



---

# Ontwikkelen van een meetlat voor immuuncompetentie in varkens, vleeskuikens en vleeskalveren

Alfons Jansman, Dirkjan Schokker, Astrid de Greeff, Marinus van Krimpen, Marcel Hulst,  
Annemarie Rebel, Mari Smits. Wageningen University & Research  
Arie Kies (DSM), Petra Roubos (Trouw Nutrition), Els Willems (Agrifirm),  
Evelien Alderliesten (Coppens), Eelke van der Wal (VanDrie Group)

RAPPORT 1097



**WAGENINGEN**  
UNIVERSITY & RESEARCH

---

---

# Ontwikkeling van een meetlat voor immuuncompetentie in varkens, vleeskuikens en vleeskalveren

Alfons Jansman, Dirkjan Schokker, Astrid de Greeff, Marinus van Krimpen, Marcel Hulst, Annemarie Rebel, Mari Smits. Wageningen University & Research

Arie Kies (DSM), Petra Roubos (Trouw Nutrition), Els Willems (Agrifirm), Evelien Alderliesten (Coppens), Eelke van der Wal (VanDrie Group)



Dit onderzoek werd uitgevoerd door Wageningen University & Research in opdracht van het Ministerie van Economische Zaken in het kader van de PPS (Publieke Private Samenwerking) Feed4Foodure deel B: Voeding, Darmgezondheid en Immuniteit' (project nummer BO-22.04-002-001)

Wageningen University & Research  
Wageningen, 2017

---

Rapport 1097

---

Jansman, Alfons, Dirkjan Schokker, Astrid de Greeff, Marinus van Krimpen, Marcel Hulst, Annemarie Rebel, en Mari Smits. Wageningen University & Research.

Arie Kies (DSM), Petra Roubos (Trouw Nutrition), Els Willems (Agrifirm), Evelien Alderliesten (Coppens), en Eelke van der Wal (VanDrie Group)

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/444537> of op [www.wur.nl/livestock-research](http://www.wur.nl/livestock-research) (onder Wageningen Livestock Research publicaties).

© 2018 Wageningen Livestock Research

Postbus 338, 6700 AH Wageningen, T 0317 48 39 53, E [info.livestockresearch@wur.nl](mailto:info.livestockresearch@wur.nl), [www.wur.nl/livestock-research](http://www.wur.nl/livestock-research). Wageningen Livestock Research is onderdeel van Wageningen University & Research.

Wageningen Livestock Research aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke wijze dan ook zonder voorafgaande toestemming van de uitgever of auteur.



De certificering volgens ISO 9001 door DNV onderstreept ons kwaliteitsniveau. Op als onze onderzoeksopdrachten zijn de Algemene Voorwaarden van de Animal Sciences Group van toepassing. Deze zijn gedeponneerd bij de Arrondissementsrechtbank Zwolle.

Wageningen Livestock Research Rapport 1097



---

# Inhoud

<b>Voorwoord</b>	<b>5</b>
<b>Samenvatting</b>	<b>7</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>9</b>
<b>2 Aanpak</b>	<b>14</b>
2.1 Doel	14
2.2 Weergave van complexe responsen in een meetlat	14
<b>3 Beschrijving van het proces</b>	<b>17</b>
3.1 Lokalisatie immuuncompetentie parameters	17
3.2 Concept van roseplots	17
3.3 Selectie van parameters en hun wegingsfactoren	18
3.3.1 Selectiecriteria	18
3.3.2 Categorieën en weegfactoren	18
3.3.3 Geselecteerde parameters	18
3.4 Kwantificeren van parameters	20
3.5 Uitwerken roseplot concept	21
3.5.1 Roseplot op basis van beschikbare datasets	21
3.5.2 Problemen bij de implementatie van de roseplot	22
3.5.3 Verfijning van de opzet van de roseplot	23
3.6 Software ontwikkeling	29
<b>4 Resultaten</b>	<b>31</b>
4.1 Roseplots	31
4.2 Interpretatie van de roseplots	32
4.3 Challenge studies	34
<b>5 Discussie</b>	<b>36</b>
5.1 Algemeen	36
5.2 Vergelijking responsen op meetlat	37
5.3 “Window of opportunity” voor immuuncompetentie	38
5.4 Associatie respons immuuncompetentie meetlat en effecten na immuun challenge	39
5.5 Parameters meetlat	39
5.6 Meta-analyses microbiota samenstelling darm en genexpressie darmweefsel	41

---

5.7	Uniformiteit studies	41
5.8	Toekomst	42
<b>6</b>	<b>Referenties</b>	<b>44</b>
	<b>Appendix 1</b>	<b>46</b>
	<b>Appendix 2</b>	<b>48</b>

---

# Voorwoord

Feed4Foodure is een publiek-private samenwerking tussen het ministerie van Economische Zaken en Klimaat en een consortium van verschillende partijen uit de diervoedingsindustrie en de dierlijke productieketen. Het onderzoeksprogramma binnen Feed4Foodure heeft de ambitie om een substantiële bijdrage te leveren aan een duurzame en gezonde veehouderij in Nederland. Tegelijkertijd wil het de Nederlandse concurrentiepositie in een mondiale markt versterken.

Een van de lijnen binnen Feed4Foodure is 'Voeding, darmgezondheid en immuniteit' (VDI). Aandachtspunt van deze lijn 'Voeding, darmgezondheid en immuniteit' is het verminderen van het antibioticagebruik in de veehouderij door de weerstand en de algemene gezondheid van landbouwhuisdieren te verhogen. De focus van het onderzoek ligt op het ontwikkelen van innovatieve meettechnieken om darmgezondheid en immuuncompetentie meetbaar te maken.

Het huidige rapport beschrijft de ontwikkeling van een "meetlat" voor immuuncompetentie. Deze meetlat is een eerste generatie meetinstrument dat is gebaseerd op resultaten van onderzoek binnen het VDI programmalijn. In dit rapport worden de opzet en achtergronden van de meetlat beschreven en aangegeven hoe deze meetlat in de toekomst zou kunnen worden verfijnd.

Prof. Dr. Mari Smits, programmaleider Feed4Foodure "Voeding, darmgezondheid en immuniteit".





---

# Samenvatting

Het doel van dit project is om een “meetlat” te ontwikkelen die de effecten van (voedings)interventies gericht op de verbetering van de immunocompetentie van varkens, pluimvee en vleeskalveren kan vaststellen. Immunocompetentie is binnen dit project gedefinieerd als het vermogen van dieren om effectieve responsen van het immuunsysteem te tonen op het moment dat de gezondheid van het dier onder druk wordt gezet. Een meetlat voor immunocompetentie kan in de toekomst door de diervoedingssector gebruikt worden bij de ontwikkeling en evaluatie van nieuwe voerconcepten, ingrediënten en additieven gericht op de verbetering en ondersteuning van diergezondheid.

Het is bekend dat de samenstelling van de voeding van jonge dieren invloed heeft op de functionele ontwikkeling van het maagdarmkanaal en op de samenstelling van de daarin aanwezige microbiota. De interacties tussen de microbiota en de weefsels van het darmkanaal (cross talk) hebben een belangrijke invloed op de ontwikkeling van immunocompetentie. Daarom wordt in dit project gefocust op de effecten van (voedings)interventies op de microbiota, genexpressie veranderingen in darmweefsel, en morfologische en immunologische veranderingen in de darm.

De hier gepresenteerde meetlat voor immunocompetentie is gebaseerd op de resultaten van onderzoek binnen het VDI programma van Feed4Foodure (projecten VDI-11; vleeskuikens, VDI-12; biggen, VDI-13; gespeende biggen en kalveren) waarin m.b.v. model interventies de effecten van variatie in voersamenstelling op de microbiota samenstelling in het darmkanaal, de biologische responsen van darmweefsel en de zoötechnische dierprestaties zijn onderzocht. In de hier gepresenteerde meetlat worden gemeten effecten in deze studies aan elkaar gerelateerd en functioneel inzichtelijk gemaakt.

Dit rapport beschrijft de ontwikkeling en totstandkoming van een eerste versie van de meetlat. Hierbij worden gemaakte keuzes, beperkingen en mogelijkheden van de meetlat bediscussieerd. Tenslotte wordt inzicht gegeven in de mogelijkheden tot verdere verfijningen en de toepasbaarheid van de meetlat.



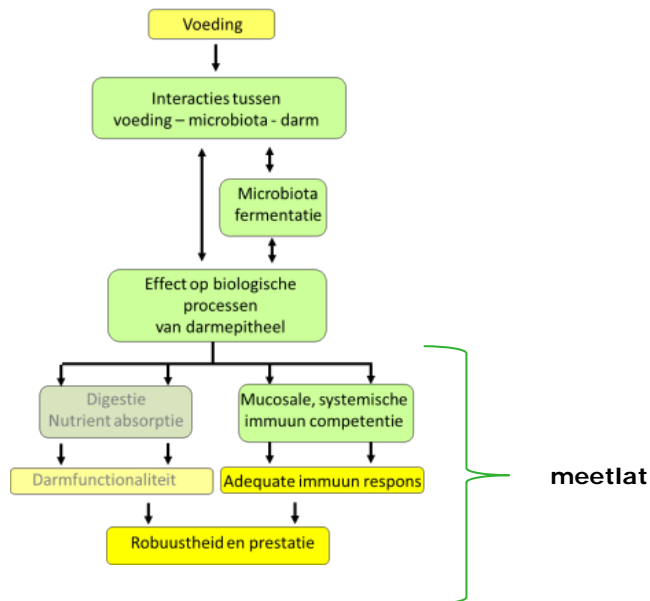
---

# 1 Inleiding

## **Doel**

Het doel van het VDI-10 deelproject is om een eerste generatie “meetlat” te ontwikkelen waarmee immunocompetentie in varkens, vleeskuikens en vleeskalveren gemeten kan worden. Immunocompetentie wordt binnen dit project gedefinieerd als het vermogen van dieren om effectieve responsen van het immuunsysteem te tonen op het moment dat de gezondheid van het dier onder druk wordt gezet (b.v. door antigene eiwitten, mycotoxinen of een infectie). De basis voor deze meetlat bestaat uit de resultaten van studies uitgevoerd in het VDI programma met varkens, vleeskuikens en kalveren, waarin de effecten van verschillende (voer)interventies op verschillende leeftijden zijn gemeten op de microbiota samenstelling in het darmkanaal, expressie van genen in darmweefsels, darmmorfologie en –histologie, en immuun parameters gemeten in het bloed. De interventies zijn gekozen op hun verwachte immuun modulerende effect. Daarnaast zijn in verschillende studies ook de zoötechnische resultaten van de dieren betrokken. De gemeten parameters in deze studies hebben naar verwachting direct of indirect een relatie met de immunocompetentie van dieren. Na ontwikkeling en bewezen toepasbaarheid zal deze meetlat voor immunocompetentie in de toekomst door de diervoedingssector gebruikt kunnen worden bij de ontwikkeling van nieuwe voerconcepten, functionele grondstoffen en additieven gericht op de verbetering van de weerbaarheid, robuustheid en gezondheid van dieren (Figuur 1). Hierdoor kan de diervoedersector gericht bijdragen aan het verhogen van de immunologische weerstand van dieren en daardoor een bijdrage leveren aan het verminderen van het antibioticum gebruik in de veehouderij. Het is nog onduidelijk of het verhogen van immunocompetentie eventueel ten koste gaat van de zoötechnische “performance”.

Er zijn momenteel geen meetmethoden beschikbaar om (ontwikkeling van) immunocompetentie te kwantificeren. Het doel van het VDI programma was daarom een meetlat voor immunocompetentie voor varkens en pluimvee te ontwikkelen, waarbij gebruik wordt gemaakt van resultaten van studies uit het VDI programma waarin de effecten van modelinterventies via de voeding op hiervoor genoemde parameters onder experimentele condities zijn geëvalueerd. Deze eerste generatie meetlat moet tevens een basis vormen voor een toekomstige immunocompetentie meetlat welke toepasbaar is om ook onder praktijkomstandigheden toegepast te kunnen worden. Hiervoor moet de meetlat getest worden onder praktijkomstandigheden, en gevalideerd worden aan de hand van gegevens uit de literatuur. Daarnaast is het voor toepassing onder praktijkomstandigheden wenselijk dat de te meten parameters bepaald kunnen worden zonder dieren op te offeren. Dit deelproject beoogde de ontwikkeling van een eerste generatie meetlat voor immunocompetentie. De meetlat is gebaseerd op resultaten van onderzoek uitgevoerd in de deelprojecten VDI-11, VDI-12, VDI-13 en de voorlopers hiervan.



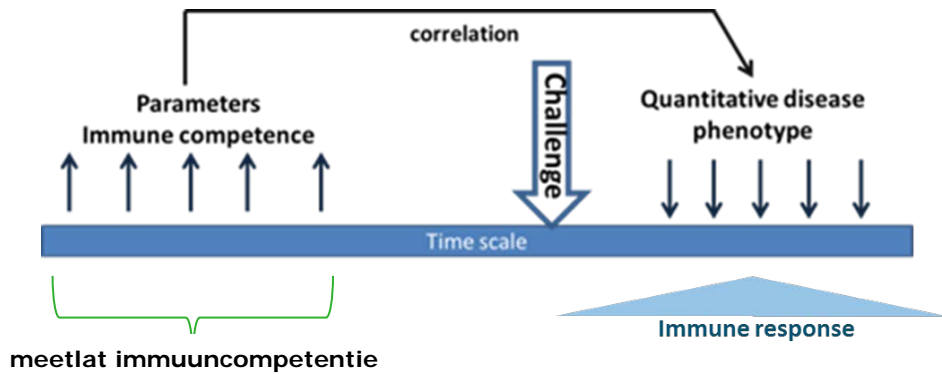
**Figuur 1** Interacties in het maagdarmkanaal tussen voedingscomponenten, de darm microbiota en het mucosale immuun systeem hebben effect op de immunocompetentie van dieren.

### Immuuncompetentie

Immuuncompetentie wordt binnen dit project gedefinieerd als het vermogen van dieren om effectieve responsen van het immuunsysteem te tonen op het moment dat de gezondheid van het dier onder druk wordt gezet. Dit houdt in dat er een afgewogen immunologische balans moet zijn tussen niet of verminderd reageren (tolerantie) en wel reageren of overreageren (ontsteking). Een juiste balans tussen immuunrespons en tolerantie is met name bij hoogproductieve dieren cruciaal, omdat onbalans kan leiden tot ontstekingschade, (secundaire) infecties en verlies aan nutriëntbenutting en uiteindelijk tot (klinische) ziekte en vermindering van dierprestaties. Immuuncompetentie is hiermee niet hetzelfde als het vertonen van reacties van het immuun systeem (immuun responsen). Immuuncompetentie is als intrinsieke eigenschap “aanwezig” vóór challenge en vóór inductie van immunologische responsen. Dit representeert het basis niveau, de mogelijkheid van het dier om te reageren, maar hangt wel samen met de effectiviteit van immuun responsen (Figuur 2).

Een aanzienlijk deel (70-75%) van de cellen van het immuunsysteem is gelokaliseerd in de mucosale laag van het darmkanaal, met name in het jejunum en ileum. Hier vindt voor een belangrijk deel ook de ontwikkeling en regulatie van het mucosale immuunsysteem plaats en wordt vorm gegeven aan de competenties van het immuunsysteem.

Het inzicht in de manier waarop immuuncompetentie gereguleerd wordt, neemt de laatste jaren toe. Het is duidelijk dat de crosstalk in het maagdarmkanaal tussen microbiota en het mucosale immuunsysteem hierbij een belangrijke rol speelt. Dat is de reden waarom veel onderzoek zich richt op het verbeteren van immuuncompetentie door modulatie van de microbiota samenstelling in het darmkanaal via gebruik van specifieke functionele grondstoffen en voederadditieven, zoals pre- en probiotica.



**Figuur 2** *Immuuncompetentie wordt gedefinieerd als het vermogen van het immuunsysteem om te reageren op een immuun challenge. Immuunreacties zijn de daadwerkelijke responsen van het immuunsysteem op een challenge en worden bepaald door de immuuncompetentie van het dier.*

### **Microbiota**

Het darmkanaal van varkens en pluimvee bevat tot naar schatting ongeveer tien keer meer bacteriën ( $10^{14}$ ) dan het totaal aantal lichaamscellen ( $10^{13}$ ). De hoeveelheid genetisch materiaal (DNA) van deze bacteriën is 100x groter dan dat van hun gastheer zelf. De metabole activiteit van deze bacteriën levert een grote bijdrage aan de voorziening van energie en voedingsstoffen aan de gastheer, bijvoorbeeld door productie van kort-ketenige vetzuren. Veel kenmerken van dieren die gebaseerd zijn op het functioneren van het immuunsysteem, zijn gecorreleerd met de samenstelling en/of diversiteit van microbiota. De kolonisatie van de darm begint direct na de geboorte of het uitkomen van het ei. In volwassen dieren bestaat de microbiële populatie in het darmkanaal soms wel uit meer dan 800 verschillende soorten. Zowel de samenstelling als de diversiteit van microbiota wordt beïnvloed door de ingrediënt- en nutriëntsamenstelling van de gebruikte voeders, het genotype van de dieren en het diermanagement (gebruik antibiotica, probiotica starters, prebiotica in voeding, stress, huisvesting) en de interactie met het immuunsysteem van de darm. Microbiota spelen ook een belangrijke rol bij de opbouw en handhaving van een efficiënte barrière functie van het darmepitheel. De rol van microbiota bij (darm)gezondheid is uitgebreid beschreven in een overzichtsartikel: “De rol van microbiota voor een evenwichtig afweersysteem” [1].

### **Darmstoornissen**

Homeostase in het maagdarmkanaal is een belangrijke voorwaarde voor optimale dierlijke productie en een adequate afweer. Tijdens de productiefase kunnen verstoringen van de darm-homeostase optreden, vooral tijdens overgangperiodes die stress met zich mee brengen zoals bij het spenen van biggen. Verstoringen kunnen ook het gevolg zijn van externe factoren zoals houderij-omstandigheden, gebruik van antibiotica, de grondstof- en additievensamenstelling van diervoeders of de aanwezigheid van pathogenen in het dier of zijn omgeving. Verstoring van darm-homeostase gaat meestal gepaard met veranderingen in de samenstelling en de diversiteit van de microbiota, een zogenaamde dysbiose, en met daarmee samenhangende veranderingen in de regulatie van het immuunsysteem. Hierdoor verandert het immunologische evenwicht in de darm en kunnen potentieel pathogene symbionten (pathobionten) uitgroeien of kan er een verandering optreden in de gevoeligheid voor infecties met pathogenen. Bij verstoring van de darm-homeostase kan ook de vertering en absorptie van nutriënten negatief beïnvloed worden, hetgeen invloed kan hebben op de groei en de voederconversie van dieren. Door uitgroeien van pathogenen in het darmkanaal kunnen ook beschadigingen van het darmweefsel ontstaan waardoor de kans op secundaire infecties verder verhoogd wordt. Maagdarmaandoeningen vormen een belangrijk gezondheidsprobleem in de dierhouderij. Omdat het mucosale immuunsysteem van de darm in verbinding staat met het mucosale systeem van de longen, kunnen verstoringen van de homeostase op darmniveau ook effecten hebben op de gevoeligheid van dieren voor luchtweginfecties [2, 3]. Hierdoor kunnen behandelingen die de darm-homeostase bevorderen mogelijk ook een positieve uitwerking hebben op de immunologische afweer in de longen.

### **Levensfasen**

De maternale en neonatale periode zijn cruciaal voor de programmering van het immuunsysteem en de opbouw van immuuncompetentie. Binnen het huidige project wordt de maternale periode bij varkens gezien als de dracht- en de lactatieperiode. In de drachtperiode ontwikkelen de biggen zich in de baarmoeder en tijdens de lactatiefase drinken ze melk bij de zeug. Langs deze (en andere) wegen heeft de zeug invloed op de ontwikkeling van de biggen inclusief hun immunologische ontwikkeling.

---

Voor vleeskuikens heeft de maternale periode alleen betrekking op de moederdieren, omdat de moederdieren en kuikens gescheiden zijn vanaf het moment dat de eieren zijn gelegd.

De neonatale periode wordt gekenmerkt door een geleidelijke afname van de passieve immunologische bescherming vanuit het moederdier (biest of dooier). Biggen en vleeskuikens zijn voor een belangrijk deel afhankelijk van passieve bescherming tegen infecties via opname van colostrum, melk of dooier. Blootstelling van mucosale weefsels (darm, longen, huid) aan microbiële antigenen die aanwezig zijn in de omgeving van de pasgeborene en in melk van het moederdier is noodzakelijk voor de ontwikkeling van een effectief immuunsysteem. Verschillende nutriënten in maternale voeding zijn noodzakelijk voor de ontwikkeling van een goed functionerende darmbarrière en onderliggend immuunsysteem in de nakomelingen. In de literatuur zijn zowel voor varkens als pluimvee voorbeelden te vinden van zowel positieve als negatieve effecten van verschillen in maternale voeding op immunocompetentie [4]. De neonatale periode wordt belangrijk geacht voor de ontwikkeling en programmering van het immuunsysteem. Er worden dan ook strategieën ontwikkeld om in pasgeborenen de kolonisatie van de darm met microbiota te beïnvloeden via vroege voeding om de ontwikkeling van het darmepitheel en het onderliggende immuunapparaat van de jonge dieren te stimuleren. In de neonatale fase vindt kolonisatie van het maagdarmkanaal plaats met microbiota vanuit de omgeving en het moederdier. Dit is het moment waarop nog blijvende invloed uitgeoefend kan worden op de uiteindelijke samenstelling van de microbiota op latere leeftijd. Deze kolonisatie-periode is kritisch voor de ontwikkeling en competentie van het immuunsysteem, voor het bevorderen van de integriteit van het darmepitheel, maar ook voor de efficiëntie van digestie en absorptie van nutriënten op latere leeftijd [5]. In het neonataal dier wordt door de crosstalk tussen de microbiota en de zich ontwikkelende cellen van het mucosale immuunsysteem in deze periode specificiteit en geheugen opgebouwd van zowel de aangeboren als de verworven tak van het immuunsysteem [5-7].

Gedurende latere levensfasen is de gezondheid van productiedieren mede afhankelijk van een evenwichtige balans tussen microbiota en het immuunsysteem (homeostase) waardoor veranderingen in de leefomgeving zoals voeding, infecties, inspanning, of (metabole) stress efficiënt gedetecteerd en geneutraliseerd kunnen worden. Een effectieve respons neutraliseert verstoringen zonder negatieve effecten op de beschikbaarheid en efficiëntie van gebruik van nutriënten voor productie. Dieren met een dergelijk status van het immuunsysteem (goede immunocompetentie) vertonen veerkracht en zijn robuust. De basis voor immunocompetentie gedurende de 'volwassen' fase is reeds gelegd gedurende de neonatale fase, echter tijdens de adulte fase is de competentie van het immuunsysteem (tijdelijk) te moduleren door factoren die ingrijpen op de interacties tussen microbiota in het darmkanaal, samenstelling van de voeding en het darmepitheel. Diervoederadditieven zoals pre- en probiotica, enzymen, organische zuren, etherische oliën, en bepaalde plantenextracten worden verondersteld tijdelijke effecten te hebben op de microbiota in het darmkanaal, gezondheid en functionaliteit van het darmkanaal [8-10]. Deze additieven kunnen hiermee naar verwachting ook invloed hebben op de ontwikkeling van immunocompetentie van varkens, pluimvee en andere landbouwhuisdieren. Immunocompetentie kan ook in negatieve zin beïnvloed worden. Er zijn aanwijzingen dat behandeling van jonge dieren met antibiotica de ontwikkeling van immunocompetentie negatief kan beïnvloeden [11, 12].

### ***Parameters voor immunocompetentie***

Effecten van (voedings)interventies in de maternale, neonatale of adulte fase worden vaak gemeten op performance niveau. Er wordt echter niet gekeken naar de consequenties van (voedings)interventies voor immunocompetentie. Een (voedings)interventie kan op verschillende niveaus invloed hebben op immunocompetentie. Ten eerste kunnen (voedings)interventies een direct effect hebben op de microbiota samenstelling van het maag-darmkanaal, bijvoorbeeld door de samenstelling of diversiteit te veranderen. Ten tweede kunnen (voedings)interventies een effect hebben op het mucosale immuunsysteem, bijvoorbeeld door de hoeveelheid of de functionaliteit van immuun cellen te beïnvloeden of door de barrièrefunctie van de darm te beïnvloeden. Naast de mucosa van de darm, kunnen interventies ook effect hebben op de mucosa van de longen door de bestaande crosstalk tussen mucosale organen. Ten derde kunnen (voedings)interventies ook systemische effecten hebben in het dier, bijvoorbeeld op de kwaliteit en kwantiteit van circulerende antilichamen, complementfactoren, antimicrobiële peptiden, cytokines, of acute fase eiwitten in bloed. Inzicht in deze effecten van (voedings)interventies op de immunocompetentie van een dier maakt het mogelijk om indicatoren te identificeren die samenhangen met een goede ontwikkeling en programmering van het mucosale immuunsysteem of een adequate ontwikkeling en handhaving van de darmbarrière. Dergelijke markers kunnen de basis vormen voor een meetlat voor immunocompetentie, en een indicator worden voor het evenwichtig functioneren van het dier op dat specifieke moment.

---

Het uiteindelijke doel van de meetlat is om deze direct te correleren aan de verwachte effectiviteit van responsen van het immuunsysteem die optreden ná een challenge van het immuunsysteem.

---

## 2 Aanpak

### 2.1 Doel

Het doel van het VDI-10 deelproject was om een eerste generatie “meetlat” te ontwikkelen waarmee immuuncompetentie in varkens, vleeskuikens en vleeskalveren gemeten kan worden. De basis voor deze meetlat waren de resultaten van de afzonderlijke dierproeven die binnen het VDI programma zijn uitgevoerd. Alle uitgevoerde experimenten hadden als doel om de effecten van (voer)interventies op veronderstelde immuuncompetentie parameters te vergelijken met die van dieren in controlegroepen die de betreffende interventies niet ondergingen. In Tabel 1 wordt een overzicht gegeven van de uitgevoerde dierexperimenten (Tabel 1A) en de geanalyseerde parameters (Tabel 1B). De veronderstelling was dat door middel van een geïntegreerde analyse van gemeten effecten op zeer verschillende parameters tot identificatie van parameters voor immuuncompetentie zouden kunnen komen.

In dit rapport wordt de totstandkoming van deze geïntegreerde analyse en de visualisatie daarvan stapsgewijs beschreven. Daarnaast wordt de waarde van de ontwikkelde meetlat bediscussieerd en aangegeven hoe deze in de toekomst verder ontwikkeld zou kunnen worden.

### 2.2 Weergave van complexe responsen in een meetlat

Om diverse soorten data van gemeten parameters in één figuur visueel weer te geven, worden vaak zogenaamde “roseplots” gebruikt. Indien de verschillende soorten data gezamenlijk bijdragen aan één kenmerk of één eigenschap, dan ontstaat een figuur die in één opslag een kwantitatieve indruk geeft van de eigenschap of het kenmerk. Roseplots zijn eerder ook gebruikt in het promotieonderzoek van Esther Kampman-van der Hoek om de gezondheidsstatus van varkensbedrijven in beeld te brengen (<http://edepot.wur.nl/344119>). Voor de meetlat voor immuuncompetentie zoals beschreven in dit rapport is ook gekozen voor visuele weergave van de verschillende gemeten responsen in een roseplot. Cruciale vragen bij de ontwikkeling hiervan waren:

- Welke parameters dienen in de meetlat te worden opgenomen?
- Welke “waarde” kennen we toe aan de verschillende gemeten parameters in relatie tot ontwikkeling van immuuncompetentie?
- Hoe kunnen de betreffende parameters worden weergegeven in een roseplot?

In eerste instantie zijn op deze vragen antwoorden gegeven in brainstormsessies met WUR deskundigen (deelnemers: zie lijst met auteurs). Spoedig daarna zijn deze werksessies uitgebreid door deelname van vertegenwoordigers vanuit de bedrijfsleven partners die betrokken zijn bij het VDI programma binnen F4F (deelnemers: zie lijst met auteurs). Dit heeft uiteindelijk geleid tot een roseplot voor weergave van gemeten responsen op immuuncompetentie parameters per (voedings)interventie bij de verschillende diersoorten.

In het hier gepresenteerde concept voor de meetlat worden de effecten van (voedings)interventies met een verondersteld relatie met immuuncompetentie vergeleken met de controlegroep. Daarnaast is geprobeerd de (voedings)interventies in te delen naar interventies met een verondersteld positief effect en interventies met een verondersteld negatief effect. Dit onderscheid bleek lastig, mede omdat effecten van interventies op zootecnische resultaten en immuuncompetentie tegengesteld kunnen zijn.

In eerste instantie is in de verschillende experimenten alleen gekeken naar effecten van de (voedings)interventie op de gemeten parameters. Het bleek lastig om dergelijke data en gemeten effecten adequaat biologisch te interpreteren (Tabel 1, studies 1 en 2). In latere studies is daarom besloten om de interventies ook gecombineerd met een immuun challenge te evalueren (studies 3, 4 en 8). Door het dier immunologisch onder druk te zetten door een infectieuze challenge of een challenge via de samenstelling van de voeding, kon beter bestudeerd worden of de voedingsinterventie het vermogen van een dier op dat specifieke moment in zijn ontwikkeling om adequaat op een challenge te reageren, heeft veranderd. Hierdoor is het makkelijker om te beoordelen of een voedingsinterventie een



positief of een negatief effect heeft, en wordt het mogelijk om de gemeten parameters te correleren aan een fenotype dat gelinkt is aan de responsen van het immuunsysteem. Er zijn verschillende immuun challenges toegepast zoals een systemische lipopolysaccharide challenge, een voedingschallenge en verschillende infectieuze challenges. Het proces van de ontwikkeling van de meetlat staat schematisch weergegeven in Figuur 3.

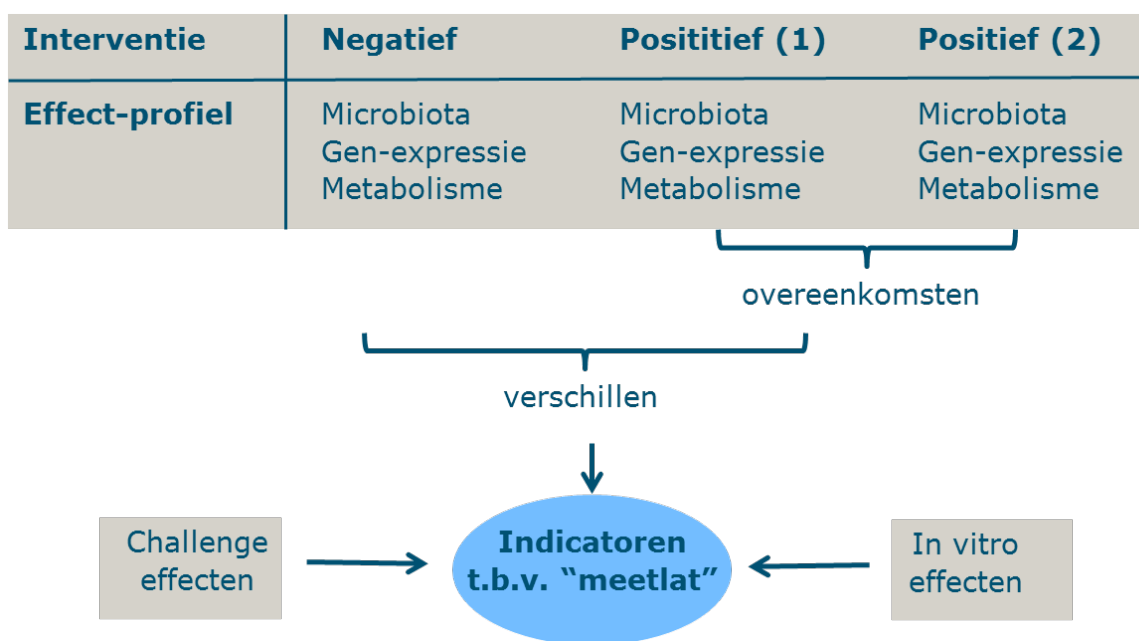
**Tabel 1A** Dierexperimenten uitgevoerd binnen VDI.

Experiment	Diersoort	Toediening	Levensfase	VDI-WP*	Interventie	Referentie
1	Varken	Postnataal (big)	Neonataal	3	FOS	[13]
2	Varken	Maternaal (zeug)	Neonataal	2	Amoxicilline	[14]
3	Varken	Post-weaning (big)	Adult	3 / 13	Zink	[15] / [16]
4	Varken	Maternaal (zeug)	Neonataal	12	MCFA	[17]
					Betaglucanen	
					GOS	
5	Vleeskuiken	Post-hatch	Neonataal	3	Amoxicilline	[18]
6	Vleeskuiken	Kuiken	Adult	5	Rogge	[19]
7	Vleeskuiken	Kuiken	Adult	11	Betaglucanen	[20]
					Visolie	
					Lysozym	
					Haverdoppen	
					Quercitine	
8	Vleeskuiken	Post-hatch	Neonataal	11	Antibiotica	[21]
					Betaglucanen	
					Butyraat	
					Rogge	
9	Kalf	Kalf	Neonataal	13	Planteiwit melk vervanger	[22]

\* VDI-WP; Voeding, darmgezondheid en immuniteit werk pakket

**Tabel 1B** Gemeten parameters per dierexperiment. De experiment nummers verwijzen naar de nummering uit Tabel 1A.

Parameter	Experiment								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Microbiota	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Genexpressie	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Morfologie	x	x				x	x	x	
Immuuncellen - Mucosaal	x			x	x				
Systemische immunologie		x							x
Immunologie – Long									x
Haematologie									x
Immuun challenge			x	x				x	



**Figuur 3** Route naar een meetlat voor immuuncompetentie. In dierexperimenten in vleeskuikens, varkens en kalveren werden effecten van (voedings)interventies op parameters die betrokken zijn bij immuuncompetentie vergeleken met die van een controlegroep. Waar mogelijk werd onderscheid gemaakt tussen (voedings)interventies met een verondersteld positief effect en die met een negatief effect. Dit onderscheid werd mede bepaald door de gemeten respons van dieren in studies na een immuun challenge. Vervolgens werden de waarden voor de gemeten parameters gecorreleerd aan de gemeten responsen na de challenge als basis voor identificatie van indicatoren voor de meetlat voor immuuncompetentie.

---

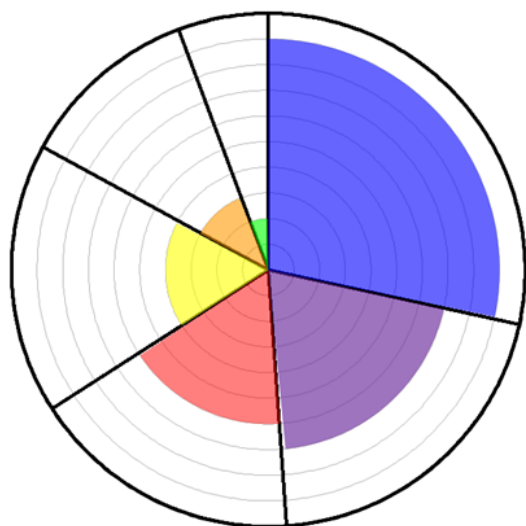
## 3 Beschrijving van het proces

### 3.1 Lokalisatie immunocompetentie parameters

De mucosa van het maag-darmkanaal herbergt ongeveer 70% van alle immuun cellen [23]. Op het grensvlak van mucosa en darmlumen vindt de interactie plaats tussen gastheer cellen met voedingscomponenten en darm-microbiota. Door deze interactie vindt de ontwikkeling plaats van de (mucosale) immuniteit, met name gedurende de vroege levensfasen van het dier. Daarom is ervoor gekozen om voor de meetlat te focussen op parameters die de interactie tussen darm-microbiota met de darmmucosa beschrijven. Dit heeft tot gevolg dat deze meetlat in eerste instantie alleen gebruikt kan worden indien monsters van zowel darmweefsel als darminhoud (digesta) beschikbaar zijn, welke worden verkregen via invasieve bemonstering.

### 3.2 Concept van roseplots

Roseplots kunnen worden toegepast om verschillende soorten complexe data in één figuur samen te brengen. Indien de verschillende soorten data gezamenlijk bijdragen aan een kenmerk of eigenschap, dan ontstaat een figuur die een kwantitatieve indruk geeft van verschillen in meerdere eigenschappen of kenmerken die veranderen als gevolg van een (voedings)interventie. Het is een flexibel concept dat naar behoefte kan worden aangepast. Verschillende data (sub)categorieën kunnen gerepresenteerd worden op de segmenten. Hoe meer belangrijk de categorie (weegfactor), des te groter het segment op de cirkel wordt. De waarde van elke categorie (score) kan worden weergegeven door een deel van elk segment vanuit het midden in te kleuren, bijvoorbeeld van 0-100% of van 0-10. Op deze manier ontstaat een figuur die gemakkelijk een kwantitatieve indruk geeft van gemeten effecten of van complexe eigenschappen en kenmerken.



**Figuur 4** Voorbeeld van een roseplot. Iedere kleur representeert de grootte van het gemeten effect op een bepaalde parameter van de (voedings)interventie. De grootte van het vlak geeft aan hoe belangrijk deze parameters is voor immunocompetentie. Iedere parameter kan een waarde van 0 tot 10 krijgen. Een parameter kan onderverdeeld worden in verschillende subcategorieën.

---

In de werksessies is eerst een aantal opeenvolgende stappen doorlopen:

1. Potentiële parameters voor immunocompetentie zijn benoemd. Voorwaarden voor de parameters zijn dat ze (a) meetbaar zijn; (b) kwantificeerbaar zijn en (c) verband houden met immunocompetentie
2. Per studie zijn roseplots in concept uitgewerkt.
3. Stap 1 en 2 zijn in verschillende rondes verfijnd.
4. Per parameter zijn wegingsfactoren bepaald die het geschatte relatieve belang van de betreffende parameter voor immunocompetentie aangeeft.
5. Er is per parameter een (reken)methode ontwikkeld om de score uit te kunnen drukken op een schaal van 0-10 (of 0-100%).
6. Roseplots zijn over experimenten heen met elkaar vergeleken om te trachten tot meer generieke conclusies ten aanzien van het concept van beïnvloeding van immunocompetentie te komen.

## 3.3 Selectie van parameters en hun wegingsfactoren

### 3.3.1 Selectiecriteria

De parameters die in aanmerking komen voor de meetlat zijn geïdentificeerd aan de hand van de volgende criteria:

- Parameters zijn geassocieerd zijn met systemische of mucosale immunocompetentie
  - Parameters zijn geassocieerd met darmsysteem óf
  - Parameters zijn geassocieerd met het immuunsysteem óf
  - Parameters zijn geassocieerd met darm-microbiota óf
  - Parameters zijn geassocieerd met de interactie tussen bovenstaande componenten
- Parameters zijn volgens de literatuur te beïnvloeden met voer(componenten)
- Parameters kunnen gemeten worden aan het dier;

Op basis van de resultaten van studies uitgevoerd binnen het VDI programma in de afgelopen 4 jaar en de (literatuur) kennis van de experts is het consortium tot een 'well-educated guess' gekomen van specifieke parameters die voldoen aan bovenstaande criteria.

### 3.3.2 Categorieën en weegfactoren

Doordat sommige specifieke parameters zeer nauw met elkaar samenhangen, is ervoor gekozen om parameters te clusteren om zo het aantal kenmerken binnen de roseplot te beperken. Dit heeft ertoe geleid dat parameters zijn ingedeeld in categorieën. Vervolgens is de relevantie voor immunocompetentie per parameter bediscussieerd om te komen tot een weegfactor. Deze weegfactor is bepaald door experts die de onderlinge parameters hebben geprioriteerd. Hoe hoger de prioriteit voor immunocompetentie hoe groter de weegfactor (1-5). In enkele gevallen was er geen consensus over de hoogte van de weegfactor voor een bepaalde parameter en werd een range voor de waarde hiervan vastgesteld. Uiteindelijk bleek dat het voor de roseplot noodzakelijk was om toch een vaste weegfactor vast te stellen. Dit wordt de "fixed weegfactor", waarbij de bediscussieerde range van de weegfactor wel nog steeds wordt weergegeven. Wanneer door veranderende inzichten de weegfactor moet worden bijgesteld, kan deze in het model gemakkelijk aangepast worden. De geclusterde specifieke parameters binnen een categorie hebben een weegfactor die de gemiddelde is van de individuele weegfactoren van de specifieke parameters. Deze weegfactoren per categorie bepalen de grootte van de categorie op de roseplot. De totale roseplot is 100%, iedere categorie krijgt een 'taartpunt' waarvan de grootte wordt bepaald door de weegfactor van de categorie. De percentages die iedere categorie krijgt, staan weergegeven in Tabel 2.

### 3.3.3 Geselecteerde parameters

De geselecteerde parameters ingedeeld naar categorieën met de bijbehorende weegfactor, de fixed weegfactor, en de gemiddelde weegfactor per categorie staan weergegeven in Tabel 2. De achtergrond van de parameters wordt hieronder toegelicht:

- **SPECpw:** Specifieke pathways afgeleid van genexpressie data. Met behulp van microarrays wordt bepaald welke genen in darmweefsel verschillend tot expressie komen tussen controle

---

dieren en dieren die een (voedings)interventie ontvangen (n = 22,000 genen). Deze genen die differentieel tot expressie komen, zijn ingedeeld naar specifieke pathways die een bepaalde biologische functie hebben. Op deze wijze zijn pathways geïdentificeerd die differentieel tot expressie komen en in de dieren die de (voedings)interventie ontvangen ten opzichte van de controlebehandeling een afwijkend biologisch proces induceren. In de parameter SPECpw worden pathways meegenomen die differentieel tot expressie komen, maar niet immuun gerelateerd zijn.

- **MORF**: Morfologie darmmucosa. Deze parameter wordt bepaald door kenmerken van de darmmucosa kwantitatief aan histologische coupes te bepalen. In dit project zijn in verschillende studies de volgende kenmerken bepaald:
  - Proliferatie van epitheelcellen
  - Hoogte van de villi / diepte van de crypten / ratio villus: crypt
  - Mucus-productie
- **MICROB**: Microbiota. De microbiota is bestudeerd door DNA uit bacteriële populaties uit het darmkanaal, de feces of vagina te isoleren. Vervolgens is door middel van 16S rDNA sequenzen de microbiële populatie onderzocht. Uit deze data is met behulp van bioinformatica tools een aantal parameters samengesteld:
  - Microbiota diversiteit: dit geeft een indruk van de hoeveelheid soorten bacteriën en de dominantie van soorten bacteriën in de populatie. Hoe groter de diversiteit, hoe meer soorten en hoe minder dominantie er in de populatie zit.
  - Microbiota samenstelling: dit geeft aan welke soorten bacteriën er in de populatie aanwezig zijn. Dit kan op verschillende niveaus bestudeerd worden (b.v. phylum, genera)
  - Microbiota ratio: Als er in de literatuur bekend is dat bepaalde soorten bacteriën een grote impact hebben op biologische processen in de darm, kan een ratio van deze soorten een veelbetekenende parameter zijn. Hiervoor is voorkennis uit de literatuur noodzakelijk om vast te stellen voor welke bacteriën een bepaalde ratio belangrijk is.
  - Microbiota metaboliëten: De metaboliëten die geproduceerd worden door de microbiota, kunnen apart gemeten en gekwantificeerd worden en geven extra informatie over de metabole activiteit van de aanwezige soorten bacteriën.
  - Microbiota, aantal soorten: Deze parameter kijkt alleen naar het aantal aanwezige soorten bacteriën.
- **IMMUNEpw**: Immune pathways: Pathways geïdentificeerd die differentieel tot expressie komen ten gevolg van de (voedings)interventie. In de parameter IMMUNEpw worden pathways meegenomen die differentieel tot expressie komen en volgens de informatie in de biologische databases hiërarchisch immuun gerelateerd zijn.
- **FuncImm**: Functionele immunologische parameter. Dit zijn parameters die direct betrekking hebben op immunologische functies van de gastheer. Functionele immunologische parameters kunnen zowel lokaal in de darm (mucosaal) als in het bloed (systemisch) worden gemeten. Binnen deze studie zijn de volgende parameters meegenomen:
  - Cellen, aantal immuun cellen systemisch: Hierbij wordt een specifieke categorie immuuncellen (bijv. B- of T-cellen) gedetecteerd en gekwantificeerd in het bloed.
  - Cellen, aantal immuun cellen darm: Hierbij wordt een specifieke categorie immuuncellen (bijv. B- of T-cellen) gedetecteerd en gekwantificeerd in darmweefsel.
  - Systemische immuunparameters NABs: Hierbij wordt het aantal aanwezige natuurlijk antilichamen (NABs) bepaald in het bloed.
  - Systemische immuunparameters cytokine profiel: Hierbij wordt het expressieniveau van één of meer immuungerelateerde genen (bijv. cytokinen, chemokinen) gericht bepaald door middel van genexpressie of eiwitexpressie bepalingen in bloed.
  - APPs: Acute Phase Proteins in het bloed
  - sIgA: Hierbij wordt het niveau van de uitgescheiden vorm van immunoglobuline A (sIgA) bepaald in de darm.
- **DEG**: Differentieel tot expressie gebrachte genen in darmweefsel. Het aantal genen die niet tot een specifieke pathway behoren, maar wel sterk differentieel tot expressie komen, worden geteld en in deze parameter ondergebracht.

**Tabel 2** Geselecteerde parameters, ingedeeld naar categorieën, en hun weegfactoren opgenomen in de immuuncompetentie meetlat.

Categorie*	Parameter	Weegfactor <sup>1</sup>	Fixed Weegfactor <sup>2</sup>	Weegfactor categorie <sup>3</sup>
<b>SPECpw</b>	Specifieke pathways (processen, niet immuun)	(2-4) <sup>4</sup>	2	<b>2 (11%)</b>
<b>MORF</b>	Cel-proliferatie processen	3	3	<b>3 (17%)</b>
<b>MORF</b>	Darm morfologie	3	3	
<b>MORF</b>	Mucus	3	3	
<b>MICRB</b>	Microbiota diversiteit	4	4	<b>3.6 (21%)</b>
<b>MICRB</b>	Microbiota samenstelling	(2-4) <sup>4</sup>	4	
<b>MICRB</b>	Microbiota ratio	(2-4) <sup>4</sup>	4	
<b>MICRB</b>	Microbiota metabolieten	4	4	
<b>MICRB</b>	Microbiota aantal soorten	2	2	
<b>IMMUNEpw</b>	Immune pathways (processen)	5	5	<b>5 (28%)</b>
<b>FuncImm</b>	Cellen, aantal immuun cellen periferie immuun cellen periferie	4	4	<b>3 (17%)</b>
<b>FuncImm</b>	Cellen, aantal immuun cellen darm	5	5	
<b>FuncImm</b>	Systemische immuun parameters NABs	2	2	
<b>FuncImm</b>	Systemische immuun parameters cytokine profiel	3	3	
<b>FuncImm</b>	Systemische immuun parameters APPs	1	1	
<b>FuncImm</b>	slgA	3	3	
<b>DEG</b>	"Losse" (immuun)genen	(1-3) <sup>4</sup>	1	<b>1 (6%)</b>

\* SPECpw is specifieke pathways, MORF is morfologie, MICRB is microbiota, IMMUNEpw is immuun pathways, FuncImm is functionele immunologie, DEG is "differential expressed genes".

<sup>1</sup> De weegfactor geeft het belang van de parameter voor immuuncompetentie aan gebaseerd op de literatuur en de inschatting van de consortium leden, de waarde loopt van 1 t/m 5.

<sup>2</sup> Voor weergave in de roseplot moet de weegfactor een vaste waarde krijgen en kan geen range waarde hebben, de waarde loopt van 1 t/m 5.

<sup>3</sup> De weegfactor van de categorie wordt bepaald door het gemiddelde van de weegfactoren van de parameters waaruit de categorie bestaat, de waarde loopt van 1 t/m 5.

<sup>4</sup> Voor deze parameters is de weegfactor als range uitgedrukt.

**NAb:** natural antibodies; **APP:** acute phase proteins, **slgA:** Secreted Immunoglobulin A

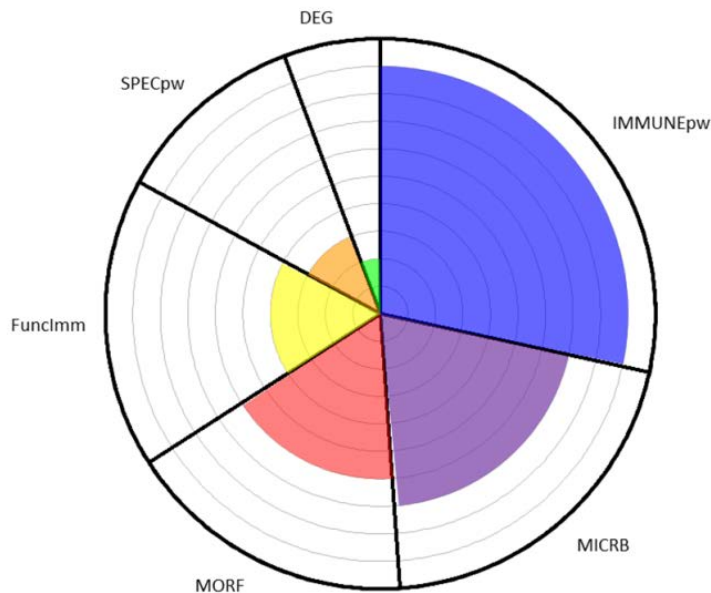
### 3.4 Kwantificeren van parameters

Na de voorgaande stappen is de roseplot ingedeeld in verschillende categorieën die ieder staan weergegeven in een "taartpunt" die representatief is voor het belang van de categorie voor immuuncompetentie. Sommige categorieën zijn opgebouwd uit verschillende parameters. Om de roseplot verder in te vullen, moeten alle parameters een waarde krijgen die uitgezet kan worden op een schaal die van 0 – 10 loopt. Voor sommige parameters is dit eenvoudig te realiseren, terwijl voor andere parameters complexe transformaties nodig zijn om tot een schaal van 0 – 10 te komen. In de loop van de ontwikkeling zijn verschillende transformatie methoden gebruikt. Deze worden hier niet allemaal individueel besproken. De uiteindelijke methodiek om effecten van voerinterventies in de immuuncompetentie roseplot weer te geven wordt verderop besproken.

## 3.5 Uitwerken roseplot concept

### 3.5.1 Roseplot op basis van beschikbare datasets

Op basis van bovengenoemde criteria en overwegingen is met behulp van gesimuleerde datasets een eerste versie van de roseplot geconstrueerd (Figuur 5). Hieruit bleek dat het roseplot concept geschikt is meervoudige effecten op een overzichtelijke manier weer te geven. Vervolgens zijn voor individuele studies van het VDI programma roseplots geconstrueerd. Een overzicht van deze studies en enkele karakteristieken ervan staan in Tabel 3. De genoemde roseplots van alle studies zijn weergegeven in Appendix 2.



**Figuur 5** Eerste versie van het roseplot concept voor weergave effecten van een voedingsinterventie op immuuncompetentie gerelateerde parameters op basis van een gesimuleerde dataset. SPECpw: Specifieke pathways (11%); MORF: Morfologie mucosa (17%). MICROB: Microbiota (21%); IMMUNEpw: Immune pathways (28%); FuncImm: Functionele immunologische parameter (17%). DEG: Differentieel tot expressie gebrachte genen (6%).

**Tabel 3** Overzicht van de beschikbare datasets binnen VDI: diersoort, levensfase waarop interventie is toegediend, VDI werk pakket (WP), leeftijd (dagen) van monsternamen en darmsegment.

Nummer	Diersoort	Levensfase	VDI-WP	Interventie	Leeftijd (dagen)	Darmsegment
1	Varken	Neonataal	3	FOS	14, 25 14	Jejunum Colon
2	Varken	Neonataal	2	Amoxicilline	1, 7, 26, 30, 54	Jejunum
3	Varken	Adult	3 / 13	Zink (verschillende concentraties)	42, 51, 63 42, 51, 63	Jejunum Ileum
	Varken	Neonataal		12	MCFA	31
4a				Betaglucanen	31	Ileum
				GOS	31	Colon
				MCFA	1, 31	Jejunum
4b	Varken	Maternaal	12	Betaglucanen	1, 31	Ileum
				GOS	1, 31	Colon
5	Vleeskuiken	Neonataal	3	Amoxicilline	5, 14	Jejunum
6	Vleeskuiken	Adult	5	Rogge	21, 28	Ileum
	Vleeskuiken	Adult	11	Betaglucanen	21 21	Jejunum Ileum
7				Visolie	21 21	Jejunum Ileum
				Lysozym	21 21	Jejunum Ileum
				Haverdoppen	21 21	Jejunum Ileum
				Quercitine	21 21	Jejunum Ileum
8	Vleeskuiken	Neonataal		Antibiotica	7	Jejunum
				Betaglucanen	7	Jejunum
				Butyraat	7	Jejunum
				Rogge	7	Jejunum
9	Kalf	Neonataal	13	Plantaardig eiwit melk vervanger	14 14	Jejunum Long

### 3.5.2 Problemen bij de implementatie van de roseplot

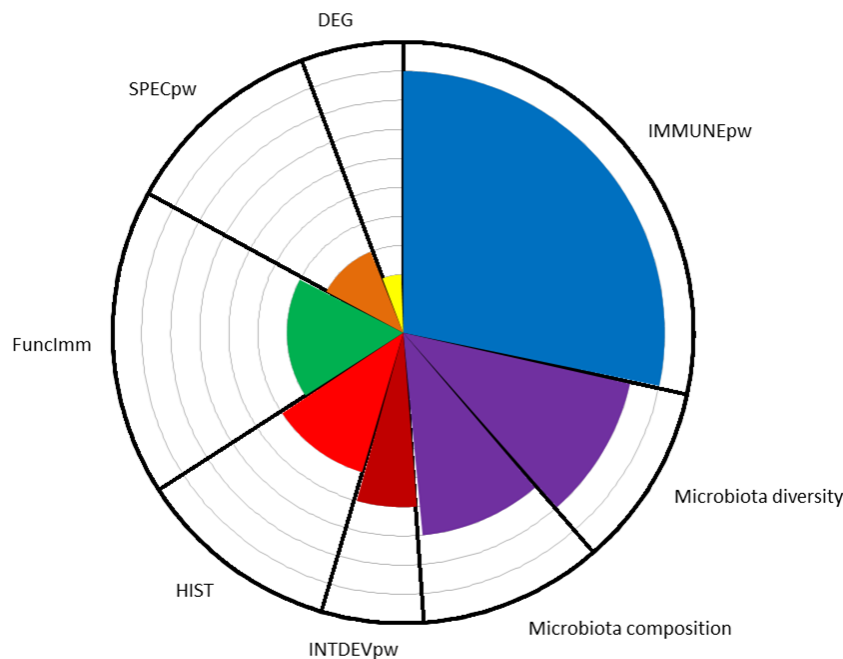
Bij gebruik van de beschikbare datasets uit het VDI programma voor weergave in het roseplot concept werden ook enkele parameters geïdentificeerd waarvan opname in het concept in eerste instantie lastig was. Onderstaand is beschreven op welke wijze hiermee werd omgegaan.

#### 3.5.2.1 Combineren van verschillende parameters tot één kwantitatieve maat

Responsen voor sommige meetlat parameters zijn in de studies vastgesteld met behulp van verschillende meettechnieken. Deze meettechnieken leveren verschillende soorten kwantitatieve data met verschillende grootheden en eenheden. Dit maakt het moeilijk om deze parameters op een goede manier weer te geven in één getal dat representatief is voor de respons op onderliggende gemeten parameters. Hierdoor was het aanvankelijk niet mogelijk om voor bepaalde categorieën een score te berekenen. Een voorbeeld van dit probleem is de categorie "darm morfologie (MORF)". Deze categorie wordt zowel op gen expressie data als op histologische data gebaseerd. Een andere categorie die uit verschillende parameters bestaat is "Microbiota". Deze categorie omvatte niet alleen de diversiteit van de microbiota, maar ook de samenstelling ervan.



Om deze beperkingen op te heffen zijn bepaalde categorieën opgesplitst in subcategorieën. De categorie "Microbiota" is bijvoorbeeld opgesplitst in "Microbiota diversiteit" en "Microbiota samenstelling" (Figuur 6).



**Figuur 6** Roseplot met weergave effecten van een voedingsinterventie op immuun competentie parameters met subcategorieën.

### 3.5.2.2 Missende categorieën binnen datasets

Binnen de verschillende datasets van de VDI studies zijn verschillende aan immuun competentie gerelateerde parameters geselecteerd. Deze parameters waren niet voor alle experimenten identiek. Binnen alle uitgevoerde dierexperimenten zijn wel microbiota samenstelling van darminhoud en genexpressie profielen van de darm(mucosa) bepaald. De overige parameters zijn bepaald op basis van veronderstelde effecten van de specifieke voedingsinterventies die zijn geëvalueerd. Dit betekent dat voor individuele studies bepaalde categorieën metingen/parameters in de roseplot van de betreffende studie ontbreken. In de roseplot kon aanvankelijk geen onderscheid gemaakt worden tussen missende data, en data die geen verschil lieten zien tussen de interventie- en controlegroep.

Dit probleem is opgelost in een aangepaste versie van de roseplot. Indien er geen data voor een categorie beschikbaar waren, is deze categorie in de roseplot als een wit vlak zonder arcering ingevuld. Wanneer er wel data voor een categorie beschikbaar waren, maar er geen effect van de interventie was gevonden, zijn de bogen die de score weergeven zichtbaar in een "leeg" segment.

### 3.5.3 Verfijning van de opzet van de roseplot

Bij de verdere uitwerking van het immuuncompetentie concept in de vorm van weergave in roseplots bleken sommige aanvankelijk geselecteerde parameters niet eenvoudig toepasbaar. Om dit te verbeteren en om tot een meer duidelijke interpretatie van data te kunnen komen, is een aantal verfijningen doorgevoerd. Een aantal voorbeelden wordt hieronder in meer detail beschreven:

#### 3.5.3.1 Reductie van het aantal gebruikte pathways

De parameters die betrekking hebben op biologische pathways die differentieel tot expressie komen, worden afgeleid van genexpressie data van dunne darmweefsel. Met behulp van microarrays wordt bepaald welke genen ( $n = 22.000$  genen) verschillend tot expressie komen tussen controle dieren en dieren die een (voedings)interventie ontvangen. Binnen dit project wordt voor genen die differentieel tot expressie komen een cutoff gebruikt: het verschil in expressie tussen de groep die de (voedings)interventie ontvangt en de controlegroep moet minimaal een factor 1,5 zijn met een betrouwbaarheid van  $p \leq 0,05$ . Het aantal genen dat in de verschillende experimenten op de

verschillende tijdstippen in de verschillende weefsels met deze criteria differentieel tot expressie komen, staat weergegeven in Tabel 4. Deze genen worden ingedeeld naar specifieke pathways die een bepaalde biologische functie hebben. Op deze wijze worden pathways geïdentificeerd die differentieel tot expressie komen ten gevolge van de (voedings)interventie. Voor deze pathway analyse wordt gebruik gemaakt van de Reactome database [24-27]. Deze database bevat informatie over 1.600 verschillende biologische pathways op celniveau. Voor dit project zijn alleen pathways met informatie over minimaal 5 onderdelen van de betreffende pathways (zogenaamde nodes, genen of genproducten) meegenomen. Dit zijn in totaal 1.257 pathways onderverdeeld in 105 immuun gerelateerde pathways, 256 pathways gerelateerd aan de ontwikkeling van de darm en 896 overige pathways. Deze verfijningsstap is gedaan om alleen relevante en significante pathways op te nemen in de analyse, d.w.z. pathways die een relatie hebben met voeding, darmgezondheid en immuniteit.

**Tabel 4** Aantal differentieel tot expressie gebrachte genen (interventie vs. controle) per dierstudie die zijn gebruikt als input voor de pathway analyse ( $P_{adj} < 0,05$  en  $Fold\ Change > |1,5|$ ).

@	DataSets*	#	@	DataSets*	#
1	jej25FOS	0	5	AmoxVDI3Jej14	131
1	jej14FOS	5	5	AmoxVDI3Jej5	293
1	col14FOS	0	6	Ryed21_10vs0	1.190
2	amoxPigs 1	156	6	Ryed21_10vs5	52
2	amoxPigs 7	0	6	Ryed21_5vs0	1.547
2	amoxPigs W	588	6	Ryed28_10vs0	903
2	amoxPigs W+4	395	6	Ryed28_10vs5	629
2	amoxPigs W+28	145	6	Ryed28_5vs0	100
3	ZincIle23	8	7	VDI5.2_O_ile	0
3	ZincJej23	5	7	VDI5.2_F_ile	0
3	ZincIle35	0	7	VDI5.2_L_ile	0
3	ZincJej35	0	7	VDI5.2_O_ile	0
3	ile14H14L	21	7	VDI5.2_BG.ile	0
3	ile23HH23LL	2	7	VDI5.2_O_jej	0
3	ile23LH23LL	0	7	VDI5.2_F_jej	0
3	ile23HL23LL	0	7	VDI5.2_L_jej	0
3	ile23HH23LH	0	7	VDI5.2_O_jej	0
3	ile23HH23HL	0	7	VDI5.2_BG_jej	0
3	ile23LH23HL	0	8	ANT-CON	542
3	jej14H14L	84	8	BG-CON	0
3	jej23HH23LL	3	8	BUTY-CON	0
3	jej23LH23LL	0	8	RYE-CON	0
3	jej23HL23LL	0			
3	jej23HH23LH	0	9	lung.1-lung.2	238
3	jej23HH23HL	2	9	jejunum.1-jejunum.2	0
3	jej23LH23HL	1			
4a	VDI12_d1.GOS.mat	2.721			
4a	VDI12_d1.BG.mat	0			
4a	VDI12_d1.MCFA.mat	3			
4a	VDI12_d31.GOS.mat	878			
4a	VDI12_d31.BG.mat	302			
4a	VDI12_d31.MCFA.mat	203			
4b	VDI12_d31.GOS.neo	42			
4b	VDI12_d31.BG.neo	0			
4b	VDI12_d31.MCFA.neo	293			

@ Nummer van dierstudie zoals gebruikt in tabel 3

\* Een beschrijving van de gebruikte afkortingen voor de diverse datasets is weergegeven in Appendix 1.

### 3.5.3.2 Classificeren van differentieel tot expressie gebrachte genen die niet tot een pathway behoren

De categorie 'DEG' geeft aan hoeveel genen er differentieel tot expressie komen zonder tot een specifieke pathway te behoren. De genen die niet tot een specifieke pathway behoren, maar wel sterk differentieel tot expressie komen, worden geteld en in deze parameter ondergebracht. Binnen dit project is voor deze genen een cutoff gebruikt: het verschil in expressie tussen de groep die de (voedings)interventie ontvangt en de controlegroep moet minimaal een factor 5 zijn met een betrouwbaarheid van  $p \leq 0,05$ .

Er is onderzocht of er binnen deze algemene categorie onderscheid gemaakt kan worden tussen genen die wel en genen die niet samenhangen met immunocompetentie. Genen die differentieel tot expressie komen, niet tot een pathway behoren, maar wel betrokken zijn bij immunocompetentie krijgen meer gewicht dan genen die niet zijn betrokken bij immunocompetentie. In beschikbare databases zijn bekende genen gekoppeld aan beschrijvingen ten aanzien van hun functie. Dit kunnen teksten zijn, maar ook korte termen die gebruikt worden om de functie van het gen aan te duiden. Door in deze teksten te zoeken naar termen die gerelateerd zijn aan immunocompetentie is deze categorie in het immunocompetentie concept verder verfijnd. De zoektermen die gebruikt zijn om genen te linken aan immunocompetentie staan weergegeven in Tabel 5.

**Tabel 5** *Immuun gerelateerde termen gebruikt om individuele genen, die niet tot een specifieke biologische pathway konden worden gerekend, al dan niet te koppelen aan immunocompetentie (alfabetische volgorde).*

Adherens	Apoptosis	Cytokine	Leukotriene
Angiogenesis	B cell	Dendritic cell	M cell(s)
Antibacterial	Barrier function	Dendritic cells	Macrophage
Antibiotic	Cell differentiation	Digestive enzyme	Mucus
Antibody	Cellcell proliferation	ECM	Oxidative stress
Antigen presentation	Chemokine	Focal adhesion	T cell
AntioxidantOxidative stress	Chemotaxis	Hormone	Tight junction
Antiviral	Complement	Intestine	Vascular tone

Met behulp van het een programma ("VarElect" NGS Phenotyper - LifeMap Sciences, Inc.) zijn 10.375 genen gescreend op een associatie met de termen uit Tabel 5. Het programma geeft twee soorten associaties met de zoektermen: directe associaties of indirecte associaties. De indirecte associaties lopen bijvoorbeeld via een verwant gen. Voor de analyse binnen dit project zijn alleen de directe associaties meegenomen. Een overzicht van de indeling van de genen die differentieel tot expressie komen in de verschillende categorieën staat weergegeven in Tabel 6.

**Tabel 6** Indeling van genen die differentieel tot expressie kwamen in de verschillende studies maar niet tot een specifieke biologische pathway konden worden toegekend.

@	DataSets	Totaal aantal differentieel tot expressie gebrachte genen FC $\geq$ 5	Totaal aantal differentieel tot expressie gebrachte genen FC $\geq$ 5	
			(directe) Associatie met immuuncompetentie	Overige
1	jej25FOS	0	0	0
1	Jej14FOS	0	0	0
1	col14FOS	0	0	0
2	amoxPigs 1 jej	17	3	14
2	amoxPigs 7 jej	0	0	0
2	amoxPigs W jej	27	4	23
2	amoxPigs W+4 jej	15	5	10
2	amoxPigs W+28 jej	49	12	37
3	ZincIle23	4	1	3
3	ZincJej23	4	1	3
3	ZincIle35	0	0	0
3	ZincJej35	0	0	0
3	ile14H14L	9	2	7
3	ile23HH23LL	2	0	2
3	ile23LH23LL	0	0	0
3	ile23HL23LL	0	0	0
3	ile23HH23LH	0	0	0
3	ile23HH23HL	0	0	0
3	ile23LH23HL	0	0	0
3	jej14H14L	7	2	5
3	jej23HH23LL	2	0	2
3	jej23LH23LL	0	0	0
3	jej23HL23LL	0	0	0
3	jej23HH23LH	0	0	0
3	jej23HH23HL	0	0	0
3	jej23LH23HL	0	0	0
4a	VDI12_d1.GOS.mat col	590	150	440
4a	VDI12_d1.BG.mat ile	0	0	0
4a	VDI12_d1.MCFA.mat jej	1	0	1
4a	VDI12_d31.GOS.mat col	24	4	20
4a	VDI12_d31.BG.mat ile	10	1	9
4a	VDI12_d31.MCFA.mat jej	73	15	58
4b	VDI12_d31.GOS.neo col	5	0	5
4b	VDI12_d31.BG.neo ile	0	0	0
4b	VDI12_d31.MCFA.neo jej	65	15	50
5	AmoxVDI3Jej14	0	0	0
5	AmoxVDI3Jej5	1	0	1
6	Ryed21_10vs0 jej	18	2	16
6	Ryed21_10vs5 jej	8	0	8
6	Ryed21_5vs0 jej	16	1	15
6	Ryed28_10vs0 jej	8	0	8
6	Ryed28_10vs5 jej	10	0	10
6	Ryed28_5vs0 jej	1	0	1
7	VDI5.2_O_ile	0	0	0
7	VDI5.2_F_ile	0	0	0
7	VDI5.2_L_ile	0	0	0
7	VDI5.2_Q_ile	0	0	0
7	VDI5.2_BG.ile	0	0	0
7	VDI5.2_O_jej	0	0	0
7	VDI5.2_F_jej	0	0	0
7	VDI5.2_L_jej	0	0	0
7	VDI5.2_Q_jej	0	0	0
7	VDI5.2_BG_jej	0	0	0
8	ANT-CON jej	9	1	8
8	BG-CON jej	0	0	0
8	BUTY-CON jej	0	0	0
8	RYE-CON jej	0	0	0
9	lung.1-lung.2	0	0	0
9	jejnum.1-jejnum.2	2	0	2

### 3.5.3.3 Microbiota analyse methodiek.

Voor de analyse van de Microbiota diversiteit zijn verschillende systematieken en methoden beschreven in de literatuur. Om alle datasets binnen VDI te kunnen analyseren moeten alle datasets op dezelfde uniforme manier geanalyseerd worden. Op basis van expertise en literatuur is een aantal keuzes gemaakt. Voor de roseplot wordt de vaak gebruikte Shannon index gebruikt met een p-waarde lager dan 0,05. Voor de microbiota samenstelling wordt gebruik gemaakt van de Wilcoxon rank sum test, waarbij de Average Relative Contribution hoger is dan 0,01% en een p-waarde lager dan 0,05. Dat betekent dat de relatieve bijdrage van een microbieel species/genus moet minimaal 0,01% van het totaal zijn en het verschil tussen controle en experimentele groep moet significant zijn met een p-waarde < 0,05. Op basis van deze keuzes, is vervolgens voor alle datasets geanalyseerd voor hoeveel species of genera de (voedings)interventie per tijdstip, per darmdeel een significant verschil oplevert. De resultaten van deze analyse staat weergegeven in Tabel 7.

**Tabel 7** Aantal microbiële genera in de dunne darm die significant verschillen tussen controle en experimentele groepen in de verschillende studies.

@	DataSets	#	@	DataSets	#
1	jej25FOS	1	5	AmoxVDI3Jej14	9
1	jej14FOS	7	5	AmoxVDI3Jej5	12
1	col14FOS	57	6	Ryed21_10vs0	1
2	amoxPigs 1	5	6	Ryed21_10vs5	3
2	amoxPigs 7	9	6	Ryed21_5vs0	7
2	amoxPigs W	1	6	Ryed28_10vs0	4
2	amoxPigs W+4	25	6	Ryed28_10vs5	4
2	amoxPigs W+28	4	6	Ryed28_5vs0	4
3	ZincIle23	6	7	VDI5.2_L_jej	0
3	ZincJej23	1	7	VDI5.2_Q_jej	0
3	ZincIle35	23	7	VDI5.2_BG_jej	0
3	ZincJej35	40	7	VDI5.2_O_jej	0
3	ile14H14L	0	7	VDI5.2_FO_jej	0
3	ile23HH23LL	0	7	VDI5.2_L_il	0
3	ile23LH23LL	0	7	VDI5.2_Q_il	0
3	ile23HL23LL	0	7	VDI5.2_BG_il	0
3	ile23HH23LH	0	7	VDI5.2_O_il	0
3	ile23HH23HL	0	7	VDI5.2_FO_il	0
3	ile23LH23HL	0	8	ANT-CON	18
3	jej14H14L	0	8	BG-CON	2
3	jej23HH23LL	0	8	BUTY-CON	4
3	jej23LH23LL	0	8	RYE-CON	19
3	jej23HL23LL	0			
3	jej23HH23LH	0	9	lung.1-lung.2	NA
3	jej23HH23HL	0	9	jejunum.1-jejunum.2	18
3	jej23LH23HL	0			
4a	VDI12_d1.GOS.mat	8			
4a	VDI12_d1.BG.mat	7			
4a	VDI12_d1.MCFA.mat	54			
4a	VDI12_d31.GOS.mat	0			
4a	VDI12_d31.BG.mat	9			
4a	VDI12_d31.MCFA.mat	27			
4b	VDI12_d31.GOS.neo	80			
4b	VDI12_d31.BG.neo	6			
4b	VDI12_d31.MCFA.neo	21			

@ Nummer van dierstudie zoals gebruikt in tabel 3

### 3.5.3.4 Systematiek voor functionele immunologie

In verschillende experimenten is een aantal specifieke metingen gedaan om te onderzoeken of er een effect was van de (voedings-)interventie op immuuncompetentie. Dit zijn parameters die direct betrekking hebben op immunologische functies van de gastheer. Voorbeelden van deze parameters zijn systemische expressie van acute fase eiwitten, of aantallen immuun cellen in darmweefsel. Om deze data te kunnen weergeven in de roseplot is per dataset gekeken of de desbetreffende specifieke meting significante verschillen liet zien tussen de interventie- en de controlebehandeling. Als dat het geval is, wordt een score 'ja' gegeven. Als er meerdere specifieke metingen zijn gedaan binnen een studie, dan wordt een 'ja' gescoord wanneer er minstens één specifieke meting een statistisch significant effect liet zien. De resultaten van deze nadere analyse ten behoeve van de het roseplot concept zijn samengevat in Tabel 8. Elke statistisch significant verschillende parameter wordt gerepresenteerd in de roseplot, waarbij één significante test een waarde 3 krijgt in de roseplot, twee significante tests een waarde 6,

en meer dan drie significante tests een waarde 10. Wanneer er geen significante verschillen werden gevonden voor deze specifieke waarnemingen is de waarde voor "Functionele immunologie" in de roseplot 0. In Tabel 9 wordt een overzicht gegeven van de diverse functionele testen die in de verschillende studies gemeten zijn.

**Tabel 8** Functionele immunologische parameters per studie met een statistisch significante verschil tussen interventie en controle groep [Yes /No]).

@	DataSets	P < 0,05	@	DataSets	P < 0,05
1	jej25FOS	N	5	AmoxVDI3Jej14	Y
1	jej14FOS	N	5	AmoxVDI3Jej5	Y
1	col14FOS	N	6	Ryed21_10vs0	N
2	amoxPigs 1	Y	6	Ryed21_10vs5	N
2	amoxPigs 7	Y	6	Ryed21_5vs0	N
2	amoxPigs W	Y	6	Ryed28_10vs0	N
2	amoxPigs W+4	Y	6	Ryed28_10vs5	N
2	amoxPigs W+28	Y	6	Ryed28_5vs0	N
3	ZincIle23	N	7	VDI5.2_L_jej	N
3	ZincJej23	N	7	VDI5.2_Q_jej	N
3	ZincIle35	N	7	VDI5.2_BG_jej	N
3	ZincJej35	N	7	VDI5.2_O_jej	N
3	ile14H14L	N	7	VDI5.2_FO_jej	N
3	ile23HH23LL	N	7	VDI5.2_L_il	N
3	ile23LH23LL	N	7	VDI5.2_Q_il	N
3	ile23HL23LL	N	7	VDI5.2_BG_il	N
3	ile23HH23LH	N	7	VDI5.2_O_il	N
3	ile23HH23HL	N	7	VDI5.2_FO_il	N
3	ile23LH23HL	N	8	ANT-CON	N
3	jej14H14L	N	8	BG-CON	N
3	jej23HH23LL	N	8	BUTY-CON	N
3	jej23LH23LL	N	8	RYE-CON	N
3	jej23HL23LL	N			
3	jej23HH23LH	N	9	lung.1-lung.2	Y
3	jej23HH23HL	N	9	jejunum.1-jejunum.2	N
3	jej23LH23HL	N			
4a	VDI12_d1.GOS.mat	Y			
4a	VDI12_d1.BG.mat	Y			
4a	VDI12_d1.MCFA.mat	Y			
4a	VDI12_d31.GOS.mat	Y			
4a	VDI12_d31.BG.mat	Y			
4a	VDI12_d31.MCFA.mat	Y			
4b	VDI12_d31.GOS.neo	Y			
4b	VDI12_d31.BG.neo	Y			
4b	VDI12_d31.MCFA.neo	Y			

Voor een toelichting op de datasets wordt verwezen naar Appendix 1. @ Nummer van dierstudie zoals gebruikt in tabel 3

**Tabel 9** Functionele parameters die gemeten zijn in de verschillende dierstudies.

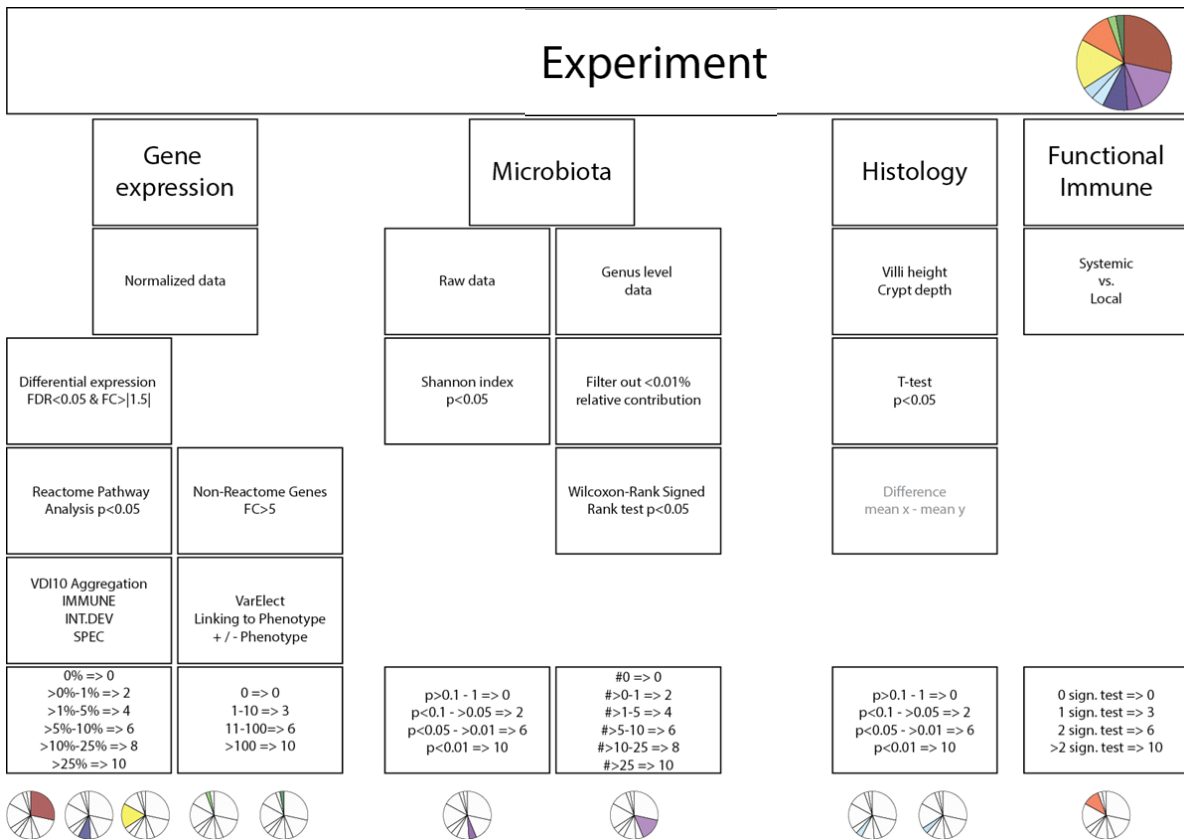
Studie	Functionele immunologische test
VDI-2: Maternale amoxicilline	Aantal slijmbeker cellen in dunne darm Concentratie acute fase eiwitten in bloed
VDI-3: Amoxicilline in vleeskuikens	Aantal / type T-cellen in dunne darm Aantal macrofagen in dunne darm
VDI-12: Maternale en neonatale MCFA, beta-glucanen, GOS	Aantal / type T-cellen in dunne darm Aantal macrofagen in dunne darm
VDI-5: Zink in biggen	Concentratie interleukine 6 in bloed Concentratie acute fase eiwitten in bloed
VDI-5: Rogge in vleeskuikens	Aantal slijmbekercellen in dunne darm
VDI-11: Plantaardige melkvervanger in kalveren	Haematologische analyse Functionaliteit long macrofagen

### 3.5.3.5 Weergave van villus – crypt ratio's in de roseplots

In verschillende experimenten is de hoogte van vlokken en de diepte van crypten in de dunne darm gemeten. Er zijn echter binnen diersoorten sterke verschillen in villus hoogte en crypt diepte tussen de verschillende darmdelen. Dit maakt het erg lastig om de resultaten van deze metingen in één gemeenschappelijke parameter weer te geven. Deze metingen kunnen alleen vergeleken worden tussen dieren van dezelfde leeftijd, en afkomstig van dezelfde locatie in de darm. Om deze parameter toch te kunnen weergeven in de roseplot is de volgende keuze gemaakt: wanneer er een significant verschil werd waargenomen ( $p \leq 0,05$ ) in villushoogte en/of cryptdiepte tussen de interventiegroep en de controlegroep, dan krijgt de parameter Morfologie in de roseplot een waarde 10. Zonder significante verschillen is de waarde van deze parameter 0.

## 3.6 Software ontwikkeling

De resultaten voor de verschillende in de studies gemeten parameters zijn in verschillende statistische en bio informatica software programma's gegenereerd. Deze resultaten zijn vervolgens ingevoerd in 'R', een (computer)programma waarin eveneens statistische analyses kunnen worden uitgevoerd. Binnen het huidige project is een flexibele pijplijn ontwikkeld voor de geïntegreerde analyse en weergave van resultaten in het immuuncompetentie concept en in de bijbehorende roseplots. Categorieën waarnemingen kunnen naar behoefte toegevoegd of verwijderd worden, en ook de wegingsfactoren en score systematiek kan eenvoudig aangepast worden. Door de hoge weegfactoren voor de resultaten ten aanzien van gen expressie in darmweefsel en microbiota samenstelling in darm digesta vormen deze resultaten de basis van de roseplot. Deze zijn aangevuld met resultaten van andere relevante waarnemingen voor het immuuncompetentie concept. Figuur 7 is een flow-diagram met daarin de input voor de verschillende parameters zoals gen expressie, microbiota, histologie, en functionele immunologie. Vervolgens staan er onder de rekenregels vermeld om waargenomen effecten te vertalen naar scores in het immuuncompetentie concept.



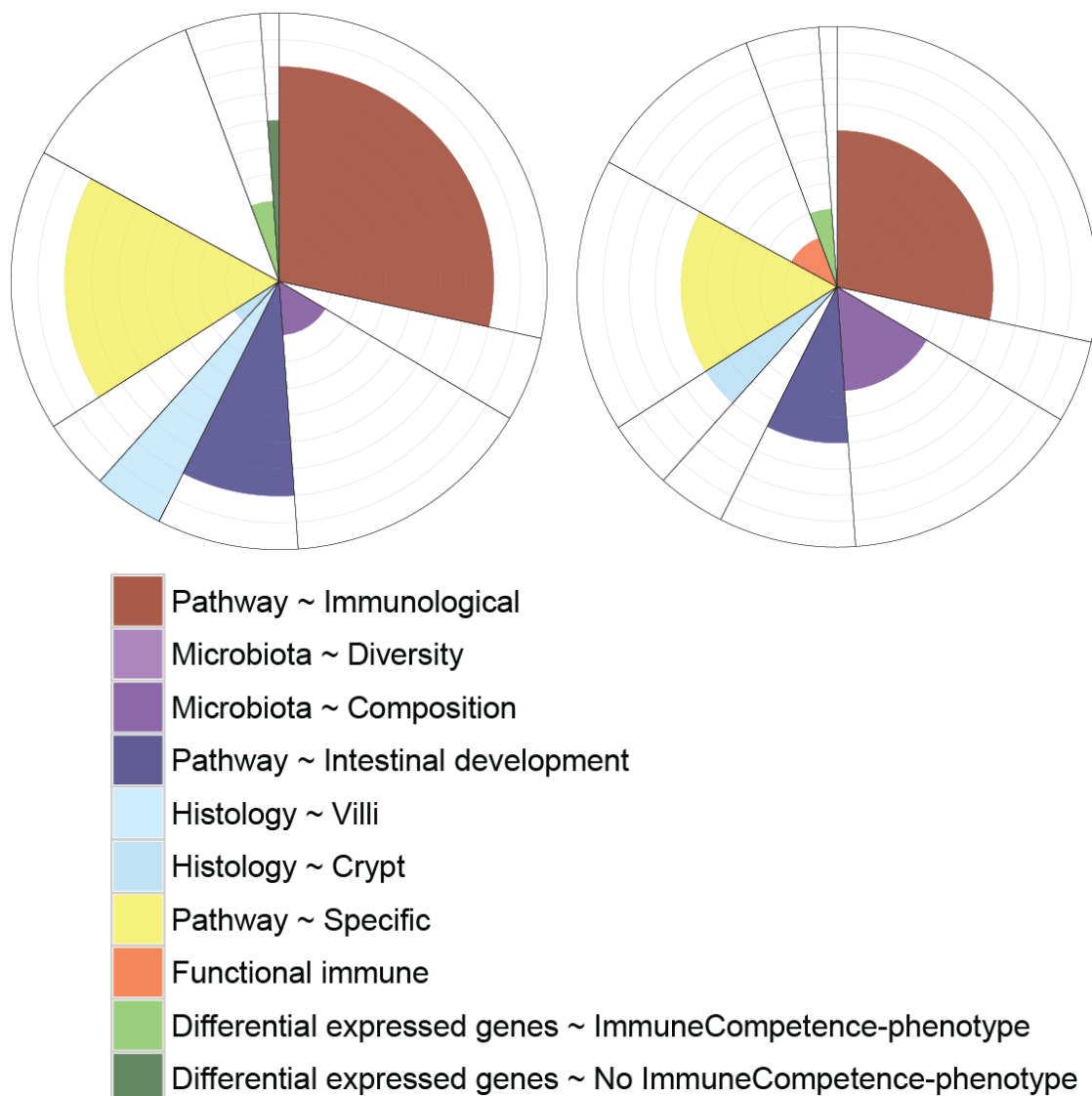
**Figuur 7** Flow-diagram dat aangeeft hoe de parameters verwerkt worden tot roseplots. De huidige roseplot geeft vier verschillende soorten input data weer: gen expressie, microbiota, histologie (darm), en functionele immunologie. Deze staan weergegeven in boxen bovenin de flow-diagram. Onder deze boxen staan de verschillende rekenregels welke zijn toegepast en de scores voor het betreffende segment in de roseplot.



# 4 Resultaten

## 4.1 Roseplots

Op basis van de methode zoals beschreven in hoofdstuk 3, inclusief de toegepaste verfijningen, zijn roseplots gemaakt op basis van i) de roggestudie in kuikens zoals uitgevoerd in VDI-11 en van de amoxicilline studie in biggen zoals uitgevoerd in VDI-2 (Figuur 8). De roseplots op basis van gemeten effecten in de overige studies binnen het VDI programma zijn bijgevoegd in Appendix 2.



**Figuur 8** Voorbeelden van roseplots op basis van resultaten van een tweetal VDI experimenten. De linker roseplot geeft de effecten van een voedingsinterventie (al dan niet opname van 10% rogge in het rantsoen) in vleeskuikens weer op dag 21, zoals gemeten in het jejunum [19]. De rechter roseplot geeft de effecten van al dan niet een amoxicilline behandeling van zeugen weer, zoals gemeten in het jejunum van biggen op dag 1 na geboorte [14].

De data zoals weergegeven in de roseplots geven aan dat er door de twee interventies veranderingen worden geïnduceerd in de vleeskuikens en pasgeboren biggen. Het verstrekken van rogge in het vleeskuikenvoer resulteerde op dag 21 in iets langere darmvilli en aantoonbaar diepere crypten

---

(lichtblauwe segmenten). Er was geen aantoonbaar effect op de diversiteit van de microbiota in de dunne darm, maar binnen de genera van de *Lactobacilli* deden zich wel verschuivingen voor, zoals blijkt uit het lichtpaarse segment in de roseplot. Door opname van rogge in het voer kwamen 103 geannoteerde genen meer en 16 genen in dunne darmweefsel minder tot expressie. Deze genen waren deels betrokken bij immunologische pathways (*TGF-beta signaling pathway*, *mTor signaling pathway*, *complement and coagulation pathway*; bruine segment), deels bij pathways die betrokken zijn bij de ontwikkeling van darmcellen (*cell cycle processes*, *Meiosis*, *M phase*; donkerpaarse segment) en deels bij specifieke pathways (*ErbB signaling pathway*, *insulin signaling pathway*; gele segment). In het rapport [19] concludeerden de auteurs dat de effecten van rogge-verstrekking aan vleeskuikens een beperkt effect had op immuuncompetentie gerelateerde kenmerken. De overige VDI studies met vleeskuikens lieten in de meeste gevallen een beperkte respons van de voerinterventie zien in de roseplots (Appendix 2).

De resultaten van de amoxicilline studie met zeugen en biggen lieten zien dat er kleine veranderingen in microbiota samenstelling van biggen werden gevonden als gevolg van een antibioticum interventie bij de zeugen tijdens de dracht. In de roseplot wordt dit weergegeven door het relatief kleine lichtpaarse segment. Er werden echter grote verschillen in genexpressie in darmweefsel van de biggen gevonden. Deze worden met name gerepresenteerd door de verschillende segmenten waarin "gereguleerde pathways" staan weergegeven. De voornaamste conclusie uit het rapport van studie 2 [14] was dat er verschillen in darmontwikkeling van biggen lijken te zijn tussen de interventie- en de controlegroep. Dit is terug te zien in een score in het donkerblauwe segment van "Pathway ~ Intestinal development". Tenslotte worden de verschillen in cryptdiepte die gevonden werden, gerepresenteerd door het lichtblauwe segment. Concluderend lijkt de immuun competentie roseplot de resultaten van de betreffende studie goed in samengevatte en gewogen vorm weer te geven.

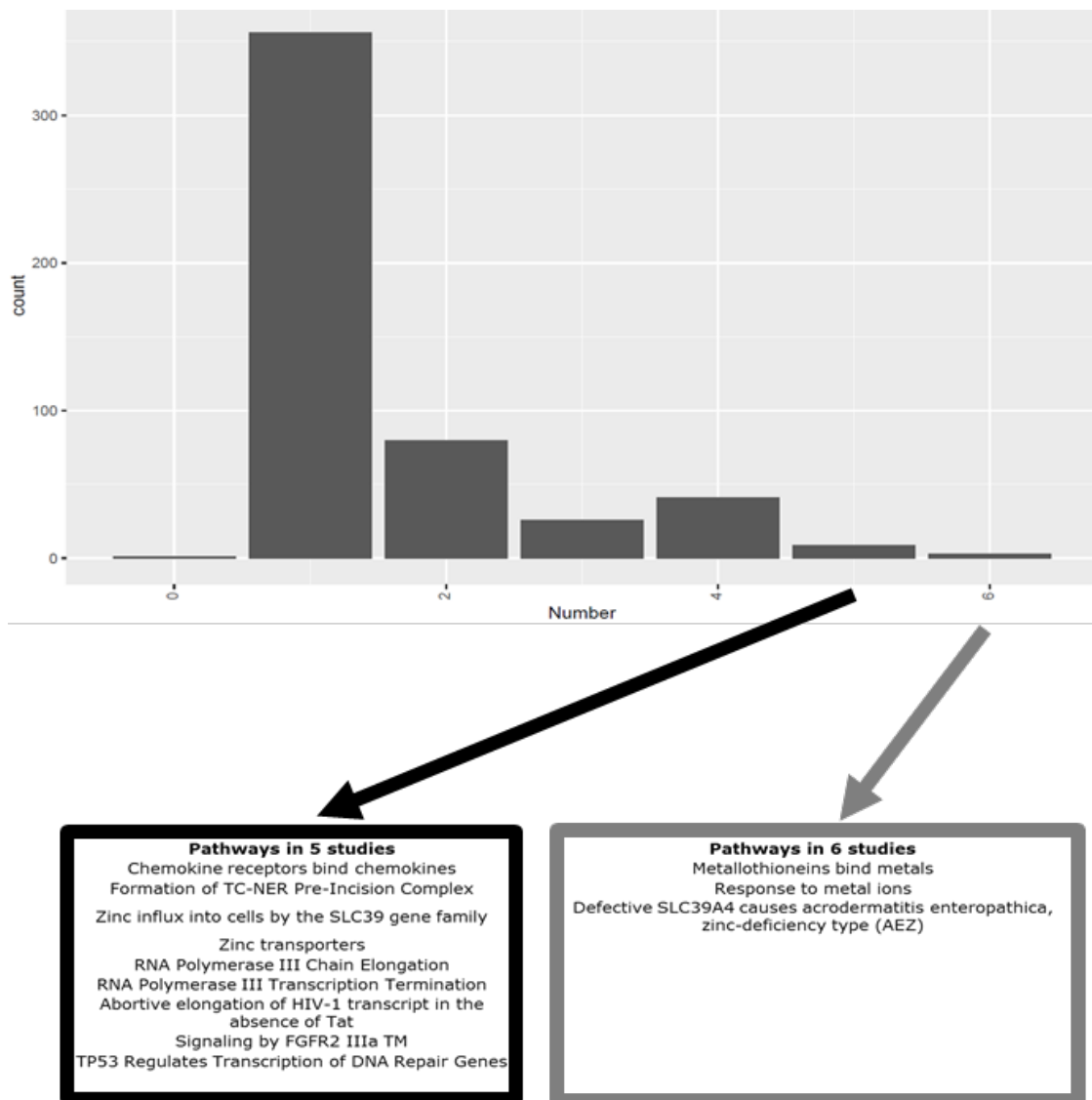
## 4.2 Interpretatie van de roseplots

Zoals uit bovenstaande voorbeelden blijkt, geven de roseplots weer in welke categorieën of parameters veranderingen plaatsvinden in de interventiegroep ten opzichte van de controle groep in de betreffende studie. Om de roseplots van verschillende interventies en verschillende tijdstippen binnen en tussen studies, maar ook over diersoorten heen kwantitatief met elkaar te vergelijken, is aanvullende analyse nodig. Het is wel mogelijk om kwalitatieve verschillen te benoemen door roseplots met elkaar te vergelijken. Dit kan bijvoorbeeld leiden tot conclusies als: "de gevonden effecten zijn groter op tijdstip 2 dan op tijdstip 1", of "opname van rogge in het voer induceert grotere verschillen dan opname van specifieke beta-glucanen". Om deze vergelijkingen makkelijker te maken, zijn de roseplots op diverse manieren geordend. Zo zijn ze gesorteerd op basis van diersoort, tijd, darmsegment, of type interventie. Vervolgens is gekeken of er visueel specifieke patronen onderscheiden konden worden. Dit bleek niet tot eenduidige conclusies te leiden. Om verschillen ook kwantitatief te beschouwen, is gebruik gemaakt van zogenaamde heatmaps. De heatmaps zijn alleen toegepast op parameters die in alle VDI experimenten zijn bepaald. Dit betreft data met betrekking tot genexpressie in darmweefsel en microbiota compositie van dunne darm digesta. Het doel van de beschouwing van heatmaps is om te na te gaan of bepaalde (voedings)interventies of tijdstippen tijdens/na een interventie clusteren op basis van de roseplots. De enige clustering die hierbij gevonden werd, was die tussen de verschillende tijdstippen binnen een dierexperiment (data niet getoond). Er werd geen clustering gevonden ten aanzien van de resultaten tussen de verschillende dierexperimenten. Wanneer naar individuele parameters gekeken wordt, in plaats van naar roseplots of heatmaps, kon wel overlap in resultaten tussen dierexperimenten gevonden worden. Figuur 9 toont de overlap in het aantal gereguleerde pathways in dunne darmweefsel als gevolg van de verschillende interventies in 5 of 6 verschillende dierstudies.

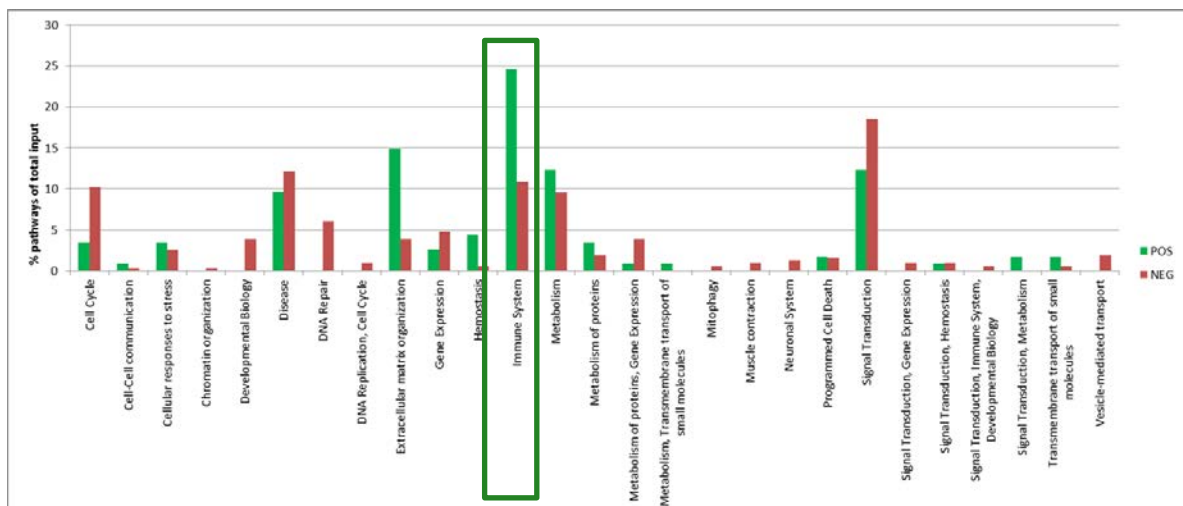
Vervolgens zijn de toegepaste interventies ingedeeld in veronderstelde positieve en negatieve interventies op basis van hun effect op immuuncompetentie. Onder verondersteld positieve interventies op immuuncompetentie werden verstaan voerinterventies met 1) grondstoffen (rogge, haverdoppen) en 2) additieven (beta-glucanen, visolie, quercitine, middenketenige vetzuren, oligosacchariden, butyraat, lysozyme). Onder verondersteld negatieve interventies op immuuncompetentie werden verstaan interventies met 1) antibiotica en 2) zinkoxide. Er is veel gediscussieerd over deze (subjectieve) indeling in positieve en negatieve interventies. Bijvoorbeeld, hoge concentraties rogge in het voer zonder gebruik van exogene enzymen kunnen de nutriëntverteerbaarheid negatief beïnvloeden, en daardoor wellicht ook een negatieve invloed hebben op immuuncompetentie.

Toepassing van antibioticum interventies kan enerzijds leiden tot een betere diergezondheid maar kan ook de stabiliteit van de microbiota in het maagdarmkanaal verstoren, leidend tot negatieve effecten op immuuncompetentie.

Bij het hanteren van deze indeling werden opmerkelijke verschillen gevonden in de genexpressie en geassocieerde pathways. Om de overeenkomsten en verschillen in genexpressie tussen positieve en negatieve interventies biologisch goed te kunnen interpreteren waren aanvullende analyses nodig. Hiervoor zijn zogenaamde heatmaps gebruikt. Het lijkt erop dat bij positieve interventies meer immunologische triggering (groen) plaatsvindt dan bij negatieve interventies (rood), hetgeen blijkt uit het grotere aantal immunologische parameters dat differentieel tot expressie kwam bij de positieve ten opzichte van de negatieve interventies (Figuur 10). Hoewel dit om één categorie van pathways gaat, is het verschil tussen verondersteld positieve en negatieve interventies groot. Hierbij moet wel bedacht worden dat de beide negatieve interventies beiden een direct antimicrobiële werking hebben. Bij het breder extrapoleren van deze bevindingen naar effecten van andere verondersteld negatieve interventies dient voorzichtigheid te worden betracht.



**Figuur 9** Overeenkomsten in effecten van interventies op geregleerde pathways in darmweefsel tussen de verschillende dierstudies. Op de x-as staat het aantal studies waarin bepaalde pathways geregleerd wordt. Het aantal pathways dat geregleerd wordt in 1, 2, 3, 4, 5 of 6 verschillende dierstudies en/of tijdstippen binnen studies staat aangegeven op de y-as. Pathways die in 5 of 6 studies worden geregleerd staan concreet benoemd in de boxen.



**Figuur 10** Verschillen in differentieel tot expressie komende pathways tussen veronderstelde positieve en negatieve interventies van de verschillende dierstudies in VDI. De x-as geeft de verschillende categorieën pathways aan zoals benoemd binnen de database Reactome. De y-as geeft het percentage van de pathways binnen die categorie dat gereguleerd wordt door de veronderstelde positieve (groen) of negatieve (rood) interventies. In de groene box staan pathways weergegeven die betrekking hebben op immuun processen.

### 4.3 Challenge studies

Zoals aangegeven in Figuur 3 is een immunologische challenge van het dier een goede methode om te bepalen welk fenotypische respons hoort bij de gemeten immuuncompetentie als gevolg van een (voedings)interventie. In enkele studies is tevens een immuun challenge uitgevoerd na een periode van nutritionele interventie om zo veranderingen van het (darm)stelsel na challenge (zogenaamde “quantitative disease phenotype”) te monitoren en te correleren aan immuuncompetentie conform het concept zoals ontwikkeld in het VDI programma (Tabel 10).

**Tabel 10** Studies binnen het VDI programma waarin een immuun challenge na een voedingsinterventie is toegepast.

VDI -WP	Diersoort	Levensfase	Interventie	Challenge
13	Varken	Adult	Zink	APP <sup>1</sup> Salmonella vaccin
12	Varken	Neonataal	MCFA	LPS <sup>2</sup>
			Betaglucanen	
			GOS	
11	Vleeskuiken	Neonataal	Antibiotica	NE <sup>3</sup>
			Betaglucanen	
			Butyraat	
			Rogge	

<sup>1</sup>*Actinobacillus pleuropneumoniae*, <sup>2</sup>Lipopolysaccharide; *E. coli*, <sup>3</sup>Necrotizing enteritis: *Eimeria maxima* + *Clostridium perfringens*

De globale proefopzet voor deze studies met een immuun challenge was ongeveer gelijk. In de eerste fase van het experiment is een (voedings)interventie toegepast en zijn de effecten van deze (voedings)interventie op (een deel van) relevante immuuncompetentie parameters gemeten. Vervolgens zijn de dieren uit zowel de interventie- als de controlegroep gechallengeed. Na de challenge is veelal alleen gemeten aan de respons van het dier op de challenge (de immuunrespons) en zijn niet opnieuw immuuncompetentie parameters bestudeerd. De gemeten responsen in de studies zijn

---

afgestemd op de aard en verwachte effecten van de challenge. Er is bijvoorbeeld gekeken naar de systemische cytokinen respons, aantallen bacteriën in specifieke weefsels of digesta, antistof titers en morfologische en histologische darmschade. Vervolgens zijn de waargenomen responsen op de challenge (quantitative disease phenotype) geassocieerd met de gemeten immunocompetentie parameters bepaald in eerdere studies met vergelijkbare interventies.

In de challenge studies bleken de geëvalueerde interventies veelal de klinische en immunologische respons van de dieren op de challenge niet te hebben beïnvloed. Hierdoor was het niet mogelijk de effecten van interventies op immunocompetentie parameters te relateren aan de gemeten specifieke immunologische en fenotypische respons van de dieren na de challenge. Verschillende oorzaken kunnen hieraan ten grondslag liggen zoals de aard en sterkte van de gebruikte challenge, de timing van challenge ten opzichte van de duur en beëindiging van de voerinterventie en de variatie in respons van dieren op de gebruikte (voer)interventies ter stimulering van immunocompetentie.

---

# 5 Discussie

## 5.1 Algemeen

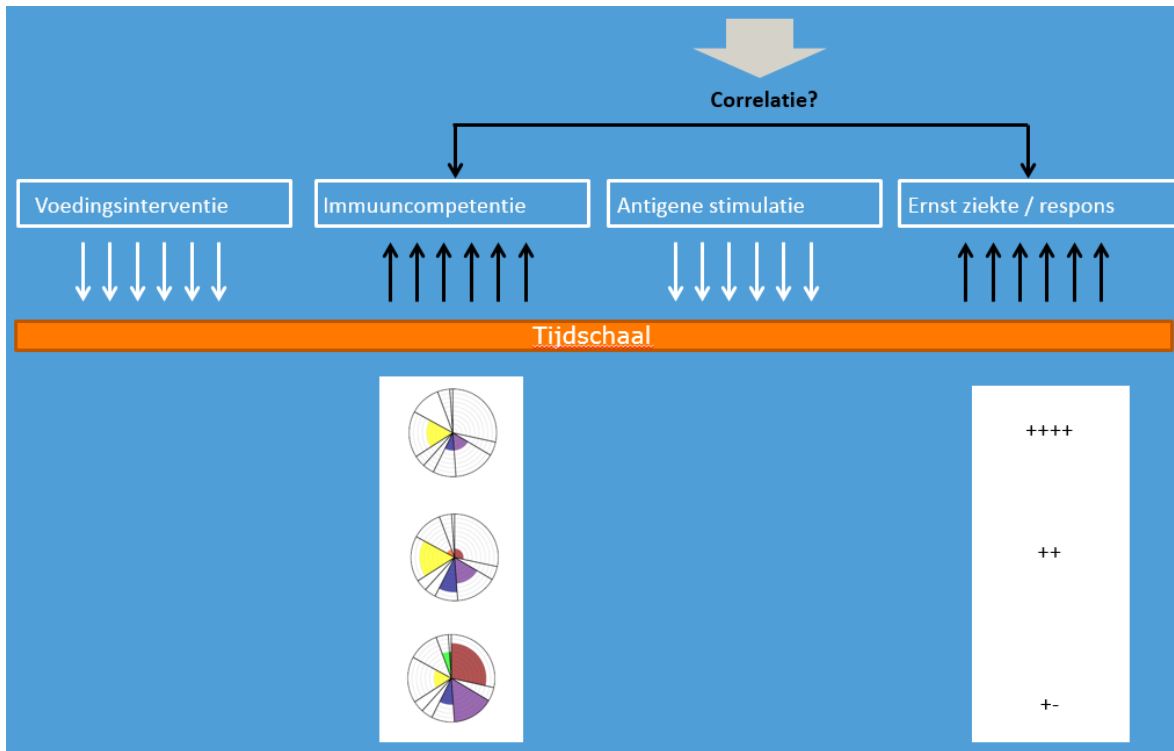
Het doel van het VDI-10 deelproject was om een eerste generatie “meetlat” te ontwikkelen waarmee immunocompetentie in varkens, vleeskuikens en vleeskalveren gemeten kan worden. Immunocompetentie wordt hier gedefinieerd als het vermogen van dieren om effectieve responsen van het immuunsysteem te tonen op het moment dat de gezondheid van het dier onder druk wordt gezet. De input voor deze meetlat zijn de resultaten van de afzonderlijke dierproeven die binnen het VDI programma zijn uitgevoerd. Alle uitgevoerde experimenten hadden als doel om de effecten van (voedings)interventies op (veronderstelde) immunocompetentie parameters te vergelijken met die van dieren in controle groepen. De dieren in de controle groep kregen een voer verstrekt zonder de specifieke interventie. De start en duur van de periode waarin de voerinterventie werd toegepast verschieden tussen de experimenten. In tabel 1A en 1B wordt een overzicht gegeven van de uitgevoerde dierexperimenten (1A) en de geanalyseerde parameters (1B).

### ***Generieke immunocompetentie***

Het concept van stuurbaarheid van immunocompetentie van landbouwhuisdieren, dat als vertrekpunt gold voor het VDI programma, komt voort uit resultaten van onderzoek in het laatste decennium die aangeven dat er een relatie bestaat tussen vroege (voedings)interventies in het jonge leven van mens en dier en gezondheid in het latere leven. Het bekendste voorbeeld van deze relatie komt uit onderzoek naar transgenerationale effecten van prenatale blootstelling aan de Nederlandse hongerwinter [28], maar ook onderzoek in varkens geeft aan dat vroege blootstelling aan antibiotica langdurige gezondheidseffecten kan hebben [11, 29-31]. Het bestaan van deze relaties suggereert dat het immuunsysteem van mens en dier niet uitsluitend erfelijk is vastgelegd maar dat het reactief vermogen van het immuunsysteem daarnaast ook beïnvloedbaar is voor of kort na de geboorte. Deze effecten worden “programming” genoemd, of “nutritional programming” wanneer de veranderingen worden geïnduceerd door de aard of samenstelling van de voeding.

In toenemende mate wordt verondersteld dat de microbiota samenstelling in de darm de immunocompetentie kan beïnvloeden [32-34]. Dit valt samen met het gegeven dat een belangrijk deel van het immuunsysteem en immuun cellen zich in het darmweefsel bevinden (~70%). De grote complexiteit van het immuunsysteem (cellulaire systeem, humorale systeem en de onderlinge communicatie) maakt het niet eenvoudig effecten van (voedings)interventies op de verschillende onderdelen van het immuunsysteem vast te stellen. Daarnaast is het complex om een waardeoordeel te geven over de richting van gemeten effecten in termen van positief of negatief voor immunocompetentie, gezondheid en productiviteit van het dier.

Naast effecten van “programming” en “microbiota in het darmkanaal” is bekend dat immunocompetentie ook mede wordt beïnvloed door genetische eigenschappen van het dier. De complexiteit van immunocompetentie en het onderlinge verband tussen de verschillende invloeden, lijken in ieder geval deels diersoort afhankelijk [4]. Het blijft daarmee de vraag in hoeverre we kunnen uitgaan van een concept van generieke immunocompetentie en beïnvloedingsmogelijkheden over diersoorten heen (varkens, pluimvee, kalveren). Gegeven de afwezigheid van analogieën in resultaten van studies binnen het VDI programma over diersoorten en (voedings)interventies, lijkt het meer realistisch het concept van beïnvloeding van immunocompetentie binnen diersoorten te bestuderen. Hierbij kan bijvoorbeeld gekeken worden naar het a-specifieke immuunsysteem en de barrièrefunctie van het darmkanaal, dat naast een immunologische component, ook een fysieke en microbiële component heeft. Mogelijk bestaan voor beïnvloeding en programmering van het a-specifieke immuunsysteem meer generieke voedingsinterventies over diersoorten en de mens. Daarnaast kunnen de effecten ten aanzien van de weerstand tegen specifieke aandoeningen (viraal, microbiel, of metabool) worden beschouwd, welke meer diersoort specifiek lijken, in plaats van een meer generieke benadering gericht op de veelheid aan aandoeningen die kunnen voorkomen in de veehouderij. Ontwikkeling van concepten van “customized immune competence” zouden bij deze redenering passen. Een belangrijk voordeel bij deze benadering, boven de generieke benadering, is dat de effecten van (voedings)interventies rechtstreeks kunnen worden gelieerd aan de immunologische en fenotypische responsen van dieren na challenge met een specifieke pathogeen of antigeen (Figuur 11).



**Figuur 11** Schematisch weergave dierexperiment om correlaties te onderzoeken tussen immuuncompetentie (roseplot) profielen en de ernst van de ziekte / kwaliteit van immuun responsen na een antigene stimulatie.

## 5.2 Vergelijking responsen op meetlat

Voor de verschillende studies is de meetlat 'ingevuld' voor zover de meetlatparameters gemeten zijn in de desbetreffende studie. Per studie zijn er verschillende roseplots gemaakt indien er metingen plaats vonden op meerdere tijdstippen na start van de interventie. Bij een vergelijking van de plots wordt het duidelijk dat in alle studies de meeste parameters konden worden gerepresenteerd. Bij beschouwing over studies en tijdstippen, blijkt dat de parameters gerelateerd aan expressie van genen in darmweefsel, zowel t.a.v. immuun specifieke processen als m.b.t. overige darm processen, een respons laten zien in alle studies. De parameters gerelateerd aan microbiota lijken minder vaak beïnvloed te worden. Dit kan een gevolg zijn van de keuze voor "diversiteit van microbiota" en "microbiota compositie" als parameters gerelateerd aan de gemeten microbiota in het darmkanaal. Wellicht geeft het gebruik van andere, afgeleide parameters gerelateerd aan de microbiota in de darm meer waarde voor de immuuncompetentie meetlat, bijvoorbeeld in de vorm van metabolieten van microbiële oorsprong. Andere functionele parameters zijn vaak specifiek in slechts één studie bepaald. Hierdoor is de waarde van deze functionele parameters voor de immuuncompetentie meetlat beperkt.

Verder valt na analyse van de responsen in de meetlat op dat deze diersoort specifiek zijn. Het tijdstip na interventie waarop de meeste responsen zichtbaar zijn, de 'vulling' van de meetlat op een schaal van 0 tot 10, en sterkst beïnvloede parameters zijn afhankelijk van de diersoort/-categorie. Bij nadere clustering worden de roseplots van de 'vleeskuikens' en 'varkens' als eerste gegroepeerd. Dit geldt ook als we verder inzoomen op de verschillende onderliggende responsparameters. Na de groepering op diersoort, is de clustering op basis van de responsen beschreven in de meetlat, interventie afhankelijk. De mate van inductie van de verschillende parameters (immunologische processen, microbiota, darmontwikkelingsprocessen) is afhankelijk van het meettijdstip na aanvang en/of beëindiging van de voerinterventie, waarbij voor sommige interventies geldt dat de mate van inductie van parameters afneemt in de tijd terwijl bij andere (voedings)interventies de effecten op de parameters langer aanhouden.

Als we de analyse op de plots doen op basis van de leeftijd waarop de interventie heeft plaats gevonden, lijkt deze clustering meer diersoort onafhankelijk te zijn. Hierbij laten vroege interventies meer effecten in de meetlat zien dan interventies op latere leeftijd. Hierbij moet opgemerkt worden dat het aantal studies dat in deze clustering meegenomen kan worden relatief gering is. Als we maternale interventies

---

beschouwen als vroege interventies kan worden geconcludeerd dat vroege interventies een hogere inductie geven van responsen in de meetlat dan latere interventies (vleeskuikens na dag 14 leeftijd, biggen in de periode na spenen).

Als we clusteren op basis van effecten binnen verondersteld negatieve en positieve interventies ten aanzien van immuuncompetentie, wordt een ander beeld zichtbaar. Hoewel subjectief, is verondersteld dat orale interventies met antibiotica en zinkoxide als negatieve interventies voor immuuncompetentie te beschouwen zijn, en de overige interventies (opname van rogge, haverdoppen, beta-glucanen, visolie, quercitine, middenketenige vetzuren, oligosacchariden, butyraat, en lysozym in het voer) als positief.

Op het microbioom in de darm leverde dit onderscheid in positieve en negatieve interventies geen clustering van resultaten op. Ten aanzien van effecten op genexpressie in darmweefsel daarentegen, kwamen er wel verschillen tussen positieve en negatieve interventies naar voren. Ter verdieping hebben we de betreffende segmenten "immuun pathways", "darmontwikkelings pathways", en "overige pathways" van de meetlat nader geanalyseerd. Daaruit bleek dat de "positieve interventies" een groter aandeel biologische processen reguleerden gerelateerd aan immuunprocessen en extracellulaire matrix organisatie processen t.o.v. "negatieve interventies". De negatieve interventies induceerden met name processen in darmweefsel gerelateerd aan cel cyclus, weefselontwikkeling, en DNA signaal transductie. Er is dus een duidelijk verschil in respons tussen negatief en positieve interventies op het niveau van biologische gen expressie processen in darmweefsel. Hierbij moet opgemerkt worden dat de beide "negatieve" voerinterventies een sterke antimicrobiële werking hebben, hetgeen niet resulteerde in een clustering van deze studies ten opzichte van de andere studies. Het is niet bekend of deze werking verantwoordelijk is voor de waargenomen effecten op genexpressie in darmweefsel. De suggestie dat voerinterventies met antimicrobiële eigenschappen ontwikkeling van immuuncompetentie en immuunprocessen negatief beïnvloeden verdient nader onderzoek.

De meetlat kan goed gebruikt worden om interventies binnen eenzelfde diersoort op eenzelfde tijdstip/leeftijd onderling te vergelijken. Ook is de meetlat goed te gebruiken om te onderzoeken wat de duur is van effecten van voerinterventies op immuuncompetentie parameters.

## 5.3 "Window of opportunity" voor immuuncompetentie

Gebaseerd op de bevindingen van studies in het VDI programma kan geconcludeerd worden dat interventies in het vroege leven meer en grotere effecten bewerkstelligen dan voerinterventies toegepast in latere levensfasen. Bovendien wordt verondersteld dat de effecten van vroege interventies een meer langdurig effect zullen hebben. De exacte "window of opportunity" voor voerinterventies gericht op immuuncompetentie is niet bepaald in de studies binnen het VDI programma.

Met name voor varkens is er discussie of interventies echt voor spenen moeten worden toegepast, of dat er tijdens de periode rond en kort na spenen ook significante veranderingen in immuuncompetentie kunnen worden geïnduceerd. Er is meer onderzoek nodig om de grenzen van de "window of opportunity" voor de verschillende diercategorieën in de tijd te bepalen. Hoewel daar in het VDI onderzoek niet naar gekeken is, lijkt het voor de hand te liggen dat deze grenzen ook afhangen van de aard en mode of action van de interventie.

Voorgaande is ook van belang voor de vleeskalverhouderij. In de huidige praktijk worden vleeskalveren tijdens de eerste twee levensweken op het melkveebedrijf gehouden. Dat maakt het niet eenvoudig op jonge leeftijd reeds specifieke voerinterventies gericht op immuuncompetentie ontwikkeling op te leggen. Ook voor deze sector geldt dat nader onderzoek de exacte grenzen van de gevoelige periode voor beïnvloeding van immuuncompetentie moet bepalen.

Concluderend bevestigt het VDI onderzoek dat voerinterventies vroeg in het leven de grootste veranderingen in immuuncompetentie parameters induceren.



---

## 5.4 Associatie respons immuuncompetentie meetlat en effecten na immuun challenge

De meetlat die binnen dit project ontwikkeld is, heeft als doel om immuuncompetentie meetbaar te maken, zoals weergegeven wordt in Figuur 2. De immuuncompetentie kan voorspellen hoe goed een dier kan reageren op een immuun of pathogeen challenge, en moet dus gemeten worden voordat de daadwerkelijke challenge opgelegd wordt. Voor de ontwikkeling van de meetlat is er wel informatie nodig over de daadwerkelijke immuuncompetentie van een dier om de meetlat te kunnen 'ijken'. Voor deze ijk-procedure, zijn verschillende soorten (immuun) challenges gebruikt variërend van voer gebaseerde challenges tot verschillende infectieuze challenges. De opleg van challenges had hierbij als doel om eventuele verschillen in immuuncompetentie, geïnduceerd door de toegepaste (voedings)interventies, zichtbaar te maken. In geen van de uitgevoerde studies werd er echter een verschil aangetoond in responsen op de challenge tussen dieren in de (voedings)interventie groep en de controle groep. Hiervoor zijn verschillende oorzaken aan te wijzen.

Allereerst is het mogelijk dat de toegepaste (voedings)interventies, in tegenstelling tot de verwachting, daadwerkelijk geen effect hebben gehad op de immuuncompetentie van de dieren. In dat geval zal er na een challenge geen verschil optreden in de responsen van het immuunsysteem en de klinische respons van dieren op de challenge. De toegepaste (voedings)interventies waren echter op basis van literatuur en expert opinion geselecteerd op hun verwachte effect op immuuncompetentie.

Een andere mogelijke verklaring voor het gebrek aan verschil in respons van dieren in de challenge-groep en de controle groep, zou kunnen liggen in de aard en ernst van de toegepaste challenges. De gekozen (voedings)interventies hadden een verondersteld positief negatief effect op de immuuncompetentie. De hypothese dat de via de interventies geïnduceerde veranderingen effecten van de challenges zouden kunnen verminderen (positieve interventies) of vergroten (negatieve interventies). Het LPS challenge model dat is toegepast op jonge biggen net na het spenen is een systemische challenge die direct aangrijpt op receptoren van immuun cellen, bijvoorbeeld de Toll-Like receptoren. Hoewel het mogelijk kan zijn dat een (voedings)interventie deze receptoren beïnvloedt, is de kans dat een (voedings)interventie systemische immuun cellen zodanig verandert dat deze directe receptor-interactie beïnvloed wordt, wellicht erg klein. Effecten van gerichte voedingsinterventies op de werkzaamheid van het lokale immuunsysteem in het darmkanaal zijn wellicht waarschijnlijker. Er moet echter worden opgemerkt dat andere studies met voedingsinterventies het genoemde LPS model met succes hebben gebruikt [35, 36], waarbij de leeftijd waarop de challenge en de voerinterventie zijn toegepast wel verschillen van die in de VDI challenge proef met jonge biggen. De challenge van jonge varkens met *Actinobacillus pleuropneumoniae* grijpt aan op de longen. Hoewel is aangetoond dat er communicatie is tussen de lokale immuunsystemen in de darm en de long hebben de lokale effecten van de interventie met zink oxide via het voer in de darm van varkens geen invloed gehad op het lokale immuunsysteem in de longen.

Voor de vleeskuikens is gekozen voor een co-infectie model met *Eimeria* en *Clostridium perfringens*. Doordat de maximale darmlaesie score in dit experiment 2 was (op een schaal van 1-5) kan hier het meettraam te klein zijn geweest om verschillen in voerinterventies te kunnen aantonen. Tevens kon er ook bij kuikens uit de controlegroep *Eimeria* parasieten geïsoleerd worden, terwijl onduidelijk is of de *C. perfringens* challenge in de studie voldoende is aangeslagen. Dit zou kunnen verklaren waarom er geen duidelijke verschillen in respons tussen de proefgroepen zijn gevonden.

Naast eerder genoemde toegepaste immuun challenge in varkens is in één van de studies een levend, oraal vaccin tegen *Salmonella* toegediend. Deze challenge voldoet aan de eerder gestelde voorwaarde dat het bij voorkeur een mucosale challenge zou moeten zijn. Echter, in deze studie zijn met name systemische read-out parameters bepaald. Zo is bijvoorbeeld gekeken naar effecten op systemische antilichaam titers. Antilichaam productie wordt maar in beperkte mate bepaald door immuuncellen in de darmmucosa. Dit is een mogelijke verklaring waarom ook hier geen verschillen tussen de proef- en controlegroep zijn gevonden t.a.v. responsen van het immuunsysteem.

## 5.5 Parameters meetlat

De parameters voor de meetlat zijn gekozen op basis van wetenschappelijke literatuur en expert opinion. De keuze voor de parameters is gemaakt bij de start van dit deelproject en is mede ingegeven door de

---

doelstelling van het VDI programma, namelijk immuuncompetentie meetbaar maken. Er is een bewuste keuze gemaakt om 'performance' gerelateerde kenmerken uit deze meetlat te laten. Hoewel performance een belangrijk aspect is voor de dierhouderij, is het hier losgekoppeld van de meetlat omdat deze parameters in mindere mate relevant zijn voor immuuncompetentie. Daarnaast zijn de studies zoals uitgevoerd binnen VDI niet opgezet om effecten van de voerinterventies op de zoötechnische resultaten statistisch voldoende onderscheidend te kunnen bepalen. In alle studies zijn zowel genexpressieniveaus in darmweefsel en microbiota-samenstelling en diversiteit in digesta in het darmkanaal bepaald. Per studie zijn deze parameters in een specifiek darmsegment bepaald, ingegeven door het type interventie. Het lijkt er op dat de microbiota samenstelling en diversiteit binnen de VDI studies als gevolg van de interventie minder veranderen dan op voorhand was verwacht op basis van literatuur [12, 37-43]. Mogelijk is dit het gevolg van het feit dat de microbiota in het darmkanaal vooral snelle kort durende veranderingen ondergaat na een verandering in voersamenstelling, waardoor het tijdstip van monsternamen voor bepaling van effecten nauw komt. Daardoor kunnen ook veranderingen van de microbiota samenstelling worden gemist. Op basis van de waargenomen veranderingen in genexpressie van darmweefsel, lijken veronderstelde veranderingen ten opzichte van immuuncompetentie wel plaatsgevonden te hebben. Op basis van de genexpressie lijkt een langdurige verandering te hebben plaatsgevonden in immuuncompetentie die waarschijnlijk het gevolg is van een veranderde microbiota in het darmkanaal. De darm microbiota lijkt, op de leeftijd van het dier waarop het onderzoek heeft plaats gevonden, veerkrachtig en daarmee lijkt de samenstelling na beëindiging van een voerinterventie snel terug te veranderen naar de oorspronkelijke samenstelling [44, 45]. Daarnaast kan ook de sequentie-diepte tijdens de analyse van de microbiota samenstelling van invloed zijn geweest op de resultaten. Wanneer de annotatie van bacteriële genomen in de toekomst verbetert, kunnen de data op een dieper niveau geanalyseerd worden, dat wil zeggen op species niveau in plaats van genus niveau. Dit houdt in dat er na de verdiepte analyse wellicht meer veranderingen kunnen worden waargenomen die nu zijn gemist door de gebruikte analyse methode. De meetlat is flexibel omdat de parameters aangepast kunnen worden. De weegfactoren voor de microbiota diversiteit en samenstelling kunnen, bijvoorbeeld, anders verdeeld worden. Gezien de resultaten kan gedacht worden dat de samenstelling misschien zwaarder zou moeten wegen dan de diversiteit (met de huidige analyse methode). Op dit moment wegen beiden even zwaar.

Andere parameters die in de meetlat zijn opgenomen, als een onderdeel van de immuuncompetentie zijn parameters gerelateerd aan de morfologie en 'functionele immunologie' van de darm. De morfologie van de darm wordt gemeten omdat dit een indicatie kan geven voor de darmfunctionaliteit en darmgezondheid. Wanneer de darmvlokken beschadigd raken, geeft dit onder meer een groter risico op invasie van pathogenen en kan de nutriëntabsorptiecapaciteit verminderd zijn [46, 47]. Door het meten van de villihoogte en cryptdiepte kan een inschatting gemaakt worden van het absorberend vermogen en de proliferatie van de darm. Binnen het VDI-programma zijn deze morfologische criteria vaak ter aanvulling of ondersteuning gemeten op de gegevens omtrent expressie van genen in darmweefsel. Verder zijn er ook parameters in de meetlat opgenomen als maat voor 'functionele immunologie'. Voorbeelden van parameters binnen deze categorie zijn resultaten t.a.v. immunohistochemie of concentraties specifieke cytokinen in het bloed. Deze additionele analyses zijn binnen de verschillende studies uitgevoerd om meer inzicht te krijgen in immunologische responsen. Binnen 'functionele immunologie' is niet naar de datasoort gekeken, maar juist naar het resultaat van de uitgevoerde test. Omdat er verschillende typen parameters in deze categorie vallen kunnen de data niet allemaal op dezelfde manier worden geanalyseerd. Voor deze categorie is daarom gekozen voor een score gebaseerd op al dan niet waarnemen van een statistisch significant resultaat/effect. Hoewel voorgaande goed weer te geven is in de meetlat, is het een zeer abstracte interpretatie van een resultaat. Een statistisch significant effect voor deze parameters bij vergelijking van de (voedings)interventie groep en de controlegroep is meegenomen in de meetlat.

De meetlat zoals beschreven in dit project is een eerste generatie meetlat, hetgeen betekent dat, wanneer er nieuwe, aanvullende inzichten zijn, de meetlat in een volgende generatie aangepast kan worden, bijvoorbeeld door het toevoegen van een categorie, veranderen van een weegfactor, of een andere weergave van de data in het segment. Als extra categorie kan gedacht worden aan analyse van metabolieten in bloedplasma, urine of feces met behulp van metabolomics technieken. Metabolieten vormen een afgeleide van het metabolisme van het dier en/of van het microbioom in het maagdarmkanaal. Analyse van het metaboloom in mest of digesta is dus een functionele microbioom analyse, vergelijkbaar met parameters in de categorie 'functionele immunologie' in de meetlat. Gebruik van bloed, urine en/of feces monsters heeft als voordeel dat dieren in studies niet hoeven te worden opgeofferd en dat dieren in longitudinale studies kunnen worden gebruikt.

---

Met de huidige meetlat kunnen resultaten van onafhankelijke studies die binnen het VDI programma uitgevoerd zijn met elkaar vergeleken worden. De meetlat kan ook gebruikt worden om te onderzoeken welke dieren (soort/categorie), op welke leeftijd en via welke toedieningsroute (maternaal, neonataal) het meest gevoelig zijn voor specifieke interventies, of groepen van (verwante) interventies. Daarnaast kunnen met de ontwikkelde software om de meetlat meer "automatisch" te vullen, ook andere dierstudies zoals studies die beschreven zijn in de literatuur geanalyseerd worden. Hierbij moet kritisch gekeken worden of in deze studies proefopzet, gemeten parameters en statistische analyse van resultaten geschikt zijn voor opname van de studie in de immunocompetentie meetlat.

## 5.6 Meta-analyses microbiota samenstelling darm en genexpressie darmweefsel

### **Microbiota**

Er is binnen het VDI programma een meta-analyse uitgevoerd t.a.v. de microbiota samenstelling in het darmkanaal van varkens en vleeskuikens [48]. Hiervoor zijn de gegevens uit alle VDI studies met deze diercategorieën gebruikt. In de analyse zijn gegevens t.a.v. de microbiota in de dunne darm samengevoegd om na te gaan of er per diersoort een 'core'-microbioom te identificeren is. In drie vleeskuiken studies kwamen 149 dezelfde bacteriële genera voor en in datasets van vijf varkensstudies werden 219 dezelfde bacteriële genera geïdentificeerd. Deze resultaten kunnen helpen bij de interpretatie van responsen van interventies in de immunocompetentie meetlat, waarin het effect van een interventie op het gehele microbioom in een bepaald segment van het darmkanaal wordt weergegeven. Op basis van de meta-analyse wordt het bijvoorbeeld mogelijk om veranderingen op genera uit het core-genoom een zwaardere weegfactor mee te geven dan bij inductie van veranderingen op genera buiten de aangegeven core van het microbioom. Het is de veronderstelling dat veranderingen aan het core microbioom meer consistent en reproduceerbaar zijn dan veranderingen aan het overige deel van het microbioom.

### **Genexpressie**

De gegevens m.b.t. de genexpressie in darmweefsel van varkens gegenereerd binnen de verschillende studies in het VDI programma zijn ook gebruikt voor een meta-analyse. Hierbij hebben we, naast VDI data, ook gebruikt gemaakt van gegevens uit de literatuur. Het doel was om meer inzicht te krijgen in de "window-of-opportunity" voor veranderingen in genexpressie in dit weefsel. Hiertoe zijn alle expressieprofielen van de dunne darm als functie van de tijd (leeftijd) uitgezet. Vervolgens is gekeken hoe de expressie van genen zich ontwikkelt in de tijd. Hierbij is geconstateerd dat verschillende expressieprofielen als functie van de tijd gekoppeld konden worden aan ontwikkeling van biologische functies van dit weefsel. In deze analyse is in kaart gebracht hoe darmweefsel zich ontwikkelt in een "normale" situatie, waarbij huisvesting, voeding en genetische achtergrond van dieren verschillend zijn. Voorgaande helpt om meer inzicht te krijgen in welke generieke biologische functies gereguleerd zijn in het zich ontwikkelende darmstelsel. Daarnaast hebben we ook een vergelijkbare genexpressie profielen gegenereerd van dieren die een specifieke voerinterventie hebben ondergaan gedurende een bepaalde tijd, gericht op inductie van verschillen in immunocompetentie. De analyse liet zien dat in het tijdsprofiel van dieren welke een voerinterventie ondergingen, een lagere expressie zichtbaar werd van genen gerelateerd aan immuun functie in vergelijking met de controle groep. Dergelijke data-mining inspanningen laten zien dat het mogelijk is om andere of nieuwe inzichten te verkrijgen wanneer analyses van genexpressie gegevens van bepaalde weefsels over meerdere studies worden uitgevoerd.

## 5.7 Uniformiteit studies

De huidige meetlat is gebaseerd op verschillende studies die binnen het VDI programma zijn uitgevoerd. In deze studies zijn verschillende diersoorten onderzocht, namelijk varkens, pluimvee, en kalveren. Daarnaast zijn in sommige studies specifieke parameters gemeten, bijvoorbeeld in de vorm van immunohistochemische bepalingen waarbij specifieke immuun cellen worden aangekleurd in (darm)weefsel, of ELISAs waarbij het niveau van specifieke cytokinen en acute-fase eiwitten in het bloed is bepaald.

Er is bewust gekozen om voor iedere individuele interventie alleen naar de effecten in die darmsegmenten te kijken waar op basis van de literatuur de grootste effecten werden verwacht. Dit heeft ertoe geleid dat er tussen de VDI studies variatie bestaat ten aanzien van de darmdelen waarin

---

metingen zijn uitgevoerd. Elk darmsegment heeft zijn eigen functies en is onderscheidend ten aanzien van de samenstelling van de aanwezige microbiota [49]. De dunne darm heeft als belangrijkste functies de enzymatische hydrolyse van nutriënten uit het voer, nutriëntabsorptie en speelt een rol als immunologische poortwachter. De dikke darm daarentegen heeft andere dominante functies zoals absorptie van water en absorptie van nutriënten en metabolieten die ontstaan bij de gedeeltelijke fermentatie door aanwezige microbiota, van niet in de dunne darm verteerde bestanddelen van de voeding. De verschillende (voedings)interventies die binnen het VDI programma zijn uitgevoerd hebben een veronderstelde meer specifieke mode-of-action met de grootste effecten in specifieke darmdelen. De meetlat voor immunocompetentie in zijn huidige vorm maakt geen onderscheid t.a.v. effecten in verschillende darmdelen en darmfuncties. Hierdoor zijn de plots van de responsprofielen van de meetlat niet altijd even goed vergelijkbaar. Zo heeft een significante verandering van één species in de dikke darm met  $10^{11}$  bacteriën per gram digesta, wellicht minder effect dan een verandering van één species in de dunne darm met maar  $10^4$  bacteriën per gram digesta. Dit kan consequenties hebben voor de interpretatie van de responsplots. Bij de verdere ontwikkeling van de meetlat is het van belang zo veel mogelijk dezelfde parameters op dezelfde darmlocaties te meten. Wanneer de meetlat wordt gebruikt om gemeten effecten in studies met elkaar te vergelijken, is het van belang om minimaal resultaten van soortgelijke metingen als nu gemeten in studies van het VDI programma in de analyse mee te nemen. Bij de verdere ontwikkeling van de immunocompetentie meetlat is nadere uniformering van te meten immunocompetentie parameters van belang.

## 5.8 Toekomst

De huidige versie voor de meetlat voor immunocompetentie is een tool om de effecten van specifieke (voedings)interventies bij met name varkens en vleeskuikens op een verscheidenheid aan darm gerelateerde parameters inzichtelijk te maken. De parameters zijn geselecteerd op basis van hun veronderstelde relatie met immunocompetentie. Voor vrijwel alle huidige parameters in het concept geldt dat de relatie met de ontwikkeling van het immuunsysteem en het vermogen van het immuunsysteem adequaat te reageren bij een immuun challenge niet eenduidig is vastgesteld en de interpretatie van relaties in termen van gewenst of ongewenst voor immunocompetentie niet eenduidig zijn. De keuze van de gebruikte challenge modellen kan hierbij een rol hebben gespeeld. Wellicht dat gebruik van het necrotiserende enteritis (NE) model bij vleeskuikens in principe wel geschikt is als immuun challenge, maar in de binnen het VDI programma uitgevoerde studie onvoldoende effect heeft gehad op het darmsysteem, resulterend in relatief lage darmlaesie scores. Als alternatief zou kunnen worden gedacht aan het gebruik van een mucosale LPS challenge in plaats van een systemische challenge, zoals in het VDI onderzoek met biggen is toegepast. Ook andere mucosale infecties, zoals *E. coli* of *Lawsonia*, waarbij ook mucosale parameters gemeten kunnen worden, zouden geschikt kunnen zijn. Ook kan worden gedacht aan gebruik van lagere doses van het toe te dienen immunogene agens of aan natuurlijke blootstelling onder praktijkomstandigheden. Naast infectieuze challenges, kunnen ook niet infectieuze challenges worden overwogen om het effect van interventies op variatie in immuun responsen te evalueren (b.v. temperatuurstress (hitte of kou), sociale stress (hoewel lastiger te standaardiseren), en voer geïnduceerde stress (nutriëntdichtheid voer, opname van ingrediënten met antigene of anti-nutritionele eigenschappen), of blootstelling aan toxines).

Door in onderzoek tegelijkertijd de genoemde voer-geïnduceerde veranderingen en responsen van een dier na een specifieke immuun challenge te meten, kunnen aard en richting van genoemde relaties tussen beiden beter worden vastgesteld. Dit sluit ook aan bij de mogelijkheid meer “customized immune competence” concepten te ontwikkelen in plaats van heel generieke concepten. Hieraan gekoppeld kunnen in de toekomst ook andere parameters (biomarkers in specifieke, gemakkelijk verkrijgbare monsters) worden geïdentificeerd, die als marker gelden voor beïnvloeding van specifieke immunologische of metabole processen met bewezen relaties met immunocompetentie.

De meetlat in zijn huidige vorm legt niet rechtstreeks relaties tussen veranderingen in immunocompetentie met de zoötechnische prestaties van dieren. Deze relaties hebben praktische relevantie omdat immuun challenges vaak gepaard gaan beïnvloeding van de gezondheidsstatus en met een verlaging van de voer- en nutriëntopname en veranderingen in nutriëntmetabolisme en nutriëntbehoeften van dieren in absolute en relatieve zin. Daarnaast kunnen nutritionele interventies gericht op ontwikkeling van immunocompetentie specifieke nutritionele kosten met zich meebrengen, die in aard en omvang bekend zullen moeten zijn om ze adequaat te kunnen incalculeren tijdens rantsoenformulering, zodat de consequenties voor de zoötechnische prestaties zo veel mogelijk worden beperkt. Door verschillen in aard en opzet van studies benodigd voor vaststelling van effecten op de

---

functionaliteit van het immuunsysteem enerzijds en de zoötechnische prestaties anderzijds, lijkt het niet haalbaar, ook zoötechnische responsparameters in de immunocompetentie tool op te nemen. De effecten op de zoötechnische resultaten van de interventies kunnen uiteindelijk in separaat onderzoek worden vastgesteld, waarbij mogelijk contrasten in mate van immuunsysteem activatie worden opgelegd.

---

## 6 Referenties

1. Smits, M.A., et al., *De rol van microbiota voor een evenwichtig afweersysteem*. Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 2014(Nr. 6 (June)): p. 22-26.
2. Schuijt, T.J., et al., *The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia*. Gut, 2016. **65**(4): p. 575-83.
3. Samuelson, D.R., D.A. Welsh, and J.E. Shellito, *Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 1085.
4. van Krimpen, M.M., et al., *Nutritional intervention in animals: benchmarking of strategies, monitoring biomarkers and immune competence*. 2014, Wageningen UR Livestock Research.: Wageningen.
5. Sommer, F. and F. Backhed, *The gut microbiota--masters of host development and physiology*. Nature reviews. Microbiology, 2013. **11**(4): p. 227-38.
6. Cerf-Bensussan, N. and V. Gaboriau-Routhiau, *The immune system and the gut microbiota: friends or foes?* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(10): p. 735-44.
7. Schnupf, P., V. Gaboriau-Routhiau, and N. Cerf-Bensussan, *Host interactions with Segmented Filamentous Bacteria: an unusual trade-off that drives the post-natal maturation of the gut immune system*. Semin Immunol, 2013. **25**(5): p. 342-51.
8. de Lange, C.F.M., et al., *Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs*. Livestock Science, 2010. **134**(1-3): p. 124-134.
9. Pluske, J.R., *Feed- and feed additives-related aspects of gut health and development in weanling pigs*. J Anim Sci Biotechnol, 2013. **4**(1): p. 1.
10. Huyghebaert, G., R. Ducatelle, and F. Van Immerseel, *An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers*. Veterinary Journal, 2011. **187**(2): p. 182-188.
11. Schokker, D., et al., *Long-lasting effects of early-life antibiotic treatment and routine animal handling on gut microbiota composition and immune system in pigs*. PLoS ONE, 2015. **10**(2).
12. Schokker, D., et al., *Early-life environmental variation affects intestinal microbiota and immune development in new-born piglets*. PLoS ONE, 2014. **9**(6).
13. Schokker, D., et al., *Effect of fructooligosaccharides on gut health in neonatal piglets*. 2015.
14. de Greeff, A., et al., *Effect of maternal antibiotic intervention in sows on gut development and microbiota in offspring*. 2015.
15. Jansman, A.J.M., et al., *Effects of a high level of dietary zinc over different post weaning periods on intestinal microbiota and mucosal gene expression in piglets*. . 2016.
16. Jansman, A.J.M., et al., *Effects of dietary zinc concentration on development of immune competence in post weaning piglets*. 2017.
17. de Greeff, A., et al., *Effect of neonatal and maternal dietary interventions on gut health of piglets*. 2017: Wageningen.
18. Schokker, D., et al., *Perturbation of microbiota in one-day old broiler chickens with antibiotic for 24 hours negatively affects intestinal immune development*. BMC Genomics, 2017. **18**(1): p. 241.
19. van Krimpen, M.M., M. Toriki, and D. Schokker, *Effects of rye inclusion in grower diets on immune competence-related parameters and performance in broilers*. Poult Sci, 2017. **96**(9): p. 3324-3337.
20. van Krimpen, M.M., et al., *Effect of nutritional interventions with quercetin, oat hulls,  $\beta$ -glucans, lysozyme or fish oil on immune competence related parameters of adult broilers*. 2016.
21. van Krimpen, M.M., et al., *Nutritional interventions to modulate immune competence in broilers and correlation to quantitative disease phenotype after Necrotic enteritis challenge*. 2017.
22. Stockhofe-Zurwieden, N., et al., *Nutritional interventions to modulate immune competence in broilers and correlation to quantitative disease phenotype after Necrotic enteritis challenge*. 2018.
23. Vighi, G., et al., *Allergy and the gastrointestinal system*. Clin Exp Immunol, 2008. **153 Suppl 1**: p. 3-6.
24. Croft, D., et al., *Reactome: a database of reactions, pathways and biological processes*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D691-7.
25. Croft, D., *Building models using reactome pathways as templates*. Methods Mol Biol, 2013. **1021**: p. 273-83.
26. Joshi-Tope, G., et al., *Reactome: a knowledgebase of biological pathways*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Database issue): p. D428-32.
27. Matthews, L., et al., *Reactome knowledgebase of human biological pathways and processes*. Nucleic Acids Res, 20 09. **37**(Database issue): p. D619-22.

- 
28. Veenendaal, M.V.E., et al., *Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine*. *Bjog-an International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2013. **120**(5): p. 548-554.
  29. Schokker, D., et al., *Early life microbial colonization of the gut and intestinal development differ between genetically divergent broiler lines*. *BMC Genomics*, 2015. **16**: p. 418.
  30. Mulder, I.E., et al., *Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces*. *BMC biology*, 2009. **7**: p. 79.
  31. Schmidt, B., et al., *Establishment of normal gut microbiota is compromised under excessive hygiene conditions*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e28284.
  32. Weng, M. and W.A. Walker, *The role of gut microbiota in programming the immune phenotype*. *J Dev Orig Health Dis*, 2013. **4**(3).
  33. Maynard, C.L., et al., *Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system*. *Nature*, 2012. **489**(7415): p. 231-41.
  34. Martin, R., et al., *Early life: gut microbiota and immune development in infancy*. *Benef Microbes*, 2010. **1**(4): p. 367-82.
  35. Liu, Y.L., et al., *Fish Oil Enhances Intestinal Integrity and Inhibits TLR4 and NOD2 Signaling Pathways in Weaned Pigs after LPS Challenge*. *Journal of Nutrition*, 2012. **142**(11): p. 2017-2024.
  36. Pi, D.A., et al., *Dietary supplementation of aspartate enhances intestinal integrity and energy status in weanling piglets after lipopolysaccharide challenge*. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2014. **25**(4): p. 456-462.
  37. Han, M., et al., *Dietary grape seed proanthocyanidins (GSPs) improve weaned intestinal microbiota and mucosal barrier using a piglet model*. *Oncotarget*, 2016. **7**(49): p. 80313-80326.
  38. Howard, M.D., et al., *Effects of dietary supplementation with fructooligosaccharides on colonic microbiota populations and epithelial cell proliferation in neonatal pigs*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1995. **21**(3): p. 297-303.
  39. Haenen, D., et al., *A diet high in resistant starch modulates microbiota composition, SCFA concentrations, and gene expression in pig intestine*. *Journal of Nutrition*, 2013. **143**(3): p. 274-83.
  40. Penders, J., et al., *Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy*. *Pediatrics*, 2006. **118**(2): p. 511-21.
  41. Price, K.L., et al., *Use of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on growth performance and microbiota of weaned pigs during *Salmonella* infection*. *J Anim Sci*, 2010. **88**(12): p. 3896-908.
  42. Russell, S.L., et al., *Perinatal antibiotic-induced shifts in gut microbiota have differential effects on inflammatory lung diseases*. *J Allergy Clin Immunol*, 2014.
  43. Tellez, G., et al., *Rye affects bacterial translocation, intestinal viscosity, microbiota composition and bone mineralization in Turkey poults*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0122390.
  44. Ruiz, V.E., et al., *A single early-in-life macrolide course has lasting effects on murine microbial network topology and immunity*. *Nature Communications*, 2017. **8**.
  45. Schulfer, A. and M.J. Blaser, *Risks of Antibiotic Exposures Early in Life on the Developing Microbiome*. *Plos Pathogens*, 2015. **11**(7).
  46. Hooper, L.V., D.R. Littman, and A.J. Macpherson, *Interactions between the microbiota and the immune system*. *Science*, 2012. **336**(6086): p. 1268-73.
  47. Turner, J.R., *Intestinal mucosal barrier function in health and disease*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(11): p. 799-809.
  48. Schokker, D., et al., *Integration of multiple gut microbiota datasets of pigs and broilers*. 2017.
  49. Mowat, A.M. and W.W. Agace, *Regional specialization within the intestinal immune system*. *Nature Reviews Immunology*, 2014. **14**(10): p. 667-685.

# Appendix 1

Hieronder de afkorting (kolom 1) zoals gebruikt in het rapport met daarbij de beschrijving (kolom 2)

Experiment	Category	Description
1	jej25FOS	Fructooligosaccharide - piglets@day25 ~ jejunum
1	jej14FOS	Fructooligosaccharide - piglets@day14 ~ jejunum
1	col14FOS	Fructooligosaccharide - piglets@day14 ~ colon
2	amoxPigs 1	amoxicillin maternal - piglets@day1 ~ jejunum
2	amoxPigs 7	amoxicillin maternal - piglets@day7 ~ jejunum
2	amoxPigs W	amoxicillin maternal - piglets@weaning ~ jejunum
2	amoxPigs W+4	amoxicillin maternal - piglets@weaning+4d ~ jejunum
2	amoxPigs W+28	amoxicillin maternal - piglets@weaning+28d ~ jejunum
3	ZincIle23	ZnO High vs Low (1) - piglets@day23 ~ ileum
3	ZincJej23	ZnO High vs Low (1) - piglets@day23 ~ jejunum
3	ZincIle35	ZnO High vs Low (1) - piglets@day35 ~ ileum
3	ZincJej35	ZnO High vs Low (1) - piglets@day35 ~ jejunum
3	ile14H14L	ZnO High vs Low - piglets@day14 ~ ileum
3	ile23HH23LL	ZnO HH vs LL - piglets@day23 ~ ileum
3	ile23HL23HH	ZnO HL vs HH - piglets@day23 ~ ileum
3	ile23HL23LH	ZnO HL vs LH - piglets@day23 ~ ileum
3	ile23HL23LL	ZnO HL vs LL - piglets@day23 ~ ileum
3	ile23LH23HH	ZnO LH vs HH - piglets@day23 ~ ileum
3	ile23LH23LL	ZnO LH vs LL - piglets@day23 ~ ileum
3	jej14H14L	ZnO High vs Low - piglets@day14 ~ jejunum
3	jej23HH23HL	ZnO HH vs LL - piglets@day23 ~ jejunum
3	jej23HH23LL	ZnO HL vs HH - piglets@day23 ~ jejunum
3	jej23HL23LL	ZnO HL vs LH - piglets@day23 ~ jejunum
3	jej23LH23HH	ZnO HL vs LL - piglets@day23 ~ jejunum
3	jej23LH23HL	ZnO LH vs HH - piglets@day23 ~ jejunum
3	jej23LH23LL	ZnO LH vs LL - piglets@day23 ~ jejunum
4a	VDI12_d1.GOS.mat	galactooligosaccharide maternal - piglets@day1 ~ colon
4a	VDI12_d1.BG.mat	betaglucans maternal - piglets@day1 ~ ileum
4a	VDI12_d1.MCFA.mat	medium chain fatty acids maternal - piglets@day1 ~ jejunum
4a	VDI12_d31.GOS.mat	galactooligosaccharide maternal - piglets@day31 ~ colon
4a	VDI12_d31.BG_mat	betaglucans maternal - piglets@day31 ~ ileum
4a	VDI12_d31.MCFA.mat	medium chain fatty acids maternal - piglets@day31 ~ jejunum
4b	VDI12_d31.GOS.neo	galactooligosaccharide neonatal - piglets@day31 ~ colon
4b	VDI12_d31.BG.neo	betaglucans neonatal - piglets@day31 ~ ileum
4b	VDI12_d31.MCFA.neo	medium chain fatty acids neonatal - piglets@day31 ~ jejunum
5	AmoxVDI3Jej14	amoxicillin in drinking water - chickens@day14 ~ jejunum
5	AmoxVDI3Jej5	amoxicillin in drinking water - chickens@day5 ~ jejunum
6	Ryed21_10vs0	Rye 10% vs 0% - chickens@day21
6	Ryed21_10vs5	Rye 10% vs 5% - chickens@day21
6	Ryed21_5vs0	Rye 5% vs 0% - chickens@day21

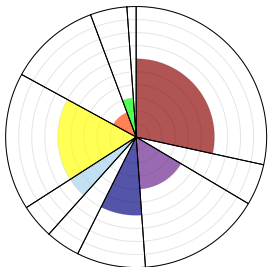


Experiment	Category	Description
6	Ryed28_10vs0	Rye 10% vs 0% - chickens@day28
6	Ryed28_10vs5	Rye 10% vs 5% - chickens@day28
6	Ryed28_5vs0	Rye 5% vs 0% - chickens@day28
7	VDI5.2_BG_ile	betaglucans - chickens@day28 ~ ileum
7	VDI5.2_FO_ile	fish oil - chickens@day28 ~ ileum
7	VDI5.2_L_ile	lysozyme - chickens@day28 ~ ileum
7	VDI5.2_O_ile	oathulls - chickens@day28 ~ ileum
7	VDI5.2_Q_ile	quercitin - chickens@day28 ~ ileum
7	VDI5.2_BG_jej	betaglucans - chickens@day28 ~ jejunum
7	VDI5.2_FO_jej	fish oil - chickens@day28 ~ jejunum
7	VDI5.2_L_jej	lysozyme - chickens@day28 ~ jejunum
7	VDI5.2_O_jej	oathulls - chickens@day28 ~ jejunum
7	VDI5.2_Q_jej	quercitin - chickens@day28 ~ jejunum
8	ANT-CON	antibiotics - chickens@day7 ~ jejunum
8	BG-CON	betaglucans - chickens@day7 ~ jejunum
8	BUTY-CON	butyrate - chickens@day7 ~ jejunum
8	RYE-CON	rye 25% - chickens@day7 ~ jejunum
9	lung.1-lung.2	lung.1-lung.2 - calves@day ~ lung
9	jejunum.1-jejunum.2	jejunum.1-jejunum.2 - calves@day ~ jejunum

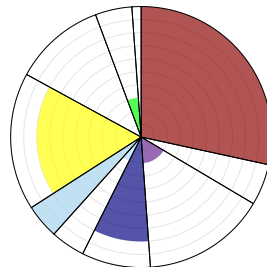
---

## Appendix 2

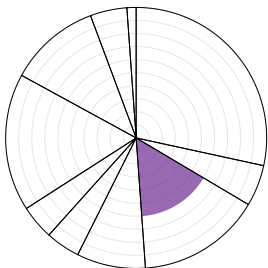
amoxicillin maternal – piglets@day1 – jejenum



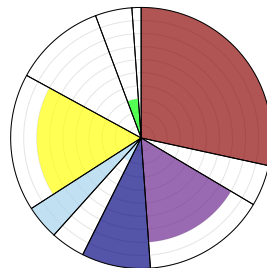
amoxicillin maternal – piglets@weaning – jejenum



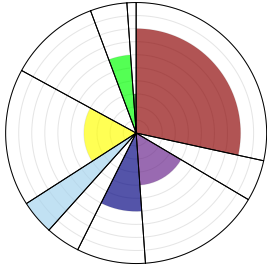
amoxicillin maternal – piglets@day7 – jejenum



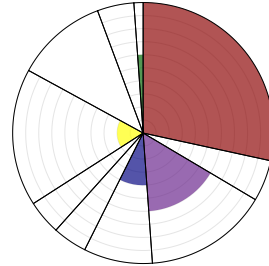
amoxicillin maternal – piglets@weaning+4d – jejenum



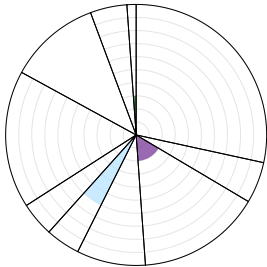
amoxicillin maternal – piglets@weaning+28d – jejunum



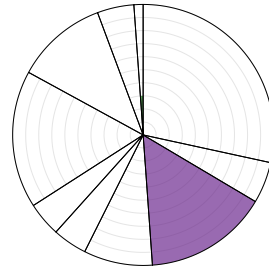
Fructooligosaccharide – piglets@day14 – jejunum



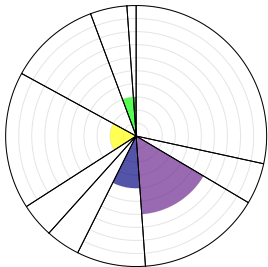
Fructooligosaccharide – piglets@day25 – jejunum



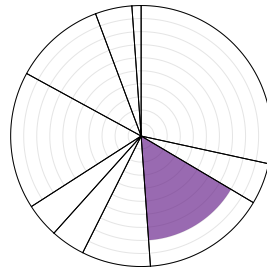
Fructooligosaccharide – piglets@day14 – colon



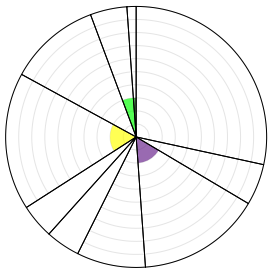
ZnO High vs Low (1) – piglets@day23 – ileum



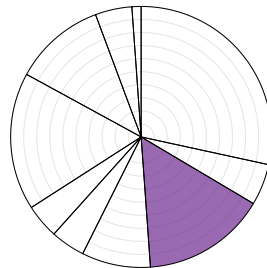
ZnO High vs Low (1) – piglets@day35 – ileum



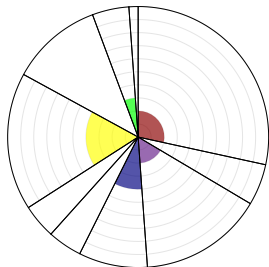
ZnO High vs Low (1) – piglets@day23 – jejunum



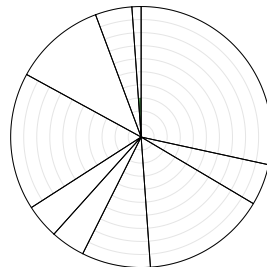
ZnO High vs Low (1) – piglets@day35 – jejunum



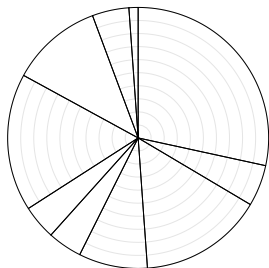
ZnO High vs Low – piglets@day14 – ileum



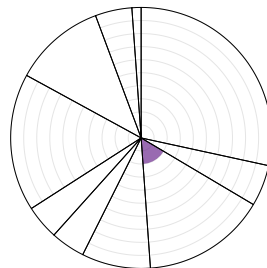
ZnO LH vs LL – piglets@day23– ileum



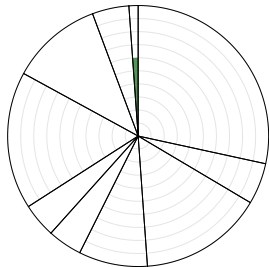
ZnO HH vs LL – piglets@day23– ileum



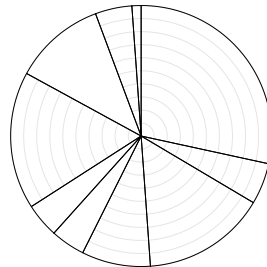
ZnO HL vs LL – piglets@day23– ileum



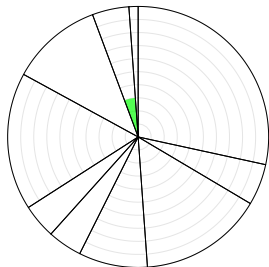
ZnO LH vs HH – piglets@day23– ileum



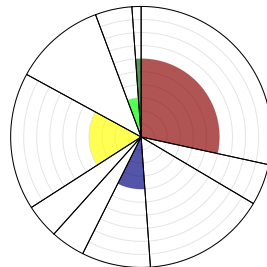
ZnO HL vs LH – piglets@day23– ileum



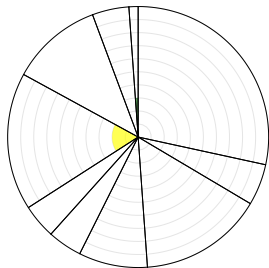
ZnO HL vs HH – piglets@day23– ileum



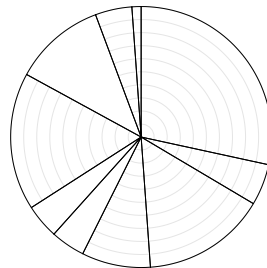
ZnO High vs Low – piglets@day14 – jejunum



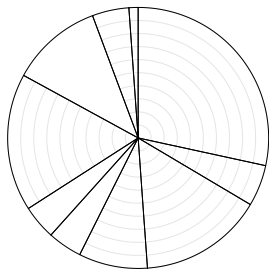
ZnO HL vs HH – piglets@day23– jejunum



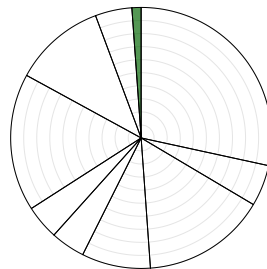
ZnO HL vs LH – piglets@day23– jejunum



ZnO LH vs LL – piglets@day23– jejunum

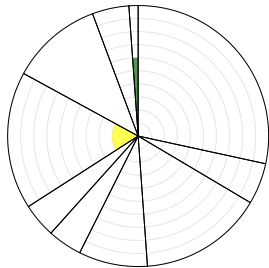


ZnO HL vs LL – piglets@day23– jejunum

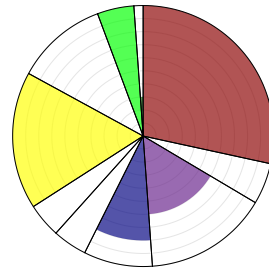




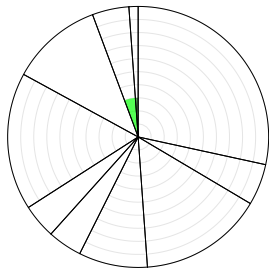
ZnO HH vs LL - piglets@day23- jejunum



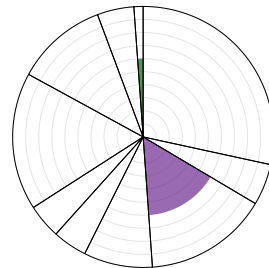
galactooligosaccharide maternal - piglets@day1 - colon



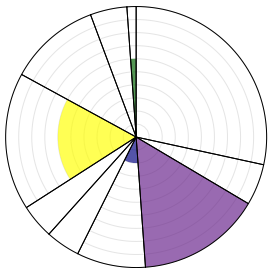
ZnO LH vs HH - piglets@day23- jejunum



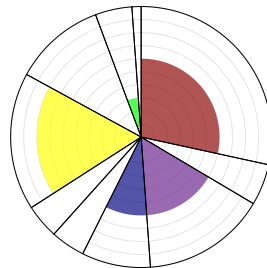
betaglucans maternal - piglets@day1 - ileum



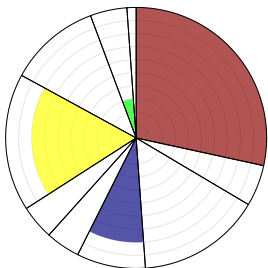
medium chain fatty acids maternal – piglets@day1 – jejunum



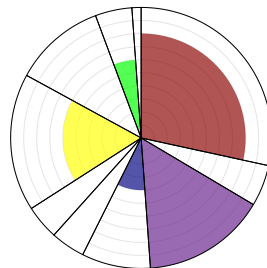
betaglucans maternal – piglets@day31 – ileum



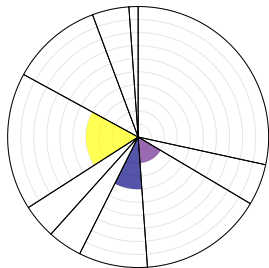
galactooligosaccharide maternal – piglets@day31 – colon



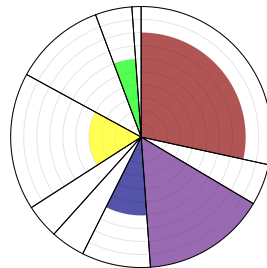
medium chain fatty acids maternal – piglets@day31 – jejunum



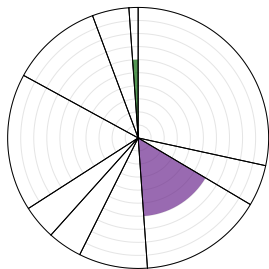
galactooligosaccharide neonatal – piglets@day31 – colon



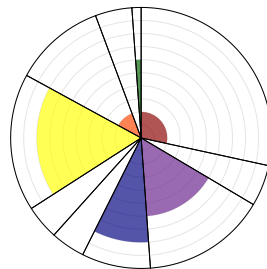
medium chain fatty acids neonatal – piglets@day31 – jejunum



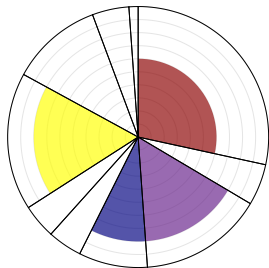
betaglucans neonatal – piglets@day31 – ileum



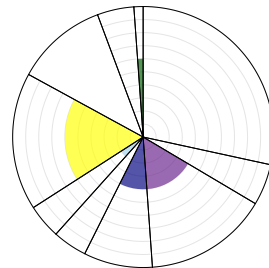
amoxicillin in drinking water – chickens@day14 – jejunum



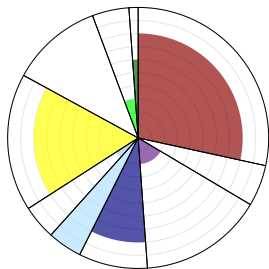
amoxicillin in drinking water – chickens@day5 – jejunum



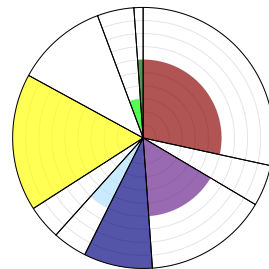
Rye 10% vs 5% – chickens@day21



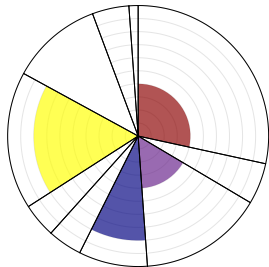
Rye 10% vs 0% – chickens@day21



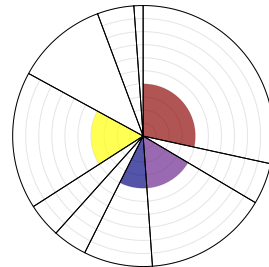
Rye 5% vs 0% – chickens@day21



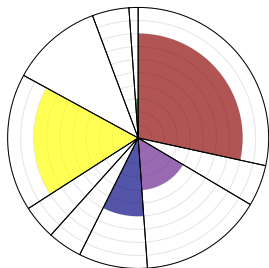
Rye 10% vs 0% – chickens@day28



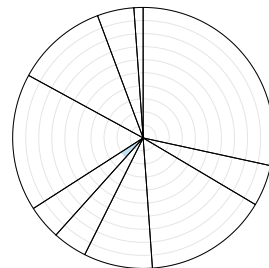
Rye 5% vs 0% – chickens@day28



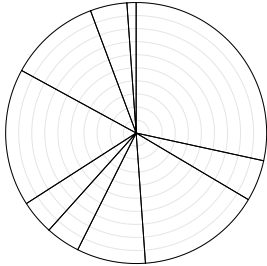
Rye 10% vs 5% – chickens@day28



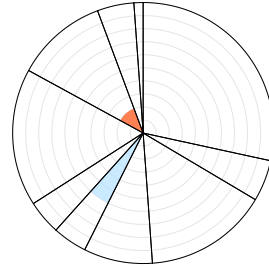
lysozyme – chickens@day28 – jejunum



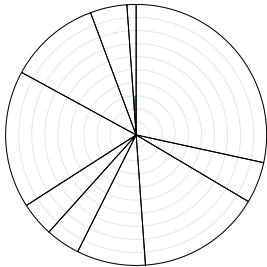
quercetin – chickens@day28 – jejunum



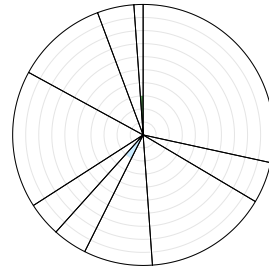
oathulls – chickens@day28 – jejunum



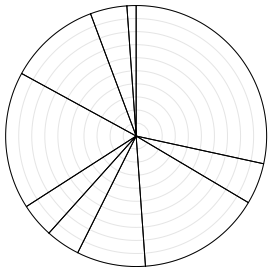
betaglucans – chickens@day28 – jejunum



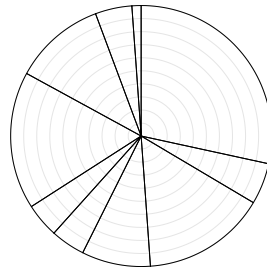
fish oil – chickens@day28 – jejunum



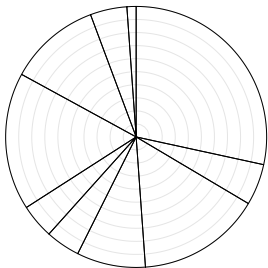
lysozyme – chickens@day28 – ileum



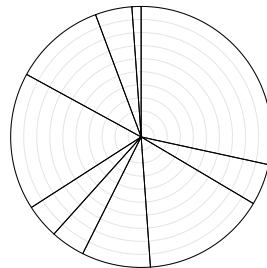
betaglucans – chickens@day28 – ileum



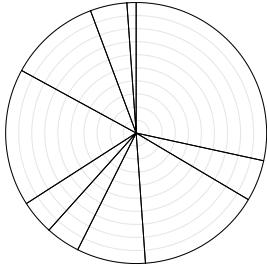
quercetin – chickens@day28 – ileum



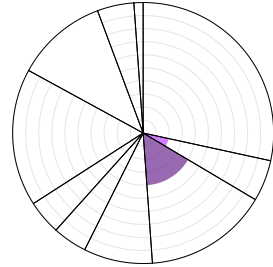
oathulls – chickens@day28 – ileum



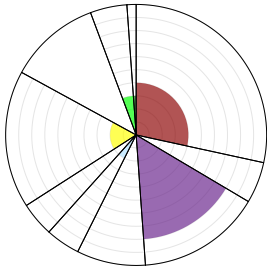
fish oil – chickens@day28 – ileum



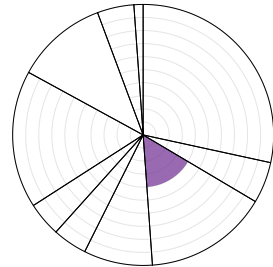
betaglucans – chickens@day7 – jejunum



antibiotics – chickens@day7 – jejunum

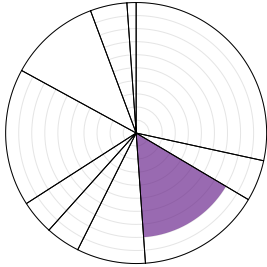


butyrate – chickens@day7 – jejunum

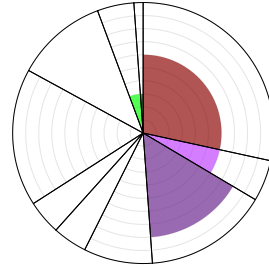




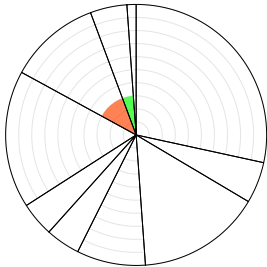
rye 25% - chickens@day7 ~ jejunum



jejenum.1-jejenum.2 - calves@day ~ jejunum



lung.1-lung.2 - calves@day ~ lung



To explore  
the potential  
of nature to  
improve the  
quality of life



---

Wageningen Livestock Research Postbus 338  
6700 AH Wageningen  
T 0317 48 39 53  
E [info.livestockresearch@wur.nl](mailto:info.livestockresearch@wur.nl) [www.wur.nl/  
livestock-research](http://www.wur.nl/livestock-research)

Wageningen Livestock Research ontwikkelt kennis voor een zorgvuldige en renderende veehouderij, vertaalt deze naar praktijkgerichte oplossingen en innovaties, en zorgt voor doorstroming van deze kennis. Onze wetenschappelijke kennis op het gebied van veehouderijsystemen en van voeding, genetica, welzijn en milieu-impact van landbouwhuisdieren integreren we, samen met onze klanten, tot veehouderijconcepten voor de 21e eeuw.

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen 9 gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research en Wageningen University hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.500 medewerkers en 10.000 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

