

**MICROBIËLE ECOLOGIE
VAN HET MAAG-DARMKANAAL
VAN LANDBOUWHUISDIEREN**

NRLO-rapport nr. 95/6

Verkennde studie uitgevoerd door:

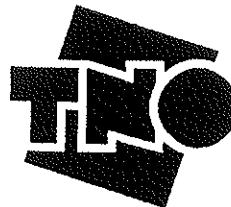
Dr. R. Havenaar

TNO Voeding, Divisie Agro-Technologie en Microbiologie (thans werkzaam bij de
Afdeling Fysiologie en Kinetiek)

in opdracht van:

NRLO, Den Haag

TNO-Voeding, Zeist



Nationale Raad voor
Landbouwkundig Onderzoek
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
tel.: 070-3793653/3793694

juni 1995

Voorwoord

In het maagdarmkanaal van landbouwhuisdieren bevindt zich een dichte populatie micro-organismen. Deze microflora leeft in intensief contact met de gastheer en speelt een belangrijke rol bij het functioneren van die gastheer. De microflora is actief in het verteringsproces en heeft daarmee kwalitatieve en kwantitatieve effecten op de voedingsstoffen die de gastheer uit het darmkanaal kan opnemen. Op deze wijze kan ook een invloed uitgaan op de productie van de dieren, bijv. op de groei en de melksamenstelling.

De microflora speelt ook een belangrijke rol in de resistentie tegen infectieziekten (kolonisatieresistentie) en de wering van pathogenen waarmee eindprodukten besmet kunnen raken, zoals Salmonella.

Om deze redenen kan het interessant zijn om de microflora in een gewenste richting te beïnvloeden. Een belangrijke handicap hierbij is het ontbreken van fundamenteel inzicht in de werkingsmechanismen. Binnen het landbouwkundig onderzoek loopt thans weinig onderzoek op het gebied van de microbiologie van het maagdarmkanaal van landbouwhuisdieren.

Vanuit deze optiek hebben de NRLO en TNO Voeding gezamenlijk opdracht verleend voor de uitvoering van een verkennende studie. De studie is uitgevoerd door Dr. R. Havenaar, werkzaam bij TNO Voeding te Zeist. De doelstellingen van deze studie, zoals geformuleerd bij de start van het project in 1991 luiden:

- wat zijn de eigenschappen van een gewenste darmflora;
- wat is kolonisatie-resistentie;
- wat is de rol van de immunologische factoren;
- wat zijn de werkingsmechanismen (of hypothesen) en toepassingsmogelijkheden van probiotica en gefermenteerd voer in relatie tot de gezondheid van het dier, de kwaliteit, veiligheid en kwantiteit van het produkt.

In het eindrapport, dat voor u ligt, ligt het accent op de inventarisatie van beschikbare en ontbrekende kennis. Deze inventarisatie heeft plaatsgevonden op basis van literatuur en meningen van deskundigen in binnen- en buitenland. Het belang van een intensivering van het onderzoek op het gebied van de microbiële ecologie wordt door de bevindingen in het rapport onderstreept.

De vorming van hypothesen over mechanismen achter de beïnvloeding van de darmflora en over de relatie darmflora-gastheer bleek in het kader van deze studie niet haalbaar. De aan-grijpingspunten voor het fundamenteel-strategisch onderzoek blijven daarmee enigszins onderbelicht.

Het rapport mondt uit in concrete aanbevelingen betreffende het meer toegepaste onderzoek op het gebied van probiotica en betreffende de structuur voor organisatie en financiering van dit onderzoek. Deze zullen ter discussie worden gesteld in een workshop die aansluitend op het verschijnen van het rapport zal worden georganiseerd.

Wij hopen dat de aandacht voor dit in vele opzichten belangrijke onderzoekerrein hiermee een nieuwe impuls heeft gekregen.

Dr.Ir. A.P. Verkaik,
Directeur Bureau NRLO .

Prof.Dr. P.J. van Bladeren,
TNO-Voeding

Inhoudsopgave

	blz.
1 Inleiding	1
2 Doelstelling	2
3 Eigenschappen van een gewenste darmflora	3
3.1 Algemeen	3
3.2 Kolonisatieresistentie	4
3.3 Immunologische factoren	5
4 Invloed van probiotica op de microbiële ecologie	6
4.1 Probiotica en KR-flora	6
4.2 Monogastrische zoogdieren	6
4.3 Herkauwers	9
4.4 Pluimvee	10
5 Invloed van probiotica op de immunestatus	12
6 Invloed van voedingscomponenten op de microbiële ecologie	14
7 Kwaliteit en veiligheid van probiotica	16
8 Toelating van probiotica	18
9 Kostenaspect van probiotica	19
10 Onderzoekmethodieken en -modellen	20
10.1 Mogelijkheden en beperkingen van onderzoekmethodieken	20
10.1.1 Klassieke kweekmethodieken	20
10.1.2 Beeld-analyse en flow-cytometrie	21
10.1.3 Moleculaire methodieken	21
10.2 Mogelijkheden en beperkingen van onderzoekmodellen	22
10.2.1 <i>In vitro</i> modellen	22
10.2.2 Geïsoleerde dierlijke cellen en orgaansystemen	23
10.2.3 Diermodellen	23

11	Probiotica en gezondheidsvoeding bij de mens	25
12	Conclusies	26
12.1	Varkens en kalveren	26
12.2	Melkveehouderij	27
12.3	Pluimveehouderij	28
13	Voorgestelde onderzoeksrichting	29
13.1	Stabiele natuurlijke darmflora bij varkens en kalveren	29
13.2	Pluimveehouderij	30
14	Samenwerkingsverbanden en financiering	31
	Referenties	33

1 Inleiding

In het maag-darmkanaal van mens en dier bevindt zich een complexe microflora die een belangrijke rol speelt bij onder andere de verteringsprocessen en de afweer van het dier tegen het binnendringen van (pathogene) kiemen. Indien de microflora zich onvoldoende kan ontwikkelen of ernstig wordt verstoord neemt de functionaliteit van de microflora af, hetgeen tot ziekte en produktieverliezen kan leiden.

Door het verstrekken van middelen met (levende) micro-organismen, zogenaamde probiotica, tracht men de samenstelling en activiteit van de microflora te verbeteren. Hoewel er wetenschappelijke gegevens beschikbaar zijn die aangeven dat bepaalde micro-organismen een gunstig effect zouden hebben op de gezondheid (preventief en curatief), betekent dit niet dat alle op de markt zijnde probiotica functioneel zijn.

Er is behoefte aan voorwaarden waaraan een probioticum zou moeten voldoen en aan (*in vitro*) testmethoden om te onderzoeken of het produkt aan deze voorwaarden voldoet. Een belangrijk nadeel hierbij is dat fundamenteel inzicht ontbreekt over de mogelijke werkingsmechanismen van probiotica.

Onderbouwing van kennis op het gebied van de toepassing van micro-organismen ter verbetering van de darmflora van landbouwhuisdieren kan worden geleverd vanuit de disciplines microbiële -ecologie, -fysiologie en -biochemie in relatie tot de fysiologie van de gastheer. Zowel in humaan als in veterinair onderzoek wordt (ook in Nederland) aandacht besteed aan de microbiologie van het maag-darmkanaal. Het is van belang de aanwezige expertise op dit gebied, in Nederland maar ook daarbuiten, in kaart te brengen. Hierbij zou dan tevens de mening van experts gevraagd moeten worden.

In gesprekken met de veevoederindustrie en de farmaceutische industrie komt naar voren dat het steeds moeilijker wordt om (nieuwe) antibiotica toe te passen. Dit geldt zowel voor therapeutische als groeibevorderende toepassing. Voor de registratie wordt steeds sterker gelet op effectiviteit, residuen en milieu effecten. Het overheidsbeleid is gericht op een restrictief en selectief gebruik van antibioticum en diergeneesmiddelen in het algemeen. Indien andere produkten zoals probiotica effectief kunnen worden ingezet ter vervanging antibiotica, met name ter genezing en preventie van maag-darminfecties en als groeibevorderaar, kan dit een extra stimulans betekenen voor verder onderzoek naar duurzame methoden en produkten ter bevordering van de gezondheid van landbouwhuisdieren, zowel vanuit de industrie als de overheid.

De toepassing van deze methoden en produkten zou in een totaal beleid moeten worden ingebed. Een beleid gericht op het terugdringen van antibiotica, hygiënische maatregelen op de veehouderijbedrijven, tijdens transport en slacht, preventie van insleep van pathogenen, gebruik van probiotica en prebiotica.

2 Doelstelling

De doelstelling van dit onderzoek is om de aanwezige (fundamentele) kennis op het gebied van de microflora van het maag-darmkanaal in brede zin in kaart te brengen, alsmede inzicht te krijgen in de mening van deskundigen op dit gebied. Dit moet niet alleen leiden tot inzicht in de bestaande kennis (positieven en negatieve resultaten) maar tevens tot het identificeren van ontbrekende (fundamentele) kennis waaraan onderbouwend onderzoek noodzakelijk wordt geacht. Tevens zou inzicht moeten worden verkregen op welke wijze coördinatie van onderzoek kan worden uitgevoerd om ontbrekende fundamentele kennis efficiënt aan te vullen.

De kernvragen bij deze inventarisatie zijn:

- a. wat zijn de eigenschappen van een gewenste darmflora;
- b. wat is kolonisatie-resistentie;
- c. wat is de rol van de immunologische factoren;
- d. wat zijn de werkingsmechanismen (of hypothesen) en toepassingsmogelijkheden van probiotica en gefermenteerd voer in relatie tot gezondheid van het dier, de kwaliteit, veiligheid en kwantiteit van het produkt.
- e. welke onderzoek-methodieken (*in vivo* of *in vitro*) zijn beschikbaar of in ontwikkeling om eigenschappen van de darmflora en probiotica te onderzoeken.

Deze kernvragen zijn tijdens het onderzoek nader uitgewerkt. In dit verslag is gebruik gemaakt van literatuurgegevens, die deels ook zijn verwerkt in overzichtsartikelen van de auteur (artikelen en literatuurlijst kunnen worden opgevraagd). Het accent ligt echter sterk op gegevens en meningen die niet zijn gepubliceerd maar die zijn verkregen uit gesprekken met onderzoekers en andere deskundigen.

3 Eigenschappen van een gewenste darmflora

3.1 Algemeen

Het wordt algemeen onderkend dat de natuurlijke microflora in de darm belangrijke functies heeft voor de gastheer. Deze zijn onder andere: participatie in het metabolisme, produktie van actieve componenten (enzymen, vitaminen), detoxificatie van componenten en metabolieten, recirculatie van galzuren, kolonisatie resistentie (zie § 3.2) en immunogene functies (zie § 3.3).

Voor het uitoefenen van deze functies moet de microflora de gelegenheid hebben om zich te ontwikkelen tot een complexe en stabiele samenstelling die passend is voor de diersoort en de lokatie in het maag-darmkanaal. De samenstelling wordt bepaald door de specifieke lokale omstandigheden in het maag-darmkanaal. Deze ontstaan door interacties tussen de gastheer en zijn omgeving. Dit betekent, dat de samenstelling van de darmflora sterk kan/zal worden beïnvloed door interne factoren van de gastheer (bij voorbeeld maag-darmsecretie) en externe factoren, zoals de micro-organismen in de omgeving en voedingscomponenten in het rantsoen.

Voor pasgeborenen is het derhalve belangrijk om direct in contact te komen met een 'gezonde' microflora van de ouderdieren en om voeding op te nemen die de ontwikkeling van deze microflora stimuleert. Ook de overgang van melkvoeding naar vast voedsel moet zodanig verlopen dat de darmflora zich geleidelijk hierbij kan aanpassen. Slechts onder deze omstandigheden zal zich een autochtone microflora ontwikkelen die zijn functies optimaal kan uitvoeren.

Onder de zoötechnische omstandigheden van de moderne veehouderij is onvoldoende aandacht besteed aan de ontwikkeling van een natuurlijke darmflora. Kuikens hebben helemaal geen contact meer met hun ouderdieren; kalveren en biggen worden vaak zeer vroeg gespeend, gepaard gaande met onvoldoende contact, snelle overgang naar vast voedsel en stress. Het is niet ondenkbaar dat zich hierdoor een aan de omstandigheden aangepaste microflora heeft ontwikkeld die qua samenstelling niet optimaal is, waardoor de functies niet optimaal kunnen worden uitgeoefend.

De kernvraag is echter: wat is de samenstelling en microbiële activiteit van een goede, stabiele darmflora? In feite is dit niet bekend. Door de complexiteit in combinatie met de diersoort- en locatie-specificiteit is dit een zeer moeilijk terrein. Op basis van onderzoeksgegevens over de samenstelling en metabole activiteit (microbiële enzymen, vetzuur en gas produktie) van de fecesflora bij gezonde mensen en de feces- en darmflora van dieren bestaat een globale indruk van de 'normale' microflora. De samenstelling van de microflora is daarbij opgesplitst in groepen micro-organismen (meestal 'genus' niveau, soms 'speciës' niveau). Veranderingen en verschillen binnen deze groepen zijn dan niet vast te stellen. Dit is echter wel van belang, omdat één groep, en soms zelfs één soort, zeer

heterogeen kan zijn (DNA-DNA-hybridizatie techniek, plasmid-patroon) en verschillen, respectievelijk veranderingen binnen groepen micro-organismen zijn waargenomen afhankelijk van locatie in de darm (crypt/villi) en leeftijd van de dieren. Bovendien, als de microflora is vastgesteld op basis van fecesmonsters geeft dit een beperkte afspiegeling van de werkelijke samenstelling en activiteit op de verschillende lokaties in de (dikke) darm.

Als parameter voor een goede, stabiele darmflora is bij proefdieren gekeken naar de kolonisatie resistentie tegen nieuwe serotypen *E. coli*. Dit lijkt een betere parameter dan bijvoorbeeld de globale samenstelling van de microflora en/of de produktie van vetzuren. De toepassing hiervan is echter beperkt, omdat het niet specifiek gaat om enteropathogene *E. coli* serotypen.

3.2 Kolonisatieresistentie

Een belangrijke functie van de darmflora is de kolonisatie resistentie (ook genoemd 'competitieve uitsluiting'). Dit betekent dat een gestabiliseerde microflora, zoals in de darm, in staat is om de vestiging van (potentieel) pathogene micro-organismen te onderdrukken. Uiteraard is dit geen absoluut begrip. De effectiviteit van de kolonisatie resistentie hangt nauw samen met de condities in de gastheer, de (complexe) samenstelling van de microflora en de virulentie van het pathogene agens. Maar, dat de autochtone microflora van met name de uro-genitaal tractus en de darm deze eigenschap bezitten is met zekerheid vastgesteld.

Ten aanzien van de mechanismen van kolonisatie resistentie door de 'normale' microflora bestaat weinig gefundeerde wetenschappelijke kennis. Verschillende mechanismen worden omschreven, zoals lage redox potentiaal, competitie om nutriënten, bezetting van niches, produktie van metaboliëten (vetzuren, bacteriocines), beïnvloeding opbouw en turnover van mucosa cellen, en modulatie van het immuunsysteem (§ 3.3). Mogelijk spelen interacties tussen deze mechanismen een rol, waarbij de individuele inbreng van elk van deze mechanismen zeer moeilijk is vast te stellen.

Onder bepaalde omstandigheden kan de (opbouw van de) darmflora worden verstoord (zie § 3.1), waardoor de kolonisatie resistentie vermindert. In eerste instantie zouden de zoötechnische condities zodanig moeten zijn, dat zich een volwaardige darmflora kan ontwikkelen. Indien dat niet (volledig) mogelijk is, zou met behulp van probiotica de microflora aangevuld kunnen worden. Probiotica zouden ook bevorderlijk kunnen zijn ten aanzien van de snelheid van opbouw en/of herstel van een complexe microflora (b.v. na stress situaties).

Een belangrijk kenmerk van een goede darmflora is de specificiteit van de micro-organismen ten aanzien van de diersoort, de locatie in de darm en mogelijk de leeftijd van de dieren. Dit zou kunnen betekenen dat een probioticum micro-organismen moet bevatten die 'passend' zijn voor een bepaalde diersoort en mogelijk voor een specifieke levensfase.

In een inventariserend onderzoek naar de ontwikkeling van de mucosa-geassocieerde

bacterieflora in de dunne darm van biggen kwam naar voren dat de microbiële ecologie gedurende de periode direct na het spenen zeer kwetsbaar is. De lactobacillen namen in aantallen sterk af in combinatie met een sterke toename van het aantal coliforme bacteriën. Samenstelling en toepassing van probiotica bij de big zou dus primair gericht moeten zijn op deze kritische fase.

Toediening van specifiek geselecteerde *Lactobacillus* stammen aan biggen rond het spenen toonde aan, dat hiermee deze kritieke fase overbrugd kon worden: de aantallen *Lactobacillus* bleven stabiel, waarbij de aantallen coliforme bacteriën sterk gereduceerd bleven.

3.3 Immunologische factoren

Een ander belangrijk kenmerk van de darmflora is de invloed op het immuunsysteem, hetgeen mede een rol kan spelen bij de kolonisatie resistentie. De darm bezit een humoraal en cellulair immuunsysteem dat enerzijds de darmflora beïnvloedt, en anderzijds zelf wordt beïnvloed door de microflora. Uit onderzoeken met kiemvrije dieren is vastgesteld dat zonder microflora het immuunsysteem nauwelijks wordt geactiveerd. Toediening van een darmflora stimuleert onder andere de differentiatie van lymfocyten en activatie van fagocyten, verhoging van de produktie van gamma-globulinen. Bij verdere modulatie van het immuunsysteem kan mogelijk de translocatie van micro-organismen via de darmwand naar de mesenteriale lymfeknopen, de milt en de lever een rol spelen.

Er wordt verondersteld, dat de immuun-competente cellen van de darm worden geactiveerd en kunnen worden getransporteerd naar andere mucosale gebieden. Hierdoor zouden immuun-activerende darmbacteriën tevens een rol kunnen spelen in de immunologische afweer tegen bij voorbeeld luchtweginfecties.

4 Invloed van probiotica op de microbiële ecologie

4.1 Probiotica en KR-flora

Probiotica kunnen worden omschreven als produkten die één of meer levende micro-organismen bevatten (meestal bacteriën en/of gisten) en die worden toegediend aan mens of dier (bijvoorbeeld via de voeding) teneinde de gezondheid van de gastheer gunstig te beïnvloeden door 'verbetering' van de natuurlijke microflora. Deze gezondheids-beïnvloeding is meestal gericht op het maag-darmkanaal en de aanwezige darmflora. Echter, deze kan ook gericht zijn op de lucht- of urogenitaalwegen en de daar aanwezige natuurlijke microflora.

Volgens deze omschrijving kunnen ook produkten die bestaan uit een complexe microflora waarvan de samenstelling niet precies bekend is, zoals coecum-homogenaten, tot de probiotica worden gerekend. Dit wordt echter meestal niet zo ervaren. In geval van coecum-homogenaten of (verduningen) van darminhoud wordt gesproken over kolonisatie resistente flora (KR-flora). Dit is vergelijkbaar met 'normalisatie' van kiemvrije proefdieren door middel van complexe, pathogeen-vrije microflora's van volwassen dieren, met als doel de proefdieren resistent te maken tegen de kolonisatie van pathogene micro-organismen. De toepassing van een KR-flora vindt vooral plaats bij pluimvee (zie § 4.4).

Een ander verschil tussen probiotica en KR-flora's is, dat probiotica in het algemeen gedurende een bepaalde periode dagelijks wordt gegeven, terwijl een KR-flora meestal maar eenmalig wordt toegediend.

Ten aanzien van de stellen criteria waaraan probiotica moeten voldoen is frequent overleg gevoerd met onderzoekers en vertegenwoordigers van de industrie. Probiotica moeten aantoonbaar effectief zijn bij een bepaalde diergroep of diersoort (§ 4.2, 4.3, 4.4 en 5) maar moeten ook voldoen algemene kwaliteits- en veiligheidseisen (§ 8), die bij aanmelding van nieuwe produkten in een dossier dienen te worden aangetoond.

4.2 Monogastrische zoogdieren

In het onderzoek naar de effectiviteit van probiotica werd in het verleden uitsluitend gekeken naar de invloed op de groei en voederconversie (voornamelijk varken). Later werd ook enige aandacht besteed aan de gezondheid van de dieren, zoals het voorkomen van maag-darmstoornissen. Onderzoek naar de samenstelling van de darmflora onder invloed van probiotica is slechts beperkt uitgevoerd. De microbiologische analyses zijn daarbij voornamelijk gericht op enteropathogene micro-organismen en veel minder op de totale microbiële ecologie.

Met betrekking tot commerciële probiotica is vooral onderzoek uitgevoerd met 'stabiele' produkten. Dat wil zeggen, produkten waarbij de micro-organismen levensvatbaar blijven gedurende een bewaarperiode van enkele maanden en minimaal in redelijke mate (meer dan

10-25%) het pelleteerproces van voeder kunnen overleven. Dit betekent, dat is gewerkt met *Bacillus* sporen (*Bacillus toyoi*, *Bacillus licheniformis* en *B. subtilis*) en *Streptococcus* cellen (*Enterococcus faecium*). Door deze selectie zijn commerciële probiotica met 'gevoelige' *Lactobacillus* stammen niet of nauwelijks onderzocht.

Met genoemde producten zijn in Nederland laboratorium- en dierproeven, alsmede veldexperimenten uitgevoerd, vooral gericht op de toepassing bij varkens, in veel mindere mate bij konijnen (in Frankrijk zijn meer onderzoeken bij konijnen uitgevoerd). In de laboratoriumproeven is met name gekeken naar de overleving, vermeerdering en interacties van deze bacteriën onder gesimuleerde darmcondities. Deze resultaten zijn daarna vergeleken met kolonisatie- en challenge-experimenten in (gefistuleerde) biggen. Uit deze onderzoeken komt naar voren dat (a) *B. toyoi* zich noch kan vermeerderen, noch kan koloniseren in de darm, (b) *Ent. faecium* zich wel kan vermeerderen maar niet kan koloniseren in de darm, en (c) beide probiotica geen invloed hebben op de kolonisatie van *Escherichia coli* en op de symptomen van een (kunstmatige) infectie met enteropathogene *E. coli* stammen. Op basis van deze *in vitro* en *in vivo* experimenten konden wel criteria worden geformuleerd voor de selectie van bestaande of nieuw te ontwikkelen probiotica.

Diverse veldproeven bij biggen en kalveren, uitgevoerd door verschillende Nederlandse onderzoeksinstituten en bedrijven (onder andere uitgevoerd bij probleembedrijven), gaven wisselende resultaten. In enkele gevallen leek een probioticum een positieve bijdrage te leveren aan de gezondheid van de dieren, in de meeste gevallen waren de resultaten neutraal of zelfs negatief. Dit geldt ook voor gepubliceerd onderzoek met betrekking tot groei en voederconversie onder praktijkomstandigheden. De wisselende resultaten worden mede verklaard doordat de experimenten onder sterk variabele omstandigheden werden uitgevoerd: met of zonder (hoog) koper gehalte, met of zonder verschillende groeibevorderende antibiotica, goede of slechte hygiëne, ongecontroleerde kwaliteit van de probiotica (soort en vitaliteit van de micro-organismen onvermeld), etc.

Navraag bij buitenlandse onderzoeksinstituten leverde gelijklopende resultaten op. Deze resultaten zijn/worden echter niet gepubliceerd. De fabrikant wijst op positieve gepubliceerde resultaten. De indruk bestaat echter dat er veel meer niet gepubliceerde neutrale/negatieve resultaten bestaan. De fabrikant van een produkt met *Ent. faecium* gaf als commentaar op de negatieve resultaten van de challenge-proef, dat het aantal bacteriën in het voeder (bereid volgens voorschrift van de leverancier) wellicht te laag was voor een preventief/curatief effect op een *E. coli* infectie.

Voor goede vergelijking en reproduceerbaarheid van resultaten is onderzoek nodig onder gecontroleerde en gestandaardiseerde omstandigheden.

Uit Nederlands onderzoek bij konijnen kon geen positief effect van probiotica worden vastgesteld. Dit had echter mede (voornamelijk?) te maken met het feit dat ook de controle dieren onvoldoende ziekteverschijnselen vertoonden.

Naast bovengenoemde probiotica zijn onderzoeken uitgevoerd met andere micro-organismen, gistcellen en geselecteerde *Lactobacillus* stammen, met als doel nieuwe probiotica te ontwikkelen.

Een challenge experiment bij biggen met *L. plantarum* en gistcellen verliep negatief. De symptomen na een infectie met enteropathogene *E. coli* stammen waren zeker niet minder ernstig in de testgroepen dan die in de controlegroep.

Een andere serie proeven werd uitgevoerd met *Lactobacillus* stammen, die waren geïsoleerd van de darmmucosa van biggen en vervolgens geselecteerd op basis van *in vitro* experimenten. De lactobacillen bleken in staat zich in de darm van biggen te koloniseren en in de kritische fase rond het spenen het aantal *E. coli* te onderdrukken. Challenge experimenten met combinaties en monoculturen van deze *Lactobacillus* stammen toonden aan, dat deze bacteriën tevens in staat zijn om de gevolgen (symptomen, intercurrente sterfte) van een kunstmatige infectie met enteropathogene *E. coli* te onderdrukken. Deze stammen lijken de kolonisatie resistentie van de darmflora te verhogen. Het mechanisme is niet achterhaald, derhalve is het niet bekend in hoeverre competitie tussen gunstige en schadelijke bacteriën een rol speelt, dan wel stimulatie van het immuunsysteem. Sommige probiotica lijken de groei en voederconversie van dieren te bevorderen. Er is echter geen relatie vastgelegd tussen groeibevordering en de gezondheid of de weerstand van de dieren. Laboratorium onderzoeken toonden aan dat de gevoeligheid van probioticumstammen voor groeibevorderende voederadditieven, zoals antibiotica en koper, een grote rol kan spelen in de effectiviteit van probiotica. Vele *Lactobacillus* stammen worden geremd door een hoog koper gehalte en door bepaalde antibiotica. Hoewel onder *in vitro* omstandigheden deze stammen resistent gemaakt konden worden, is in dit kader de discussie essentieel of probiotica nu moeten worden toegepast naast of in de plaats van groeibevorderende voederadditieven (zie § 7).

Een andere benadering van het probiotisch effect van *Lactobacillus* is door gebruik te maken van fermentatie van het voeder. Bij vleesvarkens is een Nederlands onderzoek uitgevoerd naar het effect van fermentatie van slachtbijprodukten door *L. plantarum* (na voorafgaande verhitting tot 90°C). Hierbij is met name gekeken naar de bedrijfsresultaten en de onderdrukking van enteropathogenen in de darm. De productie technische resultaten van de varkens waren significant beter dan die van de dieren op controle voeder. De dieren vertoonden een lagere incidentie van diarree. De aantallen Enterobacteriaceae (*E. coli* en *Salmonella*) waren lager dan in de controle groep. De darminhoud vertoonde geen verandering in aantallen *Campylobacter*. Uit deze experimenten is niet met zekerheid te concluderen of de resultaten zijn toe te schrijven aan de bacteriën alleen, dan wel aan de combinatie van het gefermenteerde produkt en de bacteriën.

Zowel literatuurgegevens (onderzoek bij mensen en proefdieren; zie ook immunologie) als bovenstaande onderzoeken geven krachtige aanwijzingen dat bepaalde *Lactobacillus* stammen een probiotische activiteit bezitten. Desondanks zijn in de veehouderij geen

wetenschappelijk verantwoorde studies onder praktijkomstandigheden uitgevoerd. De belangrijkste (enige?) reden is wel het verlies aan vitaliteit van deze groep micro-organismen onder praktische bewaar- en mengcondities. Zowel in Nederland als in het buitenland is aandacht besteed aan dit bezwaar. Onderzoeken naar inhullingstechnieken hebben niet de benodigde stabiliteit opgeleverd. Dit betekent dat een probioticum met *Lactobacillus* niet onder standaard condities kan worden gemengd door het voer en zeker niet kan worden gepelleteerd. Andere wijzen van toediening moeten dus worden gezocht en geaccepteerd om met lactobacillen te kunnen werken. Alternatieve methodieken kunnen onder andere zijn: als poeder strooien over het voeder, vermengen in vers bereide (gefermenteerde) slobber, sprayen bij jonge dieren, via het drinkwater. Deze methoden brengen met zich mee dat het intensievere arbeid vergt dan gemengd door het voer. De functionaliteit van probiotica met lactobacillen moet dus opwegen tegen dit nadelig effect.

4.3 Herkauwers

Het onderzoek naar het effect van probiotica bij herkauwers is vooral gericht (geweest) op het effect van gisten (*Saccharomyces cerevisiae* stammen) op de melkgift. Reeds in de dertiger jaren is op dit gebied onderzoek uitgevoerd in Nederland. Daarna heeft het in Nederland geen wezenlijke aandacht meer gekregen, behoudens kleine laboratorium testen en een klein onderzoek bij koeien (met een negatief resultaat). Een produkt met *Saccharomyces* van een Amerikaanse firma is in Nederland geïntroduceerd in samenhang met een aantal symposia. Tijdens deze bijeenkomsten bleek een duidelijke scepsis te bestaan ten aanzien van de effectiviteit van dergelijke produkten.

In Groot Brittannië is door gezamenlijke industrieën en ondersteund door de overheid een langdurig onderzoek uitgevoerd met *Saccharomyces* bevattende produkten. Er is zowel gekeken naar het effect op de bedrijfsresultaten (melkproductie) als naar het werkingsmechanisme. De resultaten waren zeer wisselvallig (produktieveranderingen van -10% tot +20%) en geven de indruk dat op bedrijven met minder goede zoötechnische omstandigheden enig gunstig effect te zien was. Bij navraag bij de onderzoekers naar het werkingsmechanisme werd gezegd dat in eerste instantie werd gedacht dat het te maken had met de microbiële vetzuurproductie in de pens. Thans wordt gesteld dat de gisten de anaërobe condities in de pens verbeteren, waardoor de anaërobe microflora (inclusief anaërobe schimmels) sneller een grotere activiteit heeft. Het werkingsmechanisme blijft hiermee toch nog vaag.

Hoewel door de onderzoekers de gunstige effecten van gisten worden geaccentueerd, wordt de variabiliteit in de resultaten onderkend. In een direkt gesprek worden de gistprodukten zeker niet aanbevolen als bijzondere middelen om de bedrijfsproblemen curatief of preventief op te lossen, dan wel om de bedrijfsresultaten te verbeteren. De onderzoekers tonen 'tussen de regels' begrip voor de Nederlandse scepsis voor dit soort produkten.

4.4 Pluimvee

Voor pluimvee geldt een andere uitgangssituatie dan voor de zoogdieren: door invoering van de broedmachine is een absolute scheiding ontstaan tussen moederdier en kuiken. Hierdoor is de overdracht van de natuurlijke microflora op de jonge dieren volledig verdwenen. Dit betekent dat de kuikens na het uitkomen worden besmet met micro-organismen uit de directe omgeving van de broedmachine. Door hygiëne kan enerzijds besmetting met potentieel pathogene micro-organismen worden gereduceerd, anderzijds kan zich geen normale darmflora ontwikkelen. Hierdoor is te verwachten dat de dieren een verminderde kolonisatie resistentie hebben, wat hun gevoeligheid voor infecties sterk verhoogt.

Het besmetten van de kuikens direct na het uitkomen met niet-pathogene darmbacteriën is dan ook een goed uitgangspunt (zogenaamde 'Nurmi-concept'). Onderzoek heeft laten zien dat de samenstelling van deze microflora complex moet zijn (hetgeen overeenstemt met resultaten uit 'normalisatie' proeven met kiemvrije proefdieren). Eigenlijk zo complex dat de kuikens besmet moeten worden met homogenaten van blinde darmen van pathogeen-vrije volwassen dieren (KR-flora). Hoewel deze preparaten niet door iedereen als probiotica worden gezien (zie § 4.1), zijn ze wel in dit verslag opgenomen.

Op basis van bovenstaand principe zijn produkten in de handel waarmee in Noord-West Europa veel onderzoek is verricht, zowel op laboratoriumschaal als in praktijk proeven. De resultaten geven aan dat de kuikens een sterk verhoogde kolonisatie resistentie ontwikkelen tegen enteropathogene micro-organismen, zoals *Salmonella*, *Campylobacter* en *Clostridium* speciës. Het produkt heeft als basis een homogenaat van blinde darmen van kippen die vrij zijn van pathogene micro-organismen, daarna vindt een geheim kweekproces plaats en verwerking tot een stabiel produkt met anaërobe bacteriën. De samenstelling is zeer complex en kan per batch variabel zijn.

In Nederland wordt op basis van blinde darm homogenaten door de Gezondheidsdienst voor Pluimvee te Doorn een preparaat gemaakt zonder kweekstap. Uit onderzoek is gebleken dat bepaalde typen micro-organismen aanwezig moeten zijn in het homogenaat om een optimale kolonisatie resistentie te verkrijgen. Dit homogenaat kan zowel preventief als curatief worden gebruikt tegen enteropathogenen. Bij bedrijfsproblemen met *S. enteritidis* kan de besmetting succesvol worden bestreden door (in principe eenmalige) behandeling met dit preparaat na voorafgaande behandeling met antibioticum. Het preparaat is (nog) niet omgezet in een commercieel produkt, mede in verband met de moeilijkheid om het geregistreerd te krijgen (zie § 9). Een ander nadeel wordt gezien in het voorafgaande antibioticum gebruik, in verband met een eventueel milieu belastend effect van het stabiele antibioticum, waardoor resistente micro-organismen zich verspreiden.

In Nederland zijn experimenten bij pluimvee uitgevoerd met een groot aantal verschillende commerciële probiotica preparaten, die lactobacillen, streptococci, gisten en/of bacillus bevatten. Hierbij is gekeken naar de groei van slachtkuikens, de samenstelling van de darmflora en in enkele experimenten naar de preventie van 'zwarte mest' bij kalkoenen. Geen van de preparaten bleek enig effect te hebben op uitval, gewichttoeneming, voederconversie, besmetting met enteropathogenen en de preventie van zwarte darminhoud. Slechts in één Duits onderzoek met *Ent. faecium* door voer en drinkwater, kon enige reductie van een ingebrachte *Salmonella enteritidis* stam met een antibioticum-marker worden gevonden, terwijl 'wilde' salmonella stammen tijdens het experiment aanwezig bleven.

5 Invloed van probiotica op de immuunstatus

In het onderzoek op het gebied van probiotica is vooral de laatste jaren aandacht besteed aan de invloed van *Lactobacillus* species op het immuunsysteem. In de jaren-80 werd in publikaties reeds gewezen op de immunomodulerende effecten van lactobacillen indien deze intraperitoneaal of subcutaan werden ingespoten bij proefdieren. Deze effecten bestonden uit stimulering van de activiteit van macrofagen (verhoogde fagocytose capaciteit en enzym activiteit) en natural killer cells (NK cellen), en een verhoogde productie van circulerende immuunglobulinen. Later kon worden aangetoond dat oraal toegediende *Lactobacillus* en *Bifidobacterium* species eveneens immunomodulerende effecten veroorzaakten. Oraal ingegeven lactobacillen activeerden de immunocompetente cellen van het 'gut associated lymphatic tissue' (GALT) en de productie van immuunglobulinen tegen enteropathogene bacteriën. Hiermee werd de aandacht gevestigd op immunostimulatie door probiotica en als mogelijk werkingsmechanisme van probiotica bij kolonisatie resistentie. Latere onderzoeken bij proefdieren bevestigden de eerder gevonden resultaten en wijzen op een adjuvans effect van lactobacillen ter preventie van enteropathogene infecties. Dit heeft zeker bijgedragen in de recente interesse voor probiotica in relatie tot het immuunsysteem, hetgeen heeft geleid tot onderzoek naar (a) het mechanisme en (b) de mogelijke gunstige effecten van immunostimulatie.

Ad a. Mechanisme van immunomodulatie

Uit dierproeven van Perdigon komt een dosisafhankelijke optimale immuunglobulinen respons naar voren, in de zin dat lactobacillen ook overgedoseerd kunnen worden. Bovendien was het effect op de vorming van sIgA ten opzicht van salmonella kort durend. Studies bij kinderen gedurende een rotavirus infectie toonden aan dat orale toediening van lactobacillen in eerste instantie een niet-specifieke respons gaf van immuunglobuline producerende cellen, gevolgd door een specifieke IgA respons tegen rotavirus. Oraal toegediende lactobacillen lijken dus zowel het humorale als cellulaire immuunsysteem te stimuleren.

Onderzoek naar mechanismen van immunostimulatie door lactobacillen wordt in Nederland slechts beperkt uitgevoerd. Bij TNO zijn *in vitro* modellen in ontwikkeling voor dit onderzoek, worden muizen experimenten uitgevoerd en is een humane studie verricht. De doelstelling is primair gericht op de mens, maar de resultaten kunnen ook worden gebruikt voor landbouwhuisdieren.

Ad b. Mogelijke gunstige effecten van immunomodulatie

Immunostimulatie kan bijdragen in de resistentie tegen infectieziekten. Uit *in vivo* experimenten bleken salmonella en rotavirus infecties een milder en/of korter verloop te hebben door (voorafgaande) orale toediening van lactobacillen. Dit duidt op een probiotisch effect via kolonisatie resistentie van de darmflora of stimulering van het niet-specifieke immuunsysteem.

Onderzoek naar het adjuvans effect van orale lactobacillen vindt in Nederland plaats in diermodellen. Slechts bepaalde lactobacillen stammen induceren een sterk adjuvans effect, resulterend in een verhoogde immuunglobuline titer tegen ingebrachte antigenen (bij voorbeeld pathogene bacteriën). Op basis hiervan wordt ook onderzoek uitgevoerd om lactobacillen te gebruiken als vector voor orale vaccins. Hierbij worden specifieke antigene-determinanten (haptenen) van pathogene micro-organismen gekoppeld aan het oppervlak van lactobacillen. Deze ontwikkelingen vergen nader onderzoek, maar bieden goede mogelijkheden voor mens en dier.

Voor de relatie tussen probiotica en immuunmodulatie bestaat duidelijke interesse bij de (zuivel)industrie in het kader van 'novel foods' en 'functional foods' voor humane toepassingen. Voor de toepassing bij landbouwhuisdieren als preventief en/of therapeutisch middel tegen infectieziekten neemt de (veevoeder- en diergeneesmiddelenindustrie nog een afwachtende houding aan. Als oorzaken hiervoor valt zeker te wijzen op de teleurstellende ervaringen met commerciële probioticum producten (zie § 4.2), alsmede op het onderzoek dat zeker noodzakelijk is voor de ontwikkeling van een effectief produkt. Onderzoek naar immuunversterkende effecten zal in de praktijk ook moeilijk zijn vanwege het grote aantal interne en externe variabelen.

6 Invloed van voedingscomponenten op de microbiële ecologie

Tot de exogene factoren die invloed kunnen uitoefenen op de samenstelling van de darmflora behoort in principe ook de voeding. De relatie tussen de samenstelling van de voeding en de samenstelling van de darmflora bij de mens vormt van oudsher al een onderzoeksgebied. Deze invloed komt het sterkst naar voren bij vergelijking van de fecesflora van baby's die borstvoeding of melkvoeding krijgen. Reeds lang is men op zoek naar de voedingsfactor(en) die *Bifidobacterium* in de darm kan stimuleren (zogenaamde 'Bifido-factor'), omdat dit vaak gekoppeld is aan een gereduceerd aantal schadelijke bacteriën, zoals Enterobacteriaceae. Speciale aandacht gaat hierbij uit naar (fructo-, galacto-) oligo- en polysacchariden. Deze koolhydraten blijken *in vitro* de groei van bepaalde *Bifidobacterium* species te stimuleren. Hoewel ook andere factoren een rol kunnen spelen, zoals ijzer-bindende eiwitten en aan IgA gekoppelde stabiele aminozuren, staan de laatste tijd de door de mens niet- of slecht-verteerbare oligosacchariden sterk in de belangstelling als 'novel food' voor de mens.

Zowel in het inter-universitaire 'VLAG' programma, als in een EU project van TNO in samenwerking met de industrie, wordt onderzoek uitgevoerd naar de functie van deze galacto- en fructo-oligosacchariden in relatie tot de darmfuncties bij de mens (thans ook aangeduid als 'prebiotica'). De Nederlandse industrie heeft veel belangstelling voor deze onderzoeksprojecten.

De darmflora (samenstelling, competitie, hechting, metabolisme) heeft in dit onderzoek eveneens een plaats. Op het programma staan zowel *in vitro* experimenten als kort- en langlopende onderzoeken bij proefpersonen.

Dit onderzoek kan zeker ook van belang zijn voor landbouwhuisdieren: zijn deze oligosacchariden in staat om de darmflora (samenstelling, metabole activiteit) van landbouwhuisdieren positief te beïnvloeden? De veevoederindustrie heeft belangstelling voor dit onderwerp. Echter, nader onderzoek zal eerst een duidelijke indruk moeten geven over de haalbaarheid en de praktische waarde van deze prebiotica. Bijvoorbeeld Amerikaanse onderzoeken met fructo-oligosacchariden bij pluimvee gaven deels positieve resultaten. Onderzoek met andere koolhydraten (zoals lactose bij pluimvee) hebben meestal negatieve, resultaten opgeleverd. Bovendien zullen deze koolhydraten bij herkauwers en bij diersoorten met een complexere en getalsmatig belangrijkere dunne darmflora een andere rol kunnen spelen dan bij mensen.

Indien onderzoek op dit gebied wordt gestart, wordt door de industrie aangegeven dat ook de bacteriële verteerbaarheid (in de dikke darm) hierbij betrokken moet worden, alsmede de relatie tussen endogeen (biomassa) en exogeen eiwit.

Een andere benadering is het gebruik van onverteerbare planten-delen die een bindende capaciteit hebben tot enteropathogene bacteriën. In India wordt een planten-'extract' (mucopolysacchariden) gebruikt van een inlandse weegbree soort (*Plantago ovata*) ter genezing van darmstoornissen bij mensen. Dit produkt (Isphagula husk) is *in vitro*

onderzocht op zijn bindend vermogen ten aanzien van *E. coli*, *Salmonella* en *Vibrio*. Varkens pathogene serotypen van *E. coli* bleken een sterke hechting te vertonen aan dit produkt, in tegenstelling tot *Salmonella*. De hypothese is dat door deze hechting de enteropathogene bacteriën in verhoogde mate worden verwijderd uit de darm en dat hechting aan de darmmucosa wordt gereduceerd. Een produkt in combinatie met electrolyten wordt thans in de praktijk gebruikt bij dieren met diarree.

Voedingscomponenten die een stimulerende invloed hebben op bepaalde gewenste micro-organismen (prebiotica) zouden ook gebruikt kunnen worden in combinatie met een probioticum. Indien deze voedingscomponent de vestiging en vermeerdering van de probioticum stam(men) stimuleert is wellicht een sterker effect van het probioticum te verwachten. De relatie tussen probiotica met voeding(-s componenten) en functionele fysiologische parameters is nog beperkt bestudeerd.

Naast voedingscomponenten die een gunstige invloed kunnen hebben op de darmflora, zijn er mogelijk ook componenten die een negatieve invloed hebben op de activiteit en samenstelling van de darmflora. In het onderzoek naar antinutritieele factoren is vrijwel uitsluitend gekeken naar de nadelige effecten op het dier zelf en de verteerbaarheid van het rantsoen. Nog onvoldoende aandacht is besteed aan het feit of hierbij verstoring van de darmflora een rol van betekenis speelt. Een ander aspect wordt genoemd in § 4.2. Bepaalde voedingscomponenten (koper in varkensvoer, groeibevorderende antibiotica) onderdrukken de groei van probioticum bacteriën.

7 Kwaliteit en veiligheid van probiotica

Zeker vanuit de kant van de gebruikers wordt aangegeven dat er behoefte bestaat aan criteria waaraan commerciële probiotica zouden moeten voldoen. Dit dient zowel de veiligheid als het 'onbeperkt' op de markt verschijnen van nieuwe produkten met slecht onderbouwde claims over de effectiviteit, etc. Juist de claims bij het doeldier moeten wetenschappelijk zijn aangetoond, liefst volgens erkende criteria en onderzoeksmethodieken. Uitsluitend vermelding van theoretische principes en/of praktijkwaarnemingen vermeld in kleurige brochures, zoals thans meestal het geval is, wordt unaniem door onderzoekers en industrie als onvoldoende beschouwd.

Bij kwaliteit en veiligheid van probiotica moet in eerste instantie worden gedacht aan het produkt op zich. Indien het produkt levende micro-organismen bevat moet het minimaal aantal per eenheid worden opgegeven en gedurende de houdbaarheidsperiode aanwezig blijven. Met name in de Verenigde Staten is hiernaar onderzoek uitgevoerd en waren de resultaten zeer slecht. Slechts enkele van de onderzochte produkten bevatten de micro-organismen (lactobacillen stammen) die volgens de verpakking aanwezig zouden moeten zijn. In Nederland zijn de ervaringen niet slecht. De commerciële produkten, onderzocht bij verschillende instellingen, voldeden aan de opgegeven aantallen micro-organismen. Een wezenlijk en algemeen onderkend probleem bij probiotica, vooral de produkten die lactobacillen bevatten, is de houdbaarheid bij opslag en de stabiliteit tijdens het pelleteerproces van voevoeder, waarbij de temperatuur kan oplopen tot 80°C gedurende enkele minuten. Er zijn, ook in Nederlandse onderzoeksinstellingen, vele pogingen ondernomen om de stabiliteit van lactobacillen te verbeteren, echter nog steeds zonder praktisch relevant resultaat (zie § 4.2).

Een probioticum mag ook geen andere micro-organismen bevatten dan die welke worden opgegeven. Slechts in een uitzonderingsgeval is verontreiniging geconstateerd.

Een complex kwaliteitscriterium is de functionaliteit en effectiviteit van een probioticum. Duidelijk moet worden aangegeven onder welke omstandigheden, bij welke diersoort(en), welke effecten verwacht mogen worden van het gebruik van het produkt. Onderscheiden zou kunnen worden: groei- en/of productie verbetering, preventieve en/of curatieve werking tegen met name genoemde pathogenen, stimulatie van het immuunsysteem, etc. Deze claims moeten worden aangetoond in ondubbelzinnige, reproduceerbare onderzoeken, zo mogelijk uitgevoerd volgens een standaard protocol. Vooraf alle criteria hiervoor vastleggen is echter niet goed mogelijk. Op basis van *in vitro* en *in vivo* experimenten is wel een aanzet gegeven om een beslisboom op te stellen voor algemene criteria waarop probiotica kunnen/moeten worden onderzocht alvorens specifieke criteria te onderzoeken in dierproeven (Tabel 1). Van elk produkt zou het dossier getoetst moeten worden, vergelijkbaar met (dier)geneesmiddelen (zie § 8).

Een aspect van andere aard is de veiligheid voor het doeldier. Er van uitgaande dat de probioticum stam op zich een a-pathogeen micro-organisme is, kunnen toch drie mogelijke nadelige effecten worden genoemd: (a) ongewenste verstoring van de autochtone microflora; (b) ongewenste immunoreacties; (c) vestiging van het micro-organisme na translocatie op ongewenste plaatsen in het lichaam.

Ad a.

Ongewenste verstoring van de autochtone microflora wordt in de literatuur niet vermeld. Er bestaan echter ongepubliceerde resultaten van onderzoeken die een negatief effect laten zien op de gezondheid van het dier gedurende de toepassing van (in ontwikkeling zijnde) probiotica tijdens challenge-experimenten, ondanks het feit dat de micro-organismen op zich als niet-virulent beschouwd moeten worden. Het is mogelijk, dat dit zijn oorsprong vindt in verstoring van de natuurlijke microflora, waardoor de weerstand van het dier is aangetast en het vatbaarder is geworden voor de challenge.

Ad b.

In dierproeven, gericht op onderzoek naar het immunomodulerende effect van lactobacillen, zijn aanwijzingen gevonden dat een (te) hoge dosis lactobacillen een overmatige ontstekingsreactie kan veroorzaken. De exacte betekenis is nog onduidelijk.

Ad c.

Hoewel lactobacillen een lange historie van veilig gebruik kennen, wordt op basis van literatuur gegevens toch op mogelijke risico's gewezen, zeker in het geval predisponerende factoren aanwezig zijn. Uit klinische processen in verschillende organen bij mensen worden sporadisch melkzuurbacteriën geïsoleerd. Het verband tussen oorzaak en gevolg is moeilijk aan te geven. Het kan evenwel wijzen op translocatie vanuit de darm en ongewenste vestiging in organen. Hierbij zullen meestal predisponerende factoren aanwezig moeten zijn, zoals vestiging op de hartkleppen na voorafgaande beschadiging, resulterend in bacteriële endocarditis. In een discussie met deskundigen (Food-Micro '93, Int. Union of Microbiol. Soc. subcommision bifidobacteria, lactobacilli and related organisms, Bingen) werd gesteld dat melkzuurbacteriën in het algemeen als veilig kunnen worden aangeduid.

8 Toelating van probiotica

De toepassing van (nieuwe) probiotica als voedingsadditief of als geneesmiddel is gebonden aan Nederlandse richtlijnen die zijn gebaseerd op EU regelgeving. In principe is het toelatingsbeleid van biotechnologische producten gebaseerd op veiligheid (inclusief arbeidsveiligheid), deugdelijkheid en effectiviteit. Genetisch gemodificeerde probiotica (micro-organismen) vallen onder een specifieke wettelijke regeling, namelijk het Besluit Genetisch Gemodificeerde Organismen, gebaseerd op bescherming van mens, dier en milieu. Daarnaast zouden eventueel principiële en/of ethische aspecten een rol kunnen spelen in de publieks-acceptatie.

Toevoegingen aan veevoeder, inclusief micro-organismen zijn binnen de EU geregeld in richtlijn 70/524/EG (toevoegingen) en 82/471/EC (bijzondere producten). Ook als het om fermentatie processen gaat, bijvoorbeeld gefermenteerd voeder of inkuilmiddelen, is een EU maatregel in voorbereiding. Deze zal mogelijk veel overeenkomst hebben met 70/524 en 82/471 (inclusief bacteriën, schimmels en restproducten van de fermentatie industrie).

Voor probiotica gebruikt als diergeneesmiddelen zal volgens de Nederlandse regelgeving en volgens EU richtlijn 87/22/EG een dossier betreffende de veiligheid (voor mens, dier en milieu), de werkzaamheid en de kwaliteit overlegd moeten worden.

Dit betekent dat voor nieuw op de markt te brengen probiotica het dossier de veiligheid, deugdelijk en effectiviteit van het probioticum moet aantonen. In het onderzoek zal hiermee zeker rekening moeten worden gehouden.

Bovenstaande regelgeving betekent ook dat de samenstelling van het preparaat bekend en constant moet zijn. Voor bepaalde complex samengestelde preparaten, bijvoorbeeld coecum homogenaten van pluimvee (zie § 4.4), is dat (vrijwel) niet mogelijk. Dit betekent dat voor de registratie van deze complex samengestelde producten een aparte regeling moet komen.

9 Kostenaspect van probiotica

Vanuit de veevoederindustrie wordt gewezen op het kosten aspect. Gezien de geringe marges waarmee in de veehouderij gewerkt moet worden, mogen de kosten voor probiotica in verhouding moeten staan tot de opbrengst: het rendement van het gebruik van pre- en probiotica moet positief zijn. Een ethisch aspect is, dat vermindering van ziekte en uitval op het bedrijf het welzijn van de dieren verbetert.

De kosten voor probiotica kunnen alleen laag zijn, indien de ontwikkelingskosten en de produktiekosten laag zijn. Dit legt met name een enorme druk op de researchkosten. De beperkte financiële ruimte brengt met zich mee dat het onderzoek vaak direct praktijkgericht is (met alle praktijk variabelen van dien), zonder voorafgaand fundamenteel gericht onderzoek. Financiële ruimte voor onderzoek naar werkingsmechanismen is er derhalve niet.

10 Onderzoekmethodieken en -modellen

Het microbiologisch onderzoek in het algemeen is in Nederland van hoog niveau in vergelijking met andere landen, stelt de Stichting Levenswetenschappen in haar rapport "De Microbiologie in Perspectief". Hoewel niet specifiek genoemd in het rapport kan dit ook gelden voor de microbiële ecologie van het maag-darmkanaal. Zowel ten aanzien van methodieken als modellen zijn ontwikkelingen gaande die zeer geschikt zijn voor het onderzoek naar microbiële interacties.

Onder methodieken wordt hier verstaan: methodieken voor monsterneming; methodieken voor isolatie, determinatie en karakterisering van micro-organismen.

Onder modellen wordt hier verstaan: eenvoudige tot complexe *in vitro* modellen, geïsoleerde dierlijke cellen en orgaansystemen, alsmede diermodellen.

10.1 Mogelijkheden en beperkingen van onderzoekmethodieken

De onderzoeksmethoden in de microbiologie hebben zich de laatste jaren sterk ontwikkeld. De klassieke (anaërobe) kweek-, isolatie- en determinatietechnieken zijn verbeterd, zeker als het gaat om de autochtone darmflora. Er zijn ook technieken ontwikkeld (beeld-analyse) of nog in ontwikkeling (flow-cytometrie) om de samenstelling van de microflora te bestuderen zonder deze te kweken. Daarnaast maken thans vooral de moleculair microbiologische technieken een sterke ontwikkeling door.

Andere methodieken om een indruk te krijgen van de metabole activiteit van de darmflora zijn gebaseerd op bepalingen van de enzymactiviteit en de productie van vetzuren. Voor beide is kennis en ervaring in Nederland aanwezig. Een beperking is wel dat het aantal niet-invasieve functionele parameters dat gemeten kan worden nog beperkt is. Hier vindt wel onderzoek aan plaats.

10.1.1 Klassieke kweekmethodieken

Op het gebied van de klassieke bacteriologische kweek-, isolatie- en determinatietechnieken bestaat in Nederland ervaring voor het vervolgen van de samenstelling van de (mucosa geassocieerde) darm- en fecesflora bij dieren (met name varken en pluimvee) en mens. Hoewel thans voor vele groepen bacteriën en gisten selectieve kweekmedia zijn ontwikkeld, zijn de kweekmethodieken relatief globaal en bieden niet altijd de mogelijkheid om binnen een genus specifieke species te onderscheiden in een complexe darmflora. Deze methodiek geeft wel inzicht in de invloed van probiotica en/of voedingscomponenten op de globale samenstelling van de darmflora en in de overleving van bepaalde probioticumstammen. Voor dit laatste geldt de voorwaarde dat een of meer specifieke stabiele eigenschappen aanwezig zijn (bijvoorbeeld antibioticum resistentie) waardoor zij op een selectief medium te onderscheiden zijn van de autochtone bacteriën in de darmflora.

Voor een beperkt aantal (pathogene) bacteriesoorten zijn snelle instrumentele methoden

beschikbaar (Bioscreen, Bactometer). Hiermee kan het globale aantal bacteriën in (feces) monsters worden bepaald. Echter niet voor alle entero-pathogene soorten zijn geschikte selectieve kweekmedia beschikbaar; deze zouden dan nader ontwikkeld moeten worden.

10.1.2 Beeld-analyse en flow-cytometrie

Bij de Rijksuniversiteit Groningen, Medische Microbiologie is een beeld-analyse techniek ontwikkeld die het mogelijk maakt om rechtstreeks de samenstelling van de (menselijke) darmflora onder de microscoop te analyseren. Met behulp van computertechnieken en specifiek ontwikkelde programma's kunnen microscopische beelden van een samengestelde microflora worden geanalyseerd naar grootte, langwerpigheid en concaviteit van de bacteriën. De morfometrische diversiteit van de darmflora kan worden vastgelegd als maat voor de invloed van exogene factoren op de samenstelling van de darmflora.

Deze beeld-analyse techniek leent zich ook voor een kwantitatieve immunofluorescentie methode. Hierbij kan de bindende capaciteit van de darmflora en/of specifieke bacteriën in de darmflora ten opzichte van gelabelde antilichamen worden onderzocht. Met gelabelde specifieke antilichamen gericht tegen een bepaalde bacterie soort kan in principe de aanwezigheid van deze bacterie kwantitatief worden bepaald in een complex samengestelde microflora (kwantitatieve fluoromorfometrie).

Genoemde methodieken zijn geschikt voor ecologisch onderzoek van de darmflora en de invloed van probiotica of andere (externe) factoren op de samenstelling en diversiteit van de darmflora, hetgeen is aangetoond in een onderzoek met *Enterococcus faecalis* bij proefpersonen.

Een methodiek die nog niet ver genoeg is ontwikkeld voor directe toepassing in het darmflora onderzoek is flow-cytometrie. Het principe berust ook op analyse van vorm- en grootte en/of op specifieke labeling van bacteriën, net als bovenstaande methode. Echter, niet in een microscopisch preparaat maar in een monsterstroom langs één of meer detectoren. De methodiek heeft aangetoond levende en dode micro-organismen te kunnen onderscheiden en tellen op basis van specifieke kleuringsmethoden, alsmede morfologische verschillen tussen micro-organismen. De methodiek is (nog) niet gevalideerd voor onderzoek naar de samenstelling van complexe darmflora.

10.1.3 Moleculaire methodieken

In de moleculaire ontwikkelingen neemt Nederland een sterke plaats in. Door gebruik te maken van moleculair-genetische technieken, zoals DNA probes, RFLP en sequentie-analyses, kunnen nadere identificaties en specificaties van micro-organismen plaatsvinden die met de klassieke methoden niet mogelijk zijn. Deze technieken zijn in principe uitstekend toepasbaar in het ecologisch onderzoek van de darmflora. Voorbeelden zijn: (a) het volgen van probioticum-stammen in een complex microbieel systeem met behulp van

specifiek vervaardigde probes; (b) nadere specificatie van stammen van een genus of species van micro-organismen, waardoor op een 'verfijnd' niveau de invloed van probiotica op de samenstelling van de darmflora kan worden bestudeerd. Deze DNA specificatie of fingerprinting kan ook dienen om het eigendomsrecht van geregistreerde probioticumstammen vast te leggen.

Recombinant DNA technieken maken het in principe mogelijk om de (gunstige) genetische eigenschappen van het ene micro-organisme met die van een ander micro-organisme te combineren. Hiervoor is het noodzakelijk dat het gen dat voor deze (gunstige) eigenschap codeert bekend is, stabiel overgezet kan worden naar een andere bacterie en vervolgens tot expressie komt. Bovendien moet het geheel leiden tot veilige en toelaatbare gerecombineerd micro-organismen. Hierbij wordt bijvoorbeeld gedacht aan het verbeteren van de aanhechtingsfactoren van gunstige bacteriën, waardoor deze sterker kunnen concurreren tegen entero-pathogene bacteriën. Anderzijds kan genetische modificatie worden gebruikt om virulentiefactoren te verwijderen uit enteropathogene micro-organismen, zonder hun concurrentiepositie te verminderen. Hierdoor kunnen (theoretisch) deze onschadelijk gemaakte stammen de niche bezetten van de oorspronkelijke entero-pathogene stammen en zodoende infectie voorkomen. Op dit gebied is in Nederland onderzoekservaring voor bepaalde bacteriën (*Campylobacter*). Er zijn echter nog geen reproduceerbare positieve resultaten.

10.2 Mogelijkheden en beperkingen van onderzoekmodellen

10.2.1 *In vitro* modellen

Eenvoudige *in vitro* modellen (batch culturen in buizen met kweekmedium) kunnen snel een antwoord geven op bepaalde vraagstellingen. Echter, de extrapolatie naar de *in vivo* situatie is sterk beperkt. Dit betekent dat deze methoden alleen gebruikt kunnen worden bij ongecompliceerde vraagstellingen.

Complexe(re) *in vitro* modellen van de maag, dunne darm en dikke darm zijn beschreven en voor onderzoek beschikbaar. Deze (samengestelde) modellen hebben een grotere waarde dan de eenvoudige laboratorium proeven, mits ze zeer zorgvuldig worden opgesteld.

Voor microbiologisch onderzoek zijn met name modellen beschikbaar die de dikke darm (colon) simuleren. Voorbeelden van deze modellen zijn o.a. beschreven door Cummings & Mc Farlane (GB) en Molly (B). Beperkingen van deze modellen zijn met name het lagere aantal micro-organismen per ml inhoud en de wijze van menging (met roerder) en transport van de darminhoud (vrijwel alleen de waterfase wordt door gepompt) in vergelijking tot het colon bij mens en dier. Deze modellen worden niet geschikt geacht voor bestudering van subtiele microbiële interacties.

Het complexe maag-darmmodel dat is ontwikkeld bij TNO Voeding, is mede gebaseerd op simulatie van de maag-darm peristaltiek, waardoor een fysiologische menging en dynamiek

van chymus-transport mogelijk is. Door toepassing van wateronttrekkingssystemen is de fysiologische celdichtheid van micro-organismen in de dikke darm te benaderen. De waarde van dit model voor bestudering van de overleving van darmbacteriën in het maag-darmkanaal is in een aantal validatie proeven aangetoond.

10.2.2 Geïsoleerde dierlijke cellen en orgaansystemen

Geïsoleerde dierlijke cellen worden steeds vaker gebruikt voor onderzoek naar hun interactie met micro-organismen. In het verleden werd veelal gewerkt met vers geïsoleerde epitheelcellen uit de mondholte en het maag-darmkanaal, zowel complete cellen als geïsoleerde brush borders. Thans worden ook gekweekte cellijnen gebruikt, onder andere de CaCo-2 cellijn, voor bestudering van de aanhechting en het binnendringen van micro-organismen. Door combinaties te gebruiken van probioticum bacteriën en potentieel pathogene micro-organismen is de interactie te bestuderen. Met CaCo-2 en andere cellijnen is veel ervaring opgebouwd in Nederland, zowel voor pathologisch onderzoek (o.a. Faculteit Diergeneeskunde) als voor de bestudering van transport van stoffen door de darmwand (TNO Toxicologie).

Ten behoeve van extrapolatie van resultaten met geïsoleerde cellen en cellijnen zijn nog relatief weinig validatie experimenten bekend. *In vitro* aanhechtingsproeven hebben laten zien dat het verband met *in vivo* resultaten voorlopig toch beperkt is.

Onderzoek met geïsoleerde orgaansystemen in relatie tot onderzoek naar de darmflora wordt niet uitgevoerd. Hoewel dergelijke modellen zijn beschreven, is de vitaliteit van geïsoleerde darmen-delen, met name de mucosale laag, te beperkt voor microbiologisch onderzoek.

10.2.3 Diermodellen

Dierproeven, zeker als ze worden uitgevoerd met het doeldier als diermodel, kunnen betrouwbare resultaten opleveren met een hoge extrapolatie waarde. Dit geldt met name voor microbiologisch onderzoek, waarbij diersoort specificiteit een grote rol speelt. Microbiologisch onderzoek kan worden uitgevoerd in diermodellen met een verschillende microbiële status: gnotobionten (in beginsel kiemvrije dieren die geassocieerd worden met bekende micro-organismen), SPF dieren (vrij van met name genoemde pathogene micro-organismen maar met een complexe darmflora) en conventionele dieren (met ongecontroleerde microbiële status). Hoewel conventionele dieren het meest op de praktijk situatie lijken, kan het voor microbiologisch onderzoek gewenst zijn onder minder complexe, meer beheerste, condities te werken.

Onderzoek met gnotobionten is echter kostbaar en de resultaten moeten oordeelkundig worden geïnterpreteerd.

Voor onderzoek naar de darmflora bestaan ook gefistuleerde diermodellen, zoals biggen, kalveren en pluimvee. Dit biedt de mogelijkheid om monsters te nemen uit het darmkanaal, alsmede biopten van de darmwand (zie § 10.1).

De uiteindelijke invloed van probiotica op landbouwhuisdieren kan in principe worden onderzocht in het doeldier zelf. Dat kan plaatsvinden onder praktijkgerichte condities met conventionele dieren en in veldproeven op de veehouderijbedrijven. In Nederland zijn goede faciliteiten voor en veel ervaring met dit soort onderzoek. Hierdoor is het mogelijk onder gecontroleerde condities dit soort proeven uit te voeren.

In bepaalde gevallen kan het noodzakelijk zijn om de interactie tussen pathogene micro-organismen en probiotica te onderzoeken. Hiervoor worden proefdieren besmet met enteropathogene bacteriën in geïsoleerde dierverslijven. De reproduceerbaarheid van infectieproeven, zoals met enteropathogene *E. coli* typen, bij landbouwhuisdieren is vaak slecht. Bovendien geven opzettelijke infecties niet altijd het ziektebeeld zoals bij 'spontane' infecties op bedrijven. Dit hangt mogelijk samen met de slecht te beheersen stress-factoren en/of voorafgaande infecties met virussen die in het ziektebeeld een rol spelen.

TNO heeft gewerkt met infectie modellen met *E. coli* in biggen die vrij goed reproduceerbaar waren en geschikt zijn voor onderzoek naar de effectiviteit van probiotica met betrekking tot de preventie van darminfectie.

11 Probiotica en gezondheidsvoeding bij de mens

In tegenstelling tot de sector van landbouwhuisdieren is de belangstelling voor probiotica in voor menselijke toepassing, met name in zogenaamde 'functional foods', het laatste jaar sterk toegenomen. Met name vanuit de zuivelindustrie zijn in korte tijd een aantal produkten op de Nederlandse markt verschenen met als primaire claim de gezondheidsbevordering. Deze produkten bevatten levende melkzuur bacteriën, met name *Lactobacillus casei* en *Lb. acidophilus* stammen. Het betreft zowel een produkt dat in zeer kleine hoeveelheden per dag geconsumeerd zou moeten worden, als produkten die als bij-/nagerecht bedoeld zijn.

De gezondheidsclaims van deze produkten worden vooralsnog vaag omschreven, in termen als algemeen welzijnsverbetering en (immunologische) weerstandsverhoging. Nochtans worden deze produkten in zeer hoeveelheden afgezet op de Nederlandse markt. Dit kan het onderzoek naar de werkelijke functionaliteit van probiotica voor humane toepassing verder stimuleren.

Andere zuivelindustrieën, zowel in Nederland als in het buitenland, zijn hard bezig gelijksoortige produkten te ontwikkelen en op de markt te brengen. De bacteriën die thans in de belangstelling staan zijn vooral lactobacillen en, in mindere mate maar met stijgende belangstelling, *Bifidobacterium*.

Micro-organismen die in het verleden als probiotica werden gebruikt in capsules of suspensies, zoals *Bacillus subtilis* sporen, zijn vrijwel geheel uit de belangstelling verdwenen. In bepaalde landen worden nog wel probiotica met *Saccharomyces boulardii* (= *cerevisiae*) gepropageerd. Ook in de (alternatieve) geneeskunde is een groeiende belangstelling voor produkten met specifieke (melkzuur-)bacteriën (in de orthomoleculaire geneeskunde aangeduid als 'symbioten').

Getracht is te achterhalen in hoeverre deze oplevende belangstelling voor probiotische gefermenteerde melkprodukten invloed heeft op een eventuele hernieuwde interesse bij de veehouderij en de mengvoederindustrie. Tot op heden is deze echter niet merkbaar en wordt door de industrie niet aangegeven. Wellicht is het nog te vroeg om definitief vast te stellen of een reactie zal uitblijven.

12 Conclusies

12.1 Varkens en kalveren

Voor de veehouderij zijn vele preparaten in de handel (geweest) ter bevordering van de darmflora. De introductie ging gepaard met kleurrijke, veel belovende brochures en in enkele gevallen met mini-symposia. Deze brochures/symposia maakten melding van de mogelijkheden van het probioticum concept. Daarnaast werden soms wat resultaten vermeld van onderzoeken. Echter, het ontbrak, en het ontbreekt nog steeds, aan harde wetenschappelijke gegevens gepubliceerd in dubbel gerefereerde tijdschriften die de effectiviteit van deze (probioticum-)produkten aantonen.

Een probioticum is zeker geen 'universeel' middel voor diverse diersoorten onder allerlei omstandigheden. Het zal een middel zijn voor een specifieke doelgroep, dat niet gebruikt moet worden zonder de overige zoötechnische voorwaarden uit het oog te verliezen.

Met een aantal geselecteerde produkten is ook in Nederland onderzoek uitgevoerd, onder andere gericht op de preventie van maag-darminfecties. De resultaten van gecontroleerde laboratorium- en dierproeven waren negatief. Praktijkproeven en -ervaringen waren zeer wisselend en vaak negatief. Er waren geen aantoonbare productie- en/of gezondheidsverbeteringen. Er kon geen meerwaarde voor de bedrijfsresultaten worden vastgesteld.

Daarnaast blijft een eventueel werkingsmechanisme onduidelijk en slechts gebaseerd op theorieën.

Deze ervaringen hebben geleid tot een slecht imago en afnemende belangstelling voor bestaande probioticum produkten bij zowel de mengvoederbedrijven als de Produktschappen. Echter, er bestaat nog wel belangstelling voor wetenschappelijke kennis met betrekking tot darm-ecologie en manieren om deze in gunstig zin te beïnvloeden.

Bovengenoemde ervaringen hebben vrijwel uitsluitend betrekking op produkten met *Streptococcus* (*Enterococcus*) en *Bacillus* stammen en niet op *Lactobacillus* bevattende produkten. De reden hiervoor is dat enterococci en bacillen (in sporen stadium) relatief stabiel zijn en daardoor goed gemengd kunnen worden door het voeder. Voor lactobacillen geldt dit niet, die blijven niet voldoende vitaal als ze door het voeder worden gemengd.

Echter, juist met bepaalde *Lactobacillus* species/stammen worden in proefdieren, bij de mens en ook bij het varken positieve resultaten gemeld; zowel betreffende kolonisatie resistentie als immuunmodulatie. Juist met betrekking tot immuunmodulatie zijn de laatste tijd veel relatief veel goede resultaten, zoals een adjuverend effect, uit proefdieronderzoek naar voren gekomen. Gebaseerd op deze resultaten van *in vitro* en *in vivo* onderzoek met geselecteerde *Lactobacillus* stammen zouden dan ook bij landbouwhuisdieren gunstige effecten kunnen worden verwacht.

Een aantal lactobacillus stammen afkomstig van het varken zijn beschikbaar. Vervolg onderzoek werd echter geblokkeerd doordat ook deze geselecteerde stammen niet voldoende levensvatbaar bleven tijdens verwerking in en opslag van het voer. Onderzoek naar verbetering van de stabiliteit gaf vooralsnog onvoldoende resultaat, waardoor praktijkproeven met deze stammen zijn opgeschort.

Op zich bestaat er bij de (veevoeder)industrie (nationaal en internationaal) nog steeds interesse voor het concept van probiotica in relatie tot bevordering van de darmflora en de gezondheid van landbouwhuisdieren. Indien het ook als alternatief voor antibiotica kan worden toegepast versterkt dit het belang van onderzoek, zowel bij de overheid als de (farmaceutische) industrie.

Onderzoek naar de ontwikkeling en toepassing van probiotica met *Lactobacillus* voor biggen en kalveren, eventueel in combinatie met darmflora stimulerende voedercomponenten (prebiotica), zou zeker moeten worden voortgezet. In principe zal dit ook worden ondersteund door de industrie. Dit onderzoek moet dan wel passen in een totaal beleid rond zoötechniek en management van landbouwhuisdieren, inclusief het terugdringen van het gebruik van antibiotica als groeibevorderaars en therapeutica.

Indien zodoende een gerichte doelstelling kan worden geformuleerd voor de toepassing van probiotica in de veehouderij, kan hierop een onderzoeksdoelstelling worden opgesteld. Slechts dan is het mogelijk om in samenwerkingsverband een gefaseerd onderzoek uit te voeren volgens doelgerichte gestandaardiseerde protocollen.

Er zullen daardoor ook keuzes moeten worden gemaakt, onder andere gericht op diersoort, type micro-organismen als probioticum, toedieningswijze, leeftijd van de dieren, toepassingsdoelstelling (preventieve / curatieve bestrijding van maag-darminfecties / zoönosen).

Aspecten die bij verdere ontwikkeling van probiotica nog van belang zijn en waarbij bij het opstellen van het onderzoeksplan rekening mee moet worden gehouden zijn:

- * acceptatie door gebruikers (produkt en toepassingsmethode);
- * kostprijs ten opzichte van de verbetering van de bedrijfsresultaten;
- * ethische aspecten van verbeterde gezondheid/welzijn van dieren;
- * aangetoonde effectiviteit van produkt;
- * geschiktheid voor registratie (kwaliteit en veiligheid).

Vooraf moet duidelijk zijn dat in het onderzoek aan deze voorwaarden kan worden voldaan.

12.2 Melkveehouderij

Het gebruik van probiotica, zoals gisten, ten behoeve van verhoging van de melkproductie in de melkveehouderij kan niet worden aanbevolen. Verbetering van het rendement op bedrijven met goede zoötechnische omstandigheden is niet te verwachten. Indien de zoötechnische omstandigheden niet goed zijn is enig effect van *Saccharomyces* bevattende produkten niet uitgesloten. Echter, het verdient aanbeveling om eerst andere bedrijfs-

aspecten te verbeteren. Verder onderzoek op het gebied van optimalisering van de pensfermentatie wordt niet aanbevolen.

12.3 Pluimveehouderij

De commerciële probiotica die bestaan uit één of enkele soorten micro-organismen hebben in praktische zin geen betekenis voor de pluimveehouderij. Zowel in het kader van beperking van besmettingen als in het kader van verbetering van groei en voederconversie leveren zij geen enkel rendement op. Er is ook geen enkele aanwijzing dat er micro-organismen zijn die verder onderzoek in deze richting rechtvaardigen.

Toepassing van complex samengestelde 'probioticum' produkten voor de pluimveehouderij bieden wel perspectief en hebben een eigen toepassingsgebied. Deze dienen in eerste instantie te worden gebruikt direct na het uitkomen van de eieren. De kuikens krijgen hierdoor de kans een diersoort-eigen, functionele microflora op te bouwen. Er zijn duidelijke wetenschappelijke resultaten (uit het buitenland) die de effectiviteit aantonen. Dit betekent een verhoging van de kolonisatie resistentie tegen darmpathogenen en zoönosen. Echter, naast toepassing van deze produkten blijven optimale hygiënische maatregelen noodzakelijk om besmettingen met ongewenste micro-organismen te voorkomen.

Een specifieke toepassing van 'dikke darm homogenaten', afkomstig van pathogeen-vrije kippen, is gericht op de bestrijding van reeds aanwezige salmonella infecties, zoals *S. enteritidis*, bij leghennen en vermeerderingsdieren. In combinatie met voorafgaande behandeling met antibiotica (quinolonen) en stringente hygiënische maatregelen zijn in Nederland goede resultaten bereikt.

Toepassing van dit soort produkten in de pluimveehouderij kunnen een hoge waarde hebben. Praktijkstudies zouden moeten aangeven onder welke uitvoeringsomstandigheden dit ook daadwerkelijk leidt tot produkten die vrij zijn van pathogenen die overgebracht worden via pluimvee en eieren. Dit is alleen waardevol als ook ten aanzien van de logistiek (transporten, slachtlijn) krachtige maatregelen worden genomen met betrekking tot de hygiëne dan wel sterke scheiding tussen besmette en zoönose vrije dieren om besmettingen van het eindprodukt te voorkomen. Tevens zou een krachtig beleid gevoerd moeten worden ten aanzien van een verminderd gebruik van antibiotica.

13 Voorgestelde onderzoeksrichting

13.1 Stabiele natuurlijke darmflora bij varkens en kalveren

Voorafgaande aan het onderzoek zou duidelijk de doelstelling omschreven moeten worden zoals mede aangegeven in § 12.1. Een doelstelling die ook past binnen een opgesteld beleid van de industrie en de overheid ten aanzien van een vermindering van het gebruik van antibiotica en een versterking van de positie van veilige en duurzame methoden en middelen die zijn gericht op welzijns- en gezondheidsverbeteringen van landbouwhuisdieren. Vervolgens moeten er keuzes worden gemaakt zoals eveneens is ingezet in § 12.1.

Hier wordt voorgesteld om het onderzoek in eerste instantie te concentreren op de toepassing van *Lactobacillus* stammen ten behoeve van biggen rond het spenen. De doelstelling moet zich richten op de ontwikkeling van een stabiele natuurlijke darmflora en een actief immuunsysteem ter preventie van maag-darminfecties bij gebruik van antibioticum-vrije voeders. Geselecteerde stammen, waarmee reeds onderzoeken naar de kolonisatie resistentie zijn uitgevoerd, kunnen beschikbaar worden gesteld.

In latere instantie zou op analoge wijze onderzoek kunnen worden uitgevoerd ten behoeve van kalveren.

Gezien de beperkte stabiliteit van de *Lactobacillus* stammen zou het onderzoek zich moeten richten op twee aspecten: (a) verbetering van de stabiliteit; and (b) praktische toepasbaarheid van alternatieve toedieningswijzen en gefermenteerd voeder.

Op basis van de hieruit verkregen resultaten zouden praktijkgerichte onderzoeken moeten worden uitgevoerd gericht op de effectiviteit en zo mogelijk het werkingsmechanisme (darmflora en immunologisch onderzoek). De praktijkomstandigheden waaronder deze proeven worden uitgevoerd moeten strikt passen in kader van het opgestelde beleid en de doelstellingen van de toepassing van probiotica. Het is noodzakelijk dat de onderzoeken worden uitgevoerd volgens geaccepteerde en gestandaardiseerde protocollen.

In de totale opzet moet rekening worden gehouden met de vereisten zoals neergelegd in de conclusies (zie § 12.1), zodat met name de uiteindelijke registratie geen problemen oplevert.

De resultaten van de praktijkproeven moeten worden ondersteund door fundamenteel wetenschappelijk onderzoek. Inzicht in het werkingsmechanisme kan het onderzoek gericht verder helpen ten behoeve van andere diersoorten en andere toepassingsgebieden. De in vergaande ontwikkeling zijnde *in vitro* modellen voor bestudering van de microbiële ecologie en immunologische respons bieden hiervoor uitstekende mogelijkheden.

Het onderzoek naar mechanismen van de darmflora op de gezondheid moet zich met name richten op interacties tussen nuttige en schadelijke bacteriën en de metabole producten die hierbij betrokken zijn (bio-actieve peptiden, bacteriocines, kort-keten vetzuren, e.d.) en de

interacties tussen de darmflora en het immuunsysteem van de gastheer (cellulaire en humorale responsen).

13.2 Pluimveehouderij

Alvorens complex samengestelde 'probiotica' definitief aan te bevelen voor de pluimveehouderij zijn gestandaardiseerde en geprotocolleerde praktijkstudies noodzakelijk (zie ook § 7). Onderzoek moet zijn gericht op uitvoeringsomstandigheden tijdens de gehele keten, waaronder toepassing van deze producten effectief leiden tot bedrijfsverbetering en zoönose-vrije pluimveeprodukten.

14 Samenwerkingsverbanden en financiering

Het omschrijven en vastleggen van de beleidskaders waarbinnen probiotica ontwikkeld en toegepast kunnen/moeten worden, zoals omschreven in de conclusies (zie § 12.1 en 12.3) vergt een nauwe samenwerking tussen industrie, onderzoeksinstellingen en overheid.

Het onderzoek zoals voorgesteld in § 13.1 en 13.2 vergt eveneens een samenwerking tussen industrie en diverse onderzoeksinstellingen. en wel om de volgende redenen:

- * op zich zelf staande onderzoeken, hoe wetenschappelijk verantwoord ook, zijn weinig effectief en leiden tot resultaten die onderling niet vergelijkbaar zijn door de vele variabelen.
- * het onderzoek vergt een multi-disciplinaire aanpak; de specialistische kennis en de faciliteiten hiervoor zijn in Nederland ruimschoots aanwezig (zie § 10) maar verdeeld over verschillende instellingen.

De expertisevelden die nodig zijn voor dit onderzoek liggen vooral op het gebied van de microbiële ecologie, inclusief de moleculaire microbiologie en fermentatie, de immunologie, vooral gericht de invloed van orale antigenen op immuun-competente cellen, de pathologie/toxicologie, met name gericht op celkweken en de interacties tussen micro-organismen en enterocyten, alsmede de zoötechniek van landbouwhuisdieren, gericht op diervoeding, huisvesting en logistiek.

In het algemeen is kennis en ervaring op het gebied van *in vitro* technieken en modellen en praktijkstudies bij landbouwhuisdieren noodzakelijk.

Samenwerking moet in principe geen probleem opleveren. Een groot aantal contacten en samenwerkingsverbanden binnen Nederland bestaan reeds, zowel tussen de onderzoeksinstellingen onderling (mede door samenvoeging van bepaalde onderzoeksinstellingen), als tussen onderzoeksinstellingen en industrieën. Verbindende factoren worden tevens gevonden door werkgroepen binnen de Nederlandse Vereniging voor Microbiologie en de Stichting Levenswetenschappen (v/h BION) en contacten met het Produktschap voor Vee en Vlees (inclusief Produktschap voor Pluimvee en Eieren) en het Produktschap voor Veevoeder.

De oprichting van een werkgroep op het gebied van microbiële ecologie van mens en dier zou stimulerend kunnen werken om de aandacht nadrukkelijker op dit gebied te richten.

In eerste instantie zou een samenwerkingsverband gezocht moeten worden binnen Nederland. Wellicht kan dan later in Europees verband samenwerking worden gezocht. Hiervoor zijn reeds een aantal bestaande netwerken aanwezig.

In het kader van de kosten voor nieuwe producten is in § 9 gesteld, dat deze voor de veehouderij niet te hoog mogen zijn. De voorgestelde onderzoeken vergen een behoorlijke investering die niet alleen gedragen kan worden door de betreffende industrie. Dit betekent

dat de verdere ontwikkelingen van duurzame methoden en middelen gericht op een brede gezondheidsbevordering van landbouwhuisdieren en op veilige voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong alleen van de grond komt indien dit breed en gezamenlijk wordt ondersteund vanuit de overheid (beleid en fundamenteel onderzoek), de industrie, de produktschappen (produktontwikkeling en toepassingsgericht onderzoek) en de onderzoekinstellingen.

Referenties

- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Gilliland, S.E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 175-188.
- Gorbach, S.L. and Goldin, B.R. (1990). The intestinal microflora and the colon cancer connection. *Rev. Infect. Dis.* 12, suppl. 2: S252-S261.
- Goren, E., De Jong, W.A., Doornenbal, P., Bolder, N.M., Mulder, R.W.A.W. and Jansen, A. (1988). Reduction of Salmonella infection of broilers by spray application of intestinal microflora: a longitudinal study. *Vet. Quarterly* 10: 249-255.
- Havenaar, R. and Huis in 't Veld, J.H.J. (1992): Probiotics; a general view. In: *The lactic acid bacteria: volume I The lactic acid bacteria in health & disease*. Ed. B.J.B. Wood. Elsevier Appl. Sci. Publ., Barking, G.B. pp.: 151-170.
- Havenaar, R., Ten Brink, B. and Huis in 't Veld, J.H.J. (1992): Selection of strains for probiotic use. In: *Probiotics, The scientific basis*. Ed. R. Fuller. Chapman & Hall, London. pp 209-224.
- Havenaar, R. (1993). Bacterial strains with proven activity against enteropathogens. In: *Interruption of bacterial cycles in animal production: related to veterinary public health*. Ed.: B.A.P. Urlings. Workshop 8-10 December 1993, Utrecht, The Netherlands. ADDIX, Wijk bij Duurstede, The Netherlands. pp 97-109.
- Havenaar, R. and Huis in 't Veld, J.H.J. (1993) In vitro and in vivo experiments with two commercial probiotic products containing *Enterococcus faecium* and *Bacillus toyoi*. In: *Probiotics and pathogenicity*. Eds: JF Jensen, MH Hinton, RWA Mulder; COVP-DLO Het Spelderholt, Beekbergen, The Netherlands. pp 54-62.
- Havenaar, R., Veenstra, J., Minekus, M. and Marteau, Ph. (1993). In vitro maag-darmkanaal. Unieke methode voor bestudering fysiologische aspecten van voeding. *Voeding* 54 (6): 7-11.
- Havenaar, R. and Spanhaak, S. (1994). Probiotics; from an immunological point of view. *Current Opinion in Biotechnology*
- Huis in 't Veld, J.H.J.; Havenaar, R. and Marteau, Ph. (1994). Establishing a scientific basis for probiotic R&D. *Trends in Biotechnology* 12 (1): 6-8.

Impey, C.S., Mead, G.C. and George, S.M. (1982). Competitive exclusion of salmonellas from the chick coecum using a defined mixture of bacterial isolates from the coecal microflora of an adult bird. *J.Hyg.* 89: 479-490.

Mead, G.C. and Impey, C.S. (1987). The present status of the Nurmi Concept for reducing carriage of food-poisoning salmonellae and other pathogens in live poultry. In: *Elimination of pathogenic organisms from meat and poultry*. Ed. f.J.M. Smulders. Elsevier Sci. Publ., Amsterdam.

Mead, G.C. and Borrow, P.A. (1990). Salmonella control in poultry by "competitive exclusion" or immunization. *Lett. Appl. Microbiol.* 10: 221-227.

Minekus, M., Marteau, Ph., Havenaar, R. and Huis in 't Veld, J.H.J. (1995). A multicompartamental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA* 23: 197-209.

Perdigon, G., De Macias, M.E.N., Alvarez, S., Oliver, G. and De Ruiz Holgado, A.A.P. (1990). Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Res.* 57: 255-264.

Perdigon, G., Alvarez, S. and Pesce De Ruiz Holgado, A. (1991). Oral immunoadjuvant activity of *Lactobacillus casei* influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. *J. Dairy Research* 58: 485-496.

Tannock, G.W., Fuller, R. and Pedersen, K. (1990). *Lactobacillus* succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. *Appl. Environmental Microbiol.* 56: 1310-1316.