondheidsstatus en vermindering van antibioticagebruik, met behoud van technische resultaten. F4F-VDI en F4F-MMM worden dan ook nadrukkelijk gekoppeld.

Aanwezigen vanuit het diervoederbedrijfsleven merken op dat in vivo-onderzoek altijd de doorslag zal geven. Als modulatie van het immuunsysteem te veel energie en nutriënten kost, dan wordt het gezondheidsvoordeel teniet gedaan door de groeiverliezen. De praktische veehouderij streeft naar robuuste, immunocompetente dieren, maar dit mag niet ten koste gaan van groei of voederconversie.

Opgemerkt wordt dat bestaande challenge-modellen erop gericht zijn om alle dieren ‘ziek’ te maken. Het kan ook interessant zijn om de variatie in respons nader te onderzoeken: Waarom hebben sommige dieren wel last van een infectie en andere niet? Juist die variatie in immunorespons geeft inzicht in het werkingsmechanisme op dier-niveau. Bij het analyseren van de wetenschappelijke literatuur moet rekening worden gehouden met het feit dat ‘negatieve’ uitkomsten vaak niet worden gepubliceerd. Dit kan zorgen voor

### Data-mining

De wetenschappelijke literatuur en internet bieden een schat aan data. Marcel Hulst, bio-informaticus bij WUR-LR, legt uit dat webprogramma's beschikbaar zijn waarin lijsten van eiwitten en genen kunnen worden ingevoerd. De programma's leveren als output een clustering van genen of eiwitten in netwerken, waardoor een beeld wordt gekregen van de functionele samenhang. “Analyse langs deze route biedt aanknopingspunten voor het vinden van veelbelovende stoffen voor het moduleren van het immuunsysteem en de microbiota. Daarnaast kan de bio-informatica potentiële bio-markers identificeren.” Hulst biedt aan om voor mensen uit de diervoederindustrie een workshop ‘data-mining’ te organiseren.

een 'bias' bij het beoordelen van veelbelovende voedingsinterventies.

#### **Effect zeewierextract**

Dirk-Jan Schokker van WUR-LR-genomica vertelt dat onderzoek naar interventies bij jonge dieren al resultaten heeft opgeleverd. Tabel 1 geeft een overzicht van nutritionele factoren die bij pluimvee en varkens kort na de geboorte interessante effecten laten zien.

Daarnaast wordt ook onderzoek gedaan naar maternale carry-over effecten. Toevoeging van zeewierextract aan het voer van zeugen tijdens dracht en/of lactatie blijkt bijvoorbeeld effecten te hebben op de biggen (zie tabel 2). De biggen van zeugen die zeewierextract ontvingen, doen het zowel in de zoogperiode als in de mestfase beter. Hieruit blijkt dat maternale voedingsinterventies langdurig effect kunnen hebben op het nageslacht.

#### **Rol microbiota**

De microbiota in de darm heeft invloed op de ontwikkeling van immunocompetentie. Mari Smits, projectleider van F4F-VDI, legt uit dat de omgeving van een jong dier effect heeft op de kolonisatie, diversiteit en samenstelling van de darmmicrobiota. De micro-organismen in de darm beïnvloeden op hun beurt de immunocompetentie en de risico's op ziekte in het latere leven. Een eerste proef binnen F4F-VDI, met jonge biggen, heeft al aangetoond dat stress, al dan niet in combinatie met een antibioticabehandeling, invloed heeft op immunologische processen. Antibiotica-injectie zorgt voor een afname van de activiteit van immuungerelateerde processen, terwijl stress deze activiteit doet toenemen. Toediening van antibiotica in de vroege jeugd kan effect hebben op de immunocompetentie van het varken later in het leven. Antibiotica kunnen zowel direct als indirect (via de microbiota) het immuunsysteem beïnvloeden. Vanaf de geboorte raakt het maagdarmkanaal van een big gekoloniseerd met bacteriën en wordt de kiem gelegd voor een gezonde microbiota. Via de voeding kan de samenstelling en diversiteit van de microbiota, en daarmee wellicht ook

de immunocompetentie, worden gemoduleerd. Bij steriele, kiemvrije, biggen ontwikkelt het immuunsysteem zich niet naar behoren.

De verschillende projecten binnen de

onderzoeksprogramma's F4F-VDI en F4F-MMM bieden in de toekomst meer aanknopingspunten om via de voeding de weerbaarheid van landbouwhuisdieren tegen invloeden van buiten te verbeteren. ■



Stress bij een jonge big kan effect hebben op de immunocompetentie van het varken in het latere leven.